



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de Fevereiro de 1808



Monografia

**Estudo da via Sonic Hedgehog em carcinomas de
próstata**

**Raquel Fraga Teixeira Von
Weyhrother**

**Salvador (Bahia)
Dezembro, 2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

(elaborada pela Bibl. **SONIA ABREU**, da Bibliotheca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

Von Weyhrother, Raquel Fraga Teixeira

W547

Estudo da via Sonic Hedgehog em carcinomas de próstata/
Raquel Fraga Teixeira Von Weyhrother. (Salvador, Bahia): RFT,
Von Weyhrother, 2014

VI; 37fls.: il.

Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Professor orientador: Daniel Abensur Athanzio

Palavras chaves: 1. Proteínas Hedgehog; 2. Neoplasias de Próstata. I. Athanzio, Daniel Abensur. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título

CDU: 616.65-006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA**
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Estudo da via Sonic Hedgehog em carcinomas de próstata

Raquel Fraga Teixeira Von Weyhrother

Professor orientador: **Daniel Abensur Athanzio**
Orientador tutor: **Andréia Carvalho dos Santos**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2014.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Dezembro, 2014

Monografia: *Estudo da via Sonic Hedgehog em carcinomas de próstata*, de **Raquel Fraga Teixeira Von Weyhrother**.

Professor orientador: **Daniel Abensur Athanzio**

Orientador tutor: **Andréia Carvalho dos Santos**

COMISSÃO REVISORA:

- **Daniel Abensur Athanzio** (Presidente, Professor orientador), Professor do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia e Preceptor do Programa de Residência Médica de Patologia da COREME/Complexo HUPES e MCO da Universidade Federal da Bahia.
- **Murilo Pedreira Neves Júnior**, Professor do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Lucas Teixeira e Aguiar Batista**, Professor do Departamento de Cirurgia Experimental e Especialidades Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Carolina Cunha de Oliveira**, Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VIII Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ___ de _____ de 2014.

EQUIPE

- Raquel Fraga Teixeira Von Weythrother, estudante de graduação de medicina da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: kelteixeira@hotmail.com;
- Daniel Abensur Athanzio, Professor orientador, Professor do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia e Preceptor do PRM de Patologia da COREME/Complexo HUPES e MCO da Universidade Federal da Bahia;
- Andréia Carvalho dos Santos, Orientadora Tutora, Doutoranda do Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação em Patologia (PPgPAT) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (COM-HUPES)

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor **Daniel Athazio**, pela presença constante e substantivas orientações acadêmicas e à minha vida profissional de futura médica.
- ◆ À Doutoranda **Andréia Carvalho dos Santos**, minha Orientadora tutora, pela disponibilidade em ajudar e orientar a mim, na análise de lâminas histológicas e em metodologia de pesquisa.
- ◆ Aos Doutores **Murilo Neves**, **Lucas Batista** e **Nathanael de Freitas** e à Doutoranda **Carolina Cunha de Oliveira**, membros da Comissão Revisora desta Monografia, pela imensa colaboração na etapa final e dedicação na correção.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	2
ÍNDICE DE SIGLAS	3
I. RESUMO	4
II. OBJETIVOS	5
III. REVISÃO DE LITERATURA	6
III.1. Epidemiologia do câncer de próstata	6
III.2. Marcadores morfológicos de prognóstico do adenocarcinoma da próstata	7
III.3. Via Sonic Hedgehog – Aspectos gerais	9
III.4. A via Sonic Hedgehog em carcinomas prostáticos	11
IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
V. CASUÍSTICA E METODOLOGIA	16
V.1. Casuística	16
V.2. Estudo histológico	16
V.3. Estudo imunohistoquímico	16
V.4. Análise imunohistoquímica	17
V.5. Análise estatística	17
V.6. Considerações éticas	18
VI. RESULTADOS	19
VII. DISCUSSÃO	26
VIII. CONCLUSÕES	30
IX. SUMMARY	31
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
XI. ANEXOS	34
• ANEXO 1: Comitê de Ética em Pesquisa do HUPES	34

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

- FIGURA I.** Esquema resumido da via Sonic Hedgehog em células em repouso e em proliferação 11
- FIGURA 1.** Exemplos de marcação nuclear do fator de transcrição GLI-1 em produtos de prostatectomia radical e exemplos de marcação citoplasmática de SHH 25

TABELAS

- TABELA I.** Especificidade, clone, diluição, forma de recuperação antigênica, marca comercial dos anticorpos primários e controle das reações imuno-histoquímicas 17
- TABELA 1.** Média e frequência das características das prostatectomias radicais provenientes do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) 19
- TABELA 2.** Achados de expressão de genes de proteínas SHH da via SHH em tecido prostático benigno, focos de neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIIN), adenocarcinomas Gleason 3 e 4/5 de 28 casos de prostatectomia radical 20
- TABELA 3.** Achados de expressão de genes de proteínas GLI1 da via SHH em tecido prostático benigno, focos de neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIIN), adenocarcinomas Gleason 3 e 4/5 e estroma de 28 casos de prostatectomia radical. 22
- TABELA 4.** Comparação entre grupos de pacientes estratificados por presença ou ausência de expressão 3+ de SHH e GLI1 em adenocarcinomas de próstata 24

ÍNDICE DE SIGLAS

DHH	Desert Hedgehog
FU	Fused
GLI	Glioma associated oncogene
HGPIN	High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (Neoplasia Intraepitelial Prostática de Alto Grau)
HH	Hedgehog
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IHH	Indian Hedgehog
OMS	Organização Mundial da Saúde
PSA	Prostate-Specific Antigen (Antígeno Prostático Específico)
PTCH	Protein patched
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
RNA _m	Messenger Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico mensageiro)
SHH	Sonic Hedgehog
SMO	Smoothened
SU(FU)	Supressor of Fused

I. RESUMO

ESTUDO DA VIA SONIC HEDGEHOG EM CARCINOMAS DE PRÓSTATA. Introdução: O carcinoma da próstata é uma das doenças prioritárias do Ministério da Saúde em nosso país e constitui-se num problema de saúde pública, sendo a neoplasia maligna visceral mais incidente em homens brasileiros. A gradação de Gleason é uma importante ferramenta para prever o comportamento agressivo do tumor, no entanto, mesmo pacientes com histologia branda podem apresentar progressão da doença. Dessa forma, entender os fatores que possam estar associados à progressão da doença representa uma estratégia importante para entender a biologia tumoral e, conseqüentemente, favorecer estudos que possam identificar fatores moleculares de prognóstico. **Objetivo:** avaliar o perfil de expressão de proteínas da via Sonic Hedgehog (SHH) em carcinomas de próstata a fim de contribuir para o conhecimento sobre a patogênese e comportamento biológico deste tumor. **Metodologia:** A partir de produtos de prostatectomias radicais processados segundo o mesmo protocolo, fizemos um estudo histológico e imuno-histoquímico a fim de comprovar a influência da via SHH nos carcinomas de próstata. **Resultados:** Não há uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão epitelial de SHH e nuclear de Glioma-associated oncogene 1 (GLI1) em próstata normal, focos de neoplasia intraepitelial de alto grau e adenocarcinomas Gleason 3 e 4/5. **Discussão:** Foi demonstrado em diversas pesquisas a relação da via SHH em muitos tipos de cânceres, mas a relação de tal via com a progressão do câncer de próstata é incerta, visto que os resultados das pesquisas são muito divergentes. Em nossa série, não constatamos diferenças na expressão entre epitélio acinar normal, neoplasia intraepitelial ou carcinomas invasivos de baixo e alto grau. **Conclusão:** Não há relação entre a expressão de SHH e GLI1 e câncer de próstata.

Palavras chaves: 1. Proteínas Hedgehog; 2. Neoplasias de próstata.

I. OBJETIVOS

PRINCIPAL

Avaliar o perfil de expressão de proteínas da via Sonic Hedgehog (SHH) em carcinomas de próstata, focos de neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIN) e ácinos normais a fim de investigar a possível relação entre a ativação da via e a progressão do adenocarcinoma da próstata.

SECUNDÁRIOS

1. Avaliar a imunoexpressão e imunolocalização de componentes da via SHH em carcinomas de próstata, focos de neoplasia intraepitelial de alto grau e ácinos normais.
2. Avaliar a associação entre a expressão de componentes da via SHH com marcadores morfológicos de progressão nos carcinomas da próstata.

III. REVISÃO DE LITERATURA

III. 1 -Epidemiologia do câncer de próstata

O adenocarcinoma de próstata é a neoplasia maligna mais incidente em homens de países desenvolvidos e, nestes países, em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2008) registrou 643 mil novos casos, o que correspondeu a 20% do total de neoplasias malignas em homens. Já em países denominados “em desenvolvimento”, neste mesmo ano, este câncer foi o 6º tumor mais frequente (6% do total de casos), sendo superado pelo cânceres de pulmão, estômago, fígado, esôfago, cavidade oral e faringe e coloretal. Segundo Datta & Datta (2006), chama atenção a desproporcional alta mortalidade da doença em países em desenvolvimento, em comparação com a situação dos países desenvolvidos, nos quais cerca de 70% dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de próstata permanecem em torno de dez anos livres de doença, após tratamento preconizado com alguma combinação de prostatectomia radical, radioterapia e/ou bloqueio hormonal.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2013) estimou para o ano de 2014, 68.800 novos casos de adenocarcinoma de próstata, ou seja, um risco estimado de 70 casos novos por 100 mil homens. O adenocarcinoma de próstata é a neoplasia maligna de maior incidência em homens na Região Sudeste (88/100 mil) e Nordeste (47/100 mil). Para as outras regiões, também é o câncer mais incidente em homens, quando é excluído o câncer de pele não melanoma nas Regiões Sul (91/100 mil), Centro-Oeste (62/100 mil) e Norte (30/100 mil).

Refletindo uma tendência mundial, a incidência de adenocarcinoma de próstata tem aumentado no Brasil, nas últimas décadas, especialmente pela maior expectativa de vida da população. Sabe-se que o principal fator de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma de próstata é a idade. Além disso, a maior disponibilidade de métodos diagnósticos e a melhoria nos sistemas de informação podem também explicar, em parte, o aumento na detecção de casos novos. Outras associações incluem: raça/etnia negra, história familiar, dieta rica em gordura animal, embutidos, e síndrome metabólica /diabete tipo II (INCA, 2013).

De acordo com o INCA (2013), no Brasil, há uma tendência do aumento da mortalidade pelo adenocarcinoma de próstata, em consonância com o que ocorreu nos Estados Unidos, aonde a mortalidade do carcinoma de próstata já superou a do câncer de pulmão. Como ocorre com o carcinoma da mama em mulheres, há uma tendência de aumento da mortalidade (pelo aumento da incidência) em que pese o fato de que cada vez mais estas neoplasias podem ser mais curadas ou controladas em função da detecção precoce e das novas opções terapêuticas de ferramentas para o diagnóstico precoce (INCA, 2013)

III.2 – Marcadores morfológicos de prognóstico do adenocarcinoma da próstata

O Colégio Americano de Patologistas classifica os fatores prognósticos do carcinoma da próstata em três categorias: I (comprovado e útil na prática clínica de rotina dos pacientes auxiliando na conduta terapêutica), II (fatores em estudos clínicos e modelos experimentais, mas que aguardam validação em estudos com grande poder estatístico) e III (outros fatores sugeridos, mas ainda não suficientemente avaliados). Os fatores da categoria I incluem: níveis séricos pré-operatórios de Antígeno Prostático Específico (PSA), grau histológico de Gleason, estadiamento e comprometimento de margens cirúrgicas na prostatectomia. Fatores da categoria II incluem infiltração perineural, diferenciação neuroendócrina, densidade microvascular, marcadores de proliferação celular, e expressão de diversos oncogenes e supressores tumorais (Eble *et al.*, 2004).

No que se refere aos dados de valor prognóstico fornecidos pelo exame patológico de produtos de prostatectomia destaca-se o grau de Gleason. O sistema de gradação de Gleason passou a ser recomendado pela OMS a partir de 1993 e representa um sistema de gradação singular, pois avalia apenas o grau de distorção arquitetural das glândulas neoplásicas (atipias nucleares não são avaliadas) e considera os dois padrões predominantes resultando numa soma do padrão principal com o padrão secundário. Os padrões mais frequentemente observados em peças cirúrgicas são os padrões 3 (crescimento infiltrativo com arquitetura glandular nitidamente detectável), 4 (crescimento infiltrativo com diferenciação glandular pouco definida ou formação de estruturas glandulares fusionadas ou cribriformes) e 5 (crescimento infiltrativo,

trabecular ou sólido, sem formação de estruturas glandulares). Desta forma, a gradação de Gleason resulta da soma de padrões que em geral variam de 6 a 10. Outros marcadores morfológicos associados a progressão da doença são: extensão extraprostática, infiltração da vesícula seminal, comprometimento das margens de ressecção, infiltração perineural (presente em 75-84% das prostatectomias radicais), volume do tumor e metástase para linfonodos (presente em 1-2% das prostatectomias radicais) (Eble *et al.*, 2004).

O adenocarcinoma de próstata é um achado frequente em necropsias. Focos de câncer podem ser identificados em até 20% de todos os homens com mais de 50 anos de idade e em até 70% dos homens com mais de 70 anos de idade. Estes dados não aparecem na incidência, que se refere a novos casos diagnosticados, pois a maioria não resultará em elevação de marcadores laboratoriais, alterações ao toque digital ou causará manifestações clínicas (Kumar *et al.*, 2010). Esta frequência é similar para homens de qualquer etnia, muito embora brancos, e em especial negros, tenham uma incidência muito mais elevada de carcinoma da próstata quando comparados com homens orientais. Esta diferença chama atenção para fatores relacionados ao estilo de vida (Kumar *et al.*, 2010). Visto que a prevalência de adenocarcinoma de próstata é alta, em especial de carcinomas de volume mínimo detectados em biópsias de agulha, torna-se crucial a compreensão de mecanismos moleculares que determinam a iniciação, progressão e comportamento biológico da doença. Após a compreensão de vias moleculares ativadas no carcinoma de próstata, estas podem servir como marcadores prognósticos ou alvos terapêuticos. Dessa forma, o estudo de vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento tumoral, como é o caso da via Sonic Hedgehog (SHH), é de especial interesse, por mostrar a relação com a progressão do câncer de próstata em estudos prévios.

A busca por marcadores moleculares com valor prognóstico é um amplo campo de pesquisa em neoplasias em geral, e uma questão crucial no carcinoma da próstata. Atualmente, há intenso debate até que ponto os protocolos atuais submetem pacientes a “hipertratamento” visto que os dados morfológicos e clínicos disponíveis não preveem o comportamento biológico em vários casos. Estima-se que de todos os carcinomas prostáticos diagnosticados com base de triagem pelos níveis séricos de PSA, 15% em brancos e 37% em negros jamais evoluíram para tumores com manifestações clínicas. Além disso, 70% dos pacientes com carcinoma prostático de baixo grau, ou seja, escore

de Gleason 6 (3+3) e 20% dos pacientes com Gleason 3+4, diagnosticados em biópsias de agulha, não apresentarão progressão da doença num período de quinze anos (Kristiansen, 2012). Em conjunto, estes dados inferem que 35% de todos os pacientes que recebem diagnóstico de câncer de próstata são submetidos a tratamentos desnecessários, o que ressalta a importância de marcadores moleculares de comportamento biológico do tumor e prognóstico. Embora não tenha sido incorporado à prática, o marcador mais estudado neste contexto é o marcador de proliferação celular Ki67. Em diferentes estudos, ele foi um fator prognóstico independente para óbito em pacientes submetidos à conduta expectante (*watchful waiting*), recidiva do PSA em pacientes prostatectomizados e progressão da doença em pacientes submetidos à radioterapia (Kristiansen, 2012).

III.3 - Via Sonic Hedgehog- Aspectos Gerais

A via de sinalização SHH é conservada entre invertebrados e vertebrados e está associada a diversas etapas do desenvolvimento embrionário (organogênese do sistema nervoso central, esqueleto axial, pulmões, pele, dentes, estômago, pâncreas e próstata), manutenção e crescimento de células-tronco adultas e na progressão de neoplasias humanas (Altaba *et al.*, 2002; Riobo *et al.*, 2006).

A via SHH tem diversos componentes, cujas funções são funcionalmente integradas. Dentre estes, destacam-se as proteínas da família Hedgehog (HH): Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) e Desert Hedgehog (DHH) (Echelard *et al.*, 1993); os receptores transmembrânicos *Protein patched 1* (PTCH1) e *Smoothed* (SMO); as proteínas de fusão, *Suppressor of fused* (SUFU) e *Fused* (FU) e os fatores de transcrição da família *GLI-Kruppel*, *Glioma-associated oncogene 1, 2 e 3* (*GLI1*, *GLI2* e *GLI3*, respectivamente). O receptor PTCH1 é uma proteína transmembrana de doze passagens, cujo gene exibe similaridade de sequência com proteínas de Niemann-Pick, e apresenta um domínio sensível a esteróides. Em condições de equilíbrio, a sinalização do PTCH1 inibe a proteína G acoplada ao receptor SMO. Na presença do ligante SHH, o complexo SHH-PTCH1 é internalizado e a repressão à sinalização do SMO é relaxada. O receptor PTCH1 tem ampla distribuição nos tecidos e parece servir a múltiplos ligantes da via SHH enquanto o PTCH2 tem expressão restrita e parece estar associado mais diretamente à sinalização do ligante DHH. A proteína SUFU inibe a

sinalização da via SHH por impedir a localização nuclear do fator de transcrição GLI1. A proteína FU, por sua vez, estabiliza o fator de transcrição GLI1 e impede sua proteólise (Chari & McDonnell, 2007). No que se refere ao papel desta via na oncogênese, podemos caracterizar SHH, SMO, FU e GLI1 como proto-oncogenes enquanto PTCH1 e SUFU atuam como supressores tumorais, visto que atuam como reguladores positivos e negativos do ciclo celular, respectivamente (Figura I) (Ruiz i Altaba *et al.*, 2002).

Deleções ou mutações que inativam o receptor PTCH1 são características da Síndrome de Gorlin, caracterizada por múltiplos carcinomas basocelulares da pele, anormalidades esqueléticas e maior risco de desenvolver meduloblastoma (Chari & McDonnell, 2007). Desta forma, observa-se uma atuação típica de um gene supressor tumoral, cuja mutação herdada aumenta o risco do desenvolvimento de neoplasias. Na última década, diversos estudos demonstraram a ativação aberrante desta via em carcinomas do cólon, estômago, mama, esôfago, pâncreas e pulmão (Altaba *et al.*, 2002; Riobo *et al.*, 2006).

A crescente demonstração da participação da via SHH no comportamento biológico de tumores humanos tem proporcionado testes com substâncias químicas que podem inibir a atividade da mesma. Dentre esses agentes com potencial farmacológico, o primeiro inibidor da atividade da via SHH foi a ciclopamina, um alcalóide teratogênico extraído da planta venenosa *Veratrum californicum*, sendo que o mesmo tem sido amplamente usado em estudos *in vitro*. Outros inibidores vêm sendo testados, com efeitos promissores no controle de meduloblastomas, em modelo animal (Chari & McDonnell, 2007).

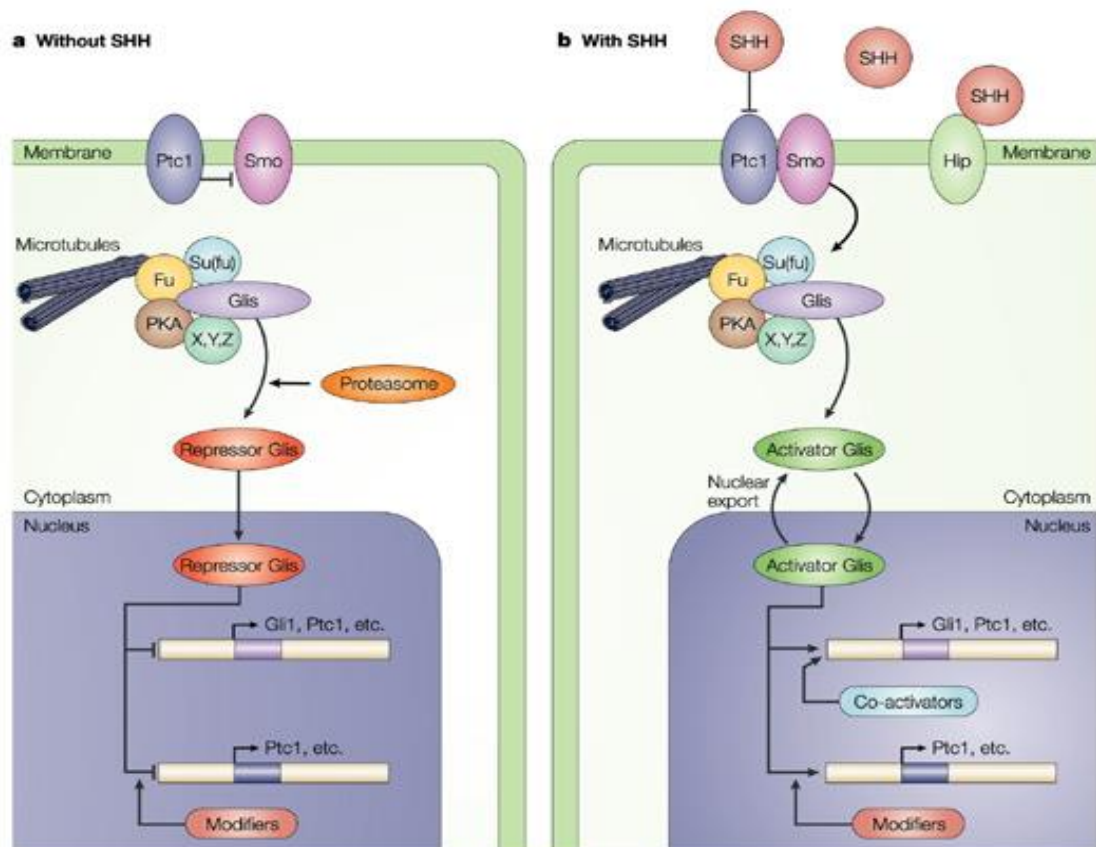


Figura I. Esquema resumido da via Sonic Hedgehog em células em repouso e em proliferação.
 FONTE: Ruiz i Altaba *et al.* (2002).

III.4 - A via Sonic Hedgehog em carcinomas prostáticos

O início da organogênese da próstata em humanos está associado a um aumento da expressão do morfógeno SHH, que dura até o desenvolvimento completo da próstata. O uso de anticorpos neutralizantes contra SHH resulta em bloqueio do crescimento da próstata e no surgimento e ramificação dos ductos prostáticos (Chari & McDonnell, 2007). De modo interessante, em todos os sítios em que a via SHH demonstrou ter papel na morfogênese de ramificações ductais durante o desenvolvimento (mama, pâncreas e pulmão) já foi também demonstrado o papel da hiperativação desta via em neoplasias primárias destas topografias (Datta & Datta, 2006).

Sanchez *et al.* (2004) usaram três linhagens celulares de carcinomas da próstata: a LNCaP (derivada de um metástase nodal de um carcinoma prostático sensível a andrógenos) e as linhagens PC3 e DU145 (derivadas de metástases ósseas de

carcinomas prostáticos insensíveis a andrógenos). Em todas estas, estes autores descreveram a expressão dos genes PTCH1 e GLI1. Nas linhagens PC3 e DU145, observaram a expressão de GLI2 e, somente na linhagem LNCap, níveis de RNAm de GLI3 e SHH foram detectados. Para todas essas linhagens, a ciclopamina bloqueou a proliferação em mais de 80% das células LNCaP, 30% na PC3, mas não foi possível identificar qualquer efeito desta droga sobre a linhagem DU145. A ciclopamina bloqueia a ação do proto-oncogene SMO, que participa da via SHH numa posição *downstream* ao receptor PTCH1. De modo interessante, todas as três linhagens têm a proliferação inibida por RNA de interferência contra o fator de transcrição GLI1. Estes resultados apontam que: 1) em carcinomas da próstata, a ativação da via SHH pode resultar de alterações *downstream* ao SMO; e 2) a ativação do fator transcricional GLI1 sugere que esta via pode participar da progressão do adenocarcinoma da próstata.

Karhadkar *et al.* (2004) investigaram o papel da via SHH nas linhagens LNCaP, PC3, DU145 e incluíram também a CWR22RV1 (xenoenxerto em camundongos de carcinoma prostático humano, recidivado após regressão induzida por castração). Todas as linhagens expressaram transcritos dos genes SHH e IHH, PTCH1 e GLI1. Neste trabalho, a ciclopamina inibiu o crescimento, e a expressão de c-myc e ciclina D1, nas linhagens PC3, DU145 e CWR22RV1. Células CWR22RV1 com transfecção e expressão forçada de GLI1, não sofreram os efeitos anti-proliferativos da ciclopamina. Em xenoenxertos das linhagens PC3 e CWR22RV1, observaram que as neoplasias em camundongos tinham crescimento suprimido com ciclopamina, com tratamento diário com a dose de 10mg/Kg com regressão completa na dosagem de 50 mg/Kg. Amostras biológicas de próstata normal, carcinomas prostáticos localizados e metastáticos foram avaliados: 15 de 15 metástases expressaram transcritos de PTCH1 e GLI1, apenas 3 de 12 carcinomas localizados expressaram os mesmos genes, e nenhuma das amostras não neoplásicas expressaram os transcritos PTCH1 e GLI1. Nos carcinomas localizados, a expressão de PTCH1 sempre foi no mínimo 10 vezes menor que nas neoplasias metastáticas. O artigo ainda estende a avaliação do papel da via SHH na próstata, demonstrando que a regeneração do epitélio prostático, no modelo murino de castração e reposição de andrógenos, depende da via SHH. Após a atrofia induzida pela castração, anticorpos anti-HH impedem a regeneração do epitélio prostático nos animais que recebem suplementação de andrógenos.

Sanchez *et al.* (2004) também investigaram a expressão dos genes SHH, PTCH1 e GLI1 em 288 produtos de prostatectomia. A expressão destes três componentes da via SHH foi demonstrada no epitélio glandular prostático normal, mas não no estroma interglandular, e nos carcinomas prostáticos. A expressão de SHH, PTCH1 e GLI1 foi variável nos carcinomas prostáticos. A investigação da expressão de SHH por imuno-histoquímica demonstrou alta expressão em 33% dos carcinomas da próstata e em <1% dos tecidos normais. A expressão de SHH foi diferente entre neoplasias invasivas e tecidos não-neoplásicos, neoplasia intra-epitelial de alto grau e tecidos não-neoplásicos, e expressão do marcador de proliferação celular Ki-67. Não foram observadas diferenças na expressão de SHH em função do grau de Gleason (Gleason 6 versus 7,8,9), estadiamento, presença de metástases para linfonodos, recorrência de elevação do PSA sérico ou sobrevida.

Sheng *et al.* (2004) avaliaram a ativação da via através da análise da expressão de um dos genes alvo da mesma: PTCH1. Em amostras de carcinoma prostático, observou-se aumento na frequência de expressão de PTCH1 em carcinomas de alto grau: 4/18 (22%) dos carcinomas grau de Gleason 3 a 6 e 16/22 (73%) daqueles com grau de Gleason 8 a 10. Os quatro casos de carcinomas metastáticos também apresentaram expressão de PTCH1. O mecanismo pela qual a via apresenta-se desregulada também foi estudado. No total, 11/27 (41%) carcinomas PTCH1 positivos apresentam perda de expressão do supressor SUFU sendo 9/16 (56%) carcinomas PTCH1 positivos com graus de Gleason 8 a 10. Outro mecanismo seria o aumento da expressão do SHH, cuja expressão foi alta em 24/27 (89%) amostras de carcinomas prostáticos que apresentaram expressão de PTCH1. Este estudo foi ainda complementado pela análise *in vitro* de cinco culturas de células de carcinoma da próstata, todas com expressão de PTCH1. O tratamento destas células com ciclopamina resultou em bloqueio da expressão dos genes da via SHH, bem como bloqueio da proliferação celular e perda de invasividade. Entre as limitações deste trabalho, que representa o principal em termos de correlação da expressão de componentes da via SHH com marcadores morfológicos de prognóstico do carcinoma de próstata em produtos de prostatectomias radicais, podem ser enumeradas: 1) o uso da técnica de *tissue microarray* limita a avaliação de marcadores moleculares em neoplasias heterogêneas e, ao mesmo tempo, os biomarcadores podem ter expressão heterogênea em neoplasias, 2) não foram correlacionados com marcadores morfológicos de

prognóstico, tais como infiltração extracapsular, de vesículas seminais, ou volume do tumor, 3) o uso de PTCH1 como marcador de atividade da via é limitante, por que esta proteína também pode ter expressão constitutiva em tecidos normais, 4) a expressão isolada de SHH não é suficiente para provar que existem os efeitos *downstream* deste morfógeno, na cascata de sinalização (Datta & Datta, 2006).

Mais recentemente, um estudo coreano baseado na análise retrospectiva de 155 prostatectomias radicais avaliou o papel de preditor prognóstico dos seguintes marcadores: SHH, PTCH1, SMO, SUFU e GLI1. A expressão destes marcadores em carcinomas prostáticos foi detectada em, respectivamente, 47%, 62%, 56%, 55% e 67% dos casos (Kim *et al.*, 2011). Foram observadas correlações com significância estatísticas com parâmetros clinicopatológicos clássicos do carcinoma da próstata incluindo tamanho do tumor (para SHH), níveis de PSA sérico pré-tratamento (para SHH e PTCH1), grau de Gleason (SHH, PTCH1, SMO e GLI1), infiltração perineural (PTCH1, SMO e GLI-1) e estadiamento (SHH e SMO). Numa análise multivariada, apenas o volume do tumor, grau de Gleason, níveis séricos de PSA pré-tratamento e expressão de SHH foram fatores prognósticos independentes para recorrência de elevação do PSA sérico. O risco de recorrência bioquímica foi 2,9 vezes maior nos pacientes com carcinoma apresentando hiperexpressão da via SHH (Kim *et al.*, 2011).

IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:

Muitos estudos já comprovaram a relação da via SHH com diversos tipos de câncer como o carcinoma basocelular e meduloblastoma, câncer de pulmão, mama, esôfago, estômago, pâncreas e cólon. A relação desta via com o adenocarcinoma de próstata, no entanto, não é consistente em diferentes estudos. Caso esta relação exista, as proteínas da via SHH seriam de extrema importância para os portadores de tal malignidade visto que para os adenocarcinomas com grau de Gleason 3, elas serviriam como potenciais marcadores moleculares de prognóstico prevenindo o hipertratamento naqueles casos que não progrediriam. Além disso, a via SHH é um potencial alvo molecular na busca de novos tratamentos para o carcinoma da próstata.

V. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

V.1 Casuística

Vinte e oito produtos de prostatectomias radicais provenientes do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), representando uma série consecutiva de casos, obtidos entre o período de Junho de 2012 à Dezembro de 2013.

Todos os casos foram processados segundo o mesmo protocolo no qual a próstata é mapeada em 24 secções (2 secções por quadrantes, sendo representados quadrantes nos terços apical, médio e base) além de separadas as margens vesical, uretral, base de inserção das vesículas seminais e linfonodos pélvicos (quando ressecados).

Todos os casos foram examinados e os laudos emitidos de acordo com o padrão internacional recomendado pelo Colégio Americano de Patologistas.

V.2 - Estudo Histológico

As lâminas foram revisadas por dois patologistas, um com experiência em uropatologia e outro em imunexpressão da via SHH. Os examinadores das lâminas histológicas tinham conhecimento do diagnóstico de adenocarcinoma acinar da próstata. O patologista com experiência em uropatologia identificou áreas de tecido morfológicamente normal, neoplasia intraepitelial de alto grau e adenocarcinomas acinar da próstata Gleason 3 e 4/5, para avaliar a expressão de proteínas SHH e GLI1. O consenso entre os patologistas serviram para confirmação do diagnóstico e anotação dos seguintes parâmetros patológicos relacionados ao prognóstico:

- volume tumoral (em percentagem da próstata), grau de Gleason, presença de infiltração perineural intraprostática, presença de infiltração extracapsular, presença de infiltração da vesícula seminal, comprometimento das margens de ressecção.

V.3 - Estudo Imuno-histoquímico

Para análise imuno-histoquímica foram selecionadas as amostras segundo os seguintes critérios: 1) maior área de carcinoma com o mais alto grau de Gleason

identificado; e 2) secções representando áreas que implicam estadiamento mais avançado tais como infiltração da vesícula seminal, extensão extracapsular e metástase para linfonodos.

Cortes seriados de 4µm de espessura foram obtidos dos espécimes de adenocarcinoma de próstata fixados em formol e emblocados em parafina. Para a realização da técnica imuno-histoquímica, foi utilizado o sistema polimérico EnVision™ (*Dako Corporation, Carpinteria, USA*) e os anticorpos primários (SHH e GLI1) foram incubados *overnight*, à temperatura de 4°C. As reações foram reveladas com diaminobenzidina. Os anticorpos, diluições, formas de recuperação antigênicas e controles positivos estão descritos na Tabela I.

Tabela I. Especificidade, clone, diluição, forma de recuperação antigênica, marca comercial dos anticorpos primários e controle das reações imuno-histoquímicas

Anticorpo	Recuperação antigênica	Tempo e forma de recuperação	Diluição	Controle
SHH	Citrato pH 6,0	Banho-maria, minutos	30 1:50	Carcinoma escamocelular
GLI1	Citrato pH 6,0	Banho-maria, minutos	30 1:50	Carcinoma escamocelular

V.4 - Análise Imuno-histoquímica

A metodologia adotada para os marcadores utilizados foi a descrição da localização da imunomarcção, citoplasmática e/ou nuclear, bem como o compartimento biológico do adenocarcinoma de próstata – estroma e/ou parênquima. Em seguida, foi realizada uma análise semi-quantitativa para essas proteínas, utilizando o seguinte critério: (0) Negativo- até 5% de células imunomarcadas; (1+) Discreta, entre 6-25% de células imunomarcadas; (2+) Moderada, entre 26-50% de células imunomarcadas; (3+) Intensa, mais de 50% de células imunomarcadas.

V.5 - Análise Estatística

Os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados organizado em planilhas do programa operacional *Microsoft Excel 2013*, no qual as variáveis de estudo foram categorizadas para fins comparativos e descritivos. A análise estatística foi realizada utilizando o *Software GraphPrism 5.0*. Todos os dados foram analisados segundo a distribuição na curva normal de Gauss e, a partir da análise estatística descritiva destes (Média, Mediana, Desvio Padrão, Curtose e Variância) foram aplicados testes paramétricos e não-paramétricos, a depender da distribuição simétrica ou assimétrica dos resultados.

Os testes estatísticos foram especialmente aplicados a fim de se observar se há associação entre o perfil de expressão de proteínas da via SHH e marcadores morfológicos de progressão dos carcinomas da próstata. A comparação entre grupos de variáveis contínuas foi feita através do teste não paramétrico de Mann-Whitney e a comparação entre grupos de variáveis categóricas foi feita através do teste exato de Fisher.

V.6 Considerações Éticas

O protocolo de pesquisa deste trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) com Seres Humanos do HUPES, cujo número do parecer é 326.094 e a data de aprovação foi 04 de Julho de 2013.

VI. RESULTADOS

As características das prostatectomias radicais (idade do paciente, PSA sérico pré-operatório, volume do tumor, Gleason primário ≥ 4 , Gleason total ≥ 7 , extensão extraprostática, comprometimento da margem circunferencial, comprometimento da margem uretral, comprometimento da margem vesical e infiltração da vesícula seminal) dos 28 casos provenientes do HUPES foram analisadas e suas médias com seus respectivos desvios padrão ou frequências com suas respectivas porcentagens foram calculadas como pode-se observar na tabela 1.

Tabela 1: Média e frequência das características das prostatectomias radicais provenientes do HUPES

CARACTERIZAÇÃO	MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO
	FREQUENCIA n/N (%)
Idade (anos)	65 \pm 7
PSA pré operatório (ng/dL)	10 \pm 7
Volume do tumor (mL)	4 \pm 14
Extensão extraprostática	13/28 (46,4)
Gleason primário ≥ 4	9/28 (32,1)
Gleason total ≥ 7	23/28 (64,4)
Comprometimento da margem circunferencial	11/28 (39,2)
Comprometimento da margem uretral	1/28 (3,6)
Comprometimento da margem vesical	1/28 (3,6)
Infiltração da vesícula seminal	7/28 (25,0)

HUPES: Hospital Universitário Prof. Edgard Santos

Na análise das lâminas histológicas, a expressão citoplasmática de SHH em mais de 50% das células do epitélio de glândulas benignas, neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIN) e no adenocarcinoma Gleason 3 e Gleason 4/5 foi de, respectivamente: 71%, 96%, 93% e 89% (Tabela 2) (Figura 1). A expressão nuclear de GLI1 em mais de 50% das células do epitélio de glândulas benignas, HGPIN, no adenocarcinoma Gleason 3 e Gleason 4/5 e em células estromais peritumorais foi de respectivamente: 50%, 83%, 76%, 72% e 68% (Tabela 3) (Figura 1). Logo, não há uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão epitelial de SHH e nuclear de GLI em próstata normal, HGPIN e adenocarcinomas Gleason 3 e 4/5. A expressão escore 3 de SHH ou GLI1 em componentes de baixo grau, alto grau ou no estroma não mostrou associação com volume do tumor, volume do tumor de alto grau, extensão extraprostática ou invasão das vesículas seminais (Tabela 4).

Tabela 2: Achados de expressão de genes de proteínas SHH da via SHH em tecido prostático benigno, focos de neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIN), adenocarcinomas Gleason 3 e 4/5 de 28 casos de prostatectomia radical

Pacientes	SHH Benignas	SHH HGPIN	SHH Gleason 3	SHH Gleason 4/5
1	2	3	3	3
2	3	3	3	3
3	3	3	3	3
4	3	3	1	2
5	3	3	3	99
6	3	3	3	3
7	3	3	3	3
8	3	3	3	99

¹ CONTINUA

Tabela 2. [continuação].

Pacientes	SHH Benignas	SHH HGPIIN	SHH Gleason 3	SHH Gleason 4/5
9	3	99	3	99
10	2	3	3	3
11	3	3	3	3
12	3	3	3	99
13	3	3	3	99
14	2	3	3	3
15	2	3	3	3
16	1	3	3	99
17	3	3	3	3
18	3	2	1	0
19	3	3	3	3
20	0	3	3	3
21	1	3	3	3
22	3	3	3	3
23	3	3	3	3
24	3	3	3	99
25	3	3	3	99
26	1	3	3	3
27	3	3	3	3
28	3	3	3	99

Tabela 3: Achados de expressão de genes de proteínas GLI1 da via SHH em tecido prostático benigno, focos de neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIN), adenocarcinomas Gleason 3 e 4/5 e estroma de 28 casos de prostatectomia radical.

Pacientes	GLI1 Benignas	GLI1 HGPIN	GLI1 Gleason 3	GLI1 Gleason 4/5	GLI1 Estroma
1	3	3	3	3	3
2	99	99	99	99	99
3	3	3	3	3	3
4	0	0	1	0	0
5	3	3	3	3	3
6	1	3	3	3	3
7	3	3	3	3	3
8	99	99	99	99	99
9	0	99	2	99	2
10	3	3	3	3	3
11	3	3	3	3	3
12	1	3	1	99	1
13	2	99	3	99	0
14	3	3	3	3	3
15	1	1	0	0	0
16	0	1	0	99	0
17	3	3	3	3	3
18	1	1	1	1	2

II

II CONTINUA

19	0	3	3	3	3
20	3	3	3	3	3
21	99	99	99	99	99
22	0	3	3	3	3
23	3	3	3	3	3
24	2	3	3	99	3
25	3	3	3	99	3
26	99	3	3	0	3
27	0	3	3	0	2
28	3	3	3	99	3

Tabela 4: Comparação entre grupos de pacientes estratificados por presença ou ausência de expressão 3+ de SHH e GLI1 em adenocarcinomas de próstata

	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO E FREQUÊNCIA n/N (%)			
	SHH (3+)	SHH (negativo, 1+ ou 2+)	GLI1 (3+)	GLI1 (negativo, 1+ ou 2+)
Idade (anos)	66 ± 8	60 ± 3	64 ± 7	62 ± 4
PSA (ng/dL)	10 ± 5	5*	12 ± 6	3 ± 2
Volume do tumor (mL)	4 ± 4	**	3 ± 3	6 ± 8
Extensão extraprostática	13/26 (50,0)	0/2 (0)	10/19 (52,6)	2/6 (33,3)
Gleason primário ≥ 4	7/26 (26,9)	2/2 (100)	4/19 (21,0)	3/6 (50)
Gleason total ≥ 7	21/26 (80,7)	2/2 (100)	17/19 (89,4)	4/6 (66,6)
Comprometimento da margem circunferencial	11/26 (42,3)	0/2 (0)	8/19 (42,1)	2/6 (23,3)
Comprometimento da margem uretral	1/26 (3,8)	0/2 (0)	1/19 (5,2)	0/6 (0)
Comprometimento da margem vesical	1/26 (3,8)	0/2 (0)	1/19 (5,2)	0/6 (0)
Infiltração da vesícula seminal	7/26 (26,9)	0/2 (0)	5/19 (26,3)	1/6 (16,6)

SHH: Sonic Hedgehog; GLI1: Glioma-associated oncogene 1

Nota: * apenas um caso, ** nenhum caso

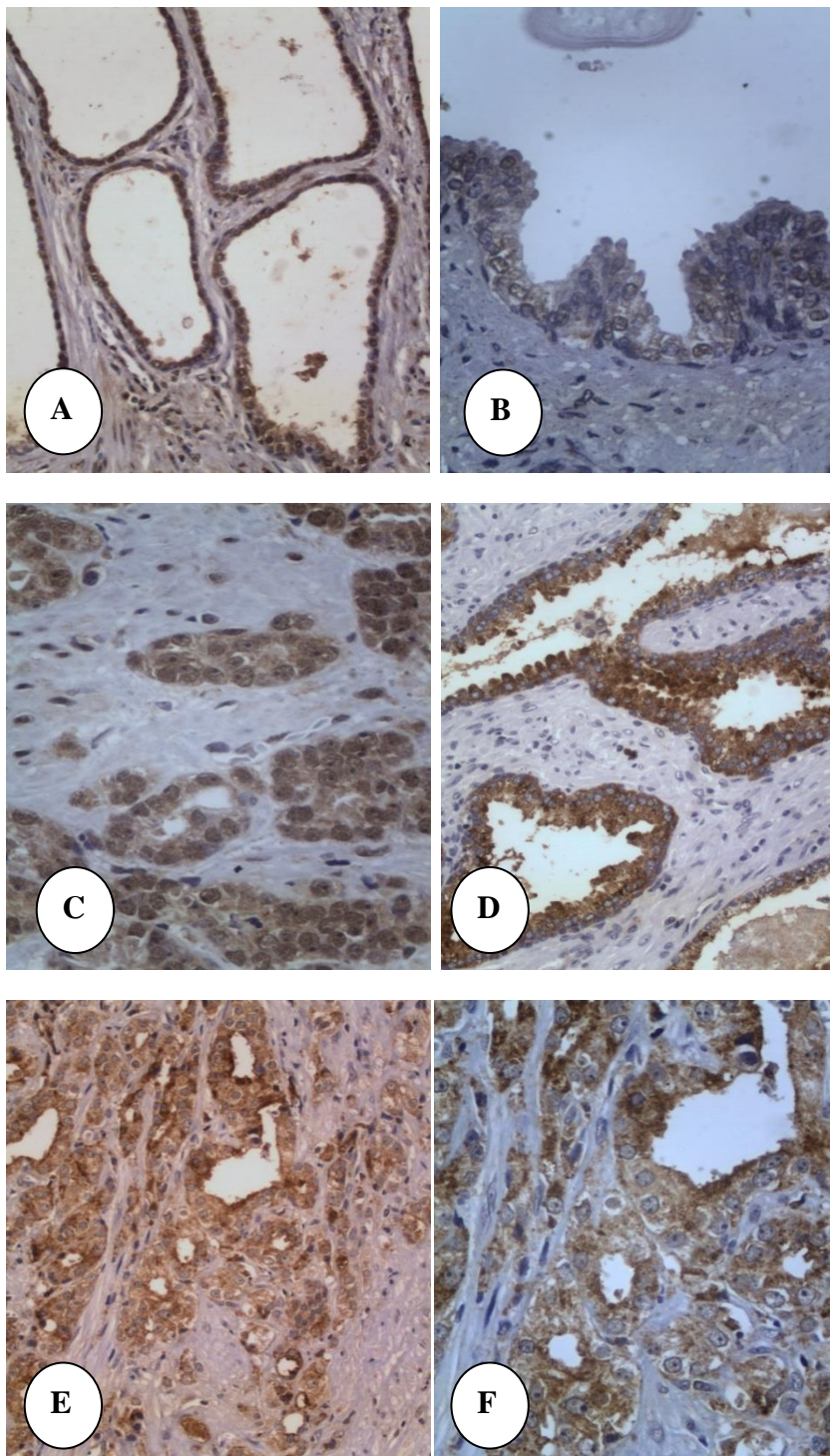


Figura 1: Exemplos de marcação nuclear do fator de transcrição GLI-1 em produtos de prostatectomia radical (A,B,C). (A) Epitélio atrófico de ácinos benignos (200x); (B) Foco de neoplasia intraepitelial de alto grau (400x); (C) Adenocarcinoma acinar Gleason 6 (3 + 3) (400x). Exemplos de marcação citoplasmática de SHH (D,E,F): (D) Epitélio de ácinos benignos normais (200x); (E) Adenocarcinoma acinar Gleason 6 (3 + 3) (200x); (F) Adenocarcinoma acinar Gleason 6 (3 + 3) (400x).

VII. DISCUSSÃO

A relação da via SHH com diversos tipos de câncer foi constatada por vários autores. Altaba *et al.* (2002), Datta & Datta (2006), Chari & McDonnell (2007) e Kim *et al.* (2011) descreveram a relação desta via com o carcinoma basocelular e meduloblastoma, câncer de pulmão, mama, esôfago, estômago, pâncreas e cólon. Diversos estudos, apontados adiante, relataram que a ativação da via SHH é importante na progressão do carcinoma de próstata, tem valor prognóstico e é um potencial alvo terapêutico. Nesta pesquisa, no entanto, não observamos diferença entre a expressão epitelial de SHH e nuclear de GLI1 em próstata normal, neoplasia intraepitelial de alto grau, câncer de próstata Gleason 3 e Gleason 4/5.

Karhadkar *et al.* (2004), através da análise por tempo real pela reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) revelaram um aumento significativo do nível de RNA mensageiro (mRNA) de PTCH em quatro linhagens de células tumorais (PC3, DU145, 22RV1 e LNCaP). Por este método, os autores também mostraram que células do epitélio prostático benigno não expressavam PTCH1 e GLI, que 15 amostras de 12 pacientes com tumores prostáticos metastáticos expressavam PTCH e GLI, e que apenas 3 de 12 amostras de tumores malignos locais tinham expressão destes componentes. Além disso, estes autores revelaram a influência da atividade da via SHH em células tumorais prostáticas através da comparação do tamanho do tumor da linhagem de células 22RV1 que superexpressavam GLI (22RV1-GLI) em relação àquelas que não tinham essa superexpressão (22RV1-Ctl), sendo que os tumores de células 22RV1-GLI cresceram mais do que aqueles de 22RV1-Ctl.

Sanchez *et al.* (2004) também utilizaram as linhagens LNCaP, DU145 e PC3 e relataram, também pela técnica de PCR, a expressão de GLI1 e PTCH1 em todas essas linhagens, mas apenas LNCaP e PC3 expressavam SHH em níveis detectáveis. Sheng *et al.* (2004), por sua vez, através da utilização de anticorpos anti PTCH, mostraram que há expressão de proteínas PTCH em câncer de próstata, e que essa quantidade aumenta em câncer com Gleason mais elevado, pois das amostras analisadas pelo autor, 73% dos cânceres com Gleason 8-10 expressavam PTCH enquanto que apenas 22% dos cânceres com Gleason 3-6 expressavam a proteína. Eles concluíram, pela técnica de análise imunohistoquímica, que há uma redução da expressão de SU(FU) no câncer de próstata

e que tal redução é ainda maior quanto maior for o Gleason, ou aumento da expressão do ligante SHH, ativando, de um jeito ou de outro a sinalização da via SHH.

Ainda pela análise imunohistoquímica, Kim *et al.* (2011) compararam a expressão de SHH, PTCH, SMO, GLI1 e SU(FU) em hiperplasia prostática benigna, em células estromais adjacentes às células tumorais e em células tumorais malignas. Nas células epiteliais benignas, a expressão de PTCH, GLI1 e SU(FU) foi positiva, porém fraca (1-25% de células positivas) e focalizada e a expressão de SHH e SMO foi negativa (<5% das células positivas); em células tumorais, a expressão das 5 proteínas foi forte (>51% de células positivas); mas nas células estromais adjacentes às células tumorais, a expressão de SU(FU) foi forte, porém ocasional, e a expressão de PTCH e GLI1 foi considerada rara. Além disso, estes autores relataram que a expressão de SHH em células tumorais foi significativamente associada com fatores prognóstico do câncer de próstata como o grau de Gleason, PSA pré-tratamento, estadiamento TNM (Tumor, Linfonodo e Metástase), estadiamento ASPG (grupos prognóstico/estadiamento anatômico) e com a recorrência de PSA. Eles também fizeram uma associação positiva da expressão de PTCH e GLI1 com o grau de Gleason >7, porém não acharam uma correlação significativa entre a perda da expressão de SU(FU) com o grau de Gleason ou a recorrência do PSA. Por sua vez, Sanchez *et al.* (2004) disseram que a expressão de SHH em tecidos prostáticos cancerosos é maior do que nos tecidos normais, mas não correlacionaram tal expressão com o grau de Gleason ou outros parâmetros clínicos.

Segundo Chiari & McDonnell (2007), há um aumento da expressão de SHH em células epiteliais e de PTCH e GLI1 em células mesenquimais no desenvolvimento do câncer de próstata. Em contrapartida, Data & Datta (2006) disseram que a expressão de SHH em células epiteliais e de PTCH e GLI1 em células mesenquimais ocorre em tecido prostático normal, mas que a sinalização autócrina, ou seja, todos esses componentes sendo expressos em células epiteliais, é característica de tecido tumoral.

Finalmente, autores como Karhadkar *et al.* (2004) e Sheng *et al.* (2004), mostraram como a ciclopamina, inibidor da proteínas transmembrana SMO, é capaz de inativar a via SHH, e conseqüentemente diminuir a proliferação celular, diminuir a capacidade de invasão do tumor e aumentar a capacidade de apoptose das células tumorais.

Essas observações, no entanto, não foram reproduzidas em nossa série. Nosso estudo tem algumas limitações que podem explicar as discrepâncias em relação aos estudos prévios. As áreas de ácinos benignos e neoplasia intraepitelial estudadas concentram-se naquelas localizadas na periferia de focos de adenocarcinomas acinares (as secções selecionadas foram as com focos mais extensos de carcinoma invasivo). Assim, os ácinos morfolologicamente normais e os focos de neoplasia intraepitelial podem ser geneticamente diferentes destas mesmas áreas em próstatas sem câncer. Áreas normais já com ativação de oncogenes podem representar um processo conhecido como malignização de área (field cancerization). A obtenção de amostras de próstata normal é complicada – a princípio poderiam ser obtidas de necrópsias mas, nestes casos, o tempo de demora entre óbito e fixação seria um fator a ser considerado em estudos de imunexpressão. Como perspectiva, temos por objetivo estudar amostras de pacientes com hiperplasia nodular da próstata: uma condição benigna na qual há escassa literatura sobre o papel da via SHH. Por outro lado, a literatura com dados positivos no que se refere a via SHH e progressão do câncer de próstata pode também representar o reconhecido viés de que dados positivos são publicados e amplamente divulgados enquanto dados negativos em estudos de reprodução (validação) frequentemente são pouco divulgados e publicados.

O pequeno número amostral também se apresenta como uma limitação. Inicialmente, projetamos estudar 183 prostatectomias radicais, no entanto, a expressão consistentemente positiva em tecidos benignos, neplasias intraepiteliais de alto grau e tumores malignos nos estimulou relatar os resultados com estes dados, que contrastam com os da literatura. Como perspectiva pretendemos utilizar recursos e materiais disponíveis para testar outros potenciais marcadores, tais como marcadores de angiogênese e proliferação celular.

Uma outra característica peculiar do estudo é que as prostatectomias radicais são majoritariamente de pacientes de alto risco. O estudo não foi a princípio projetado para seleção preferencial de pacientes de alto risco, no entanto, esta é a realidade da casuística do HUPES. Temos como objetivo futuro estudar também produtos de prostatectomia radical provenientes de laboratórios privados, que possuem uma maior frequência de lâminas histológicas de adenocarcinomas prostáticos de baixo risco.

Futuramente, pretendemos pesquisar a expressão de outras proteínas da via SHH, como PTCH, SMO e SU(FU) por exemplo, e compará-la entre amostras de próstata normal, hiperplasia prostática benigna, adenocarcinomas Gleason 3 e Gleason 4/5 e focos de adenocarcinoma de próstata metastático.

VIII. CONCLUSÃO

Não há diferença na expressão de SHH e do fator nuclear de GLI1 entre o adenocarcinoma de próstata e a neoplasia intraepitelial de alto grau ou ácinos benignos. Estes resultados divergem de outros trabalhos na literatura que sugerem relação entre a hiperativação da via SHH e a progressão do carcinoma de próstata.

IX. SUMMARY

STUDY OF SONIC HEDGEHOG PATHWAY (SHH) IN PROSTATE

CARCINOMAS. Introduction: Prostate carcinoma is one of the priority diseases of the Ministry of Health in our country and constitutes a public health problem, especially with regard to high rates of morbidity and mortality for patients affected by the disease.

Therefore, understanding the factors that may be associated with the progression of the disease represents an important strategy for understanding the tumor biology and thus facilitating studies which signal forms to inhibit the progression of the disease.

Objective: Evaluating the expression profile of proteins of the SHH pathway in prostate carcinomas in order to contribute to the knowledge on the pathogenesis and biological behavior of this tumor.

Methodology: From radical prostatectomies processed according to the same protocol, we made a histological and immunohistochemical study in order to prove the influence of the Sonic Hedgehog pathway in prostate carcinomas.

Results: There was no statistically significant difference between the epithelial expression of SHH and nuclear expression of GLI in normal prostate, benign prostatic hyperplasia and Gleason 3 and Gleason 4/5 adenocarcinoma.

Discussion: It has been shown in various studies the relationship between the SHH pathway and many cancers, but the relationship of this pathway with prostate cancer is uncertain, since the results of the research are very divergent.

Conclusion: There is no relationship between the expression of SHH and GLI1 and prostate cancer.

Key words: 1. SHH protein, human; 2. Prostatic Neoplasms

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chari NS, McDonnell TJ. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. *Advances in anatomic pathology* 2007 Sep;14(5):344-52.
2. Datta S, Datta MW. Sonic Hedgehog signaling in advanced prostate cancer. *Cellular and molecular life sciences CMLS* 2006 Feb; 63(4):435-48.
3. Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A.(Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. IARC Press: Lyon 2004
4. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 1993 Dec 31; 75(7):1417-30.
5. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil*. Brasil: INCA; 2013.
6. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004 Oct 7;431(7009):707-12.
7. Kim TJ, Lee JY, Hwang TK, Kang CS, Choi YJ. Hedgehog signaling protein expression and its association with prognostic parameters in prostate cancer: a retrospective study from the view point of new 2010 anatomic stage/prognostic groups. *Journal of surgical oncology* 2011 Oct;104(5):472-9.
8. Kristiansen G. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. *Histopathology* 2012 Jan;60(1):125-41.
9. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010
10. Organização Mundial da Saúde. *International Agency for Research on Cancer* . Lyon: WHO; 2008.
11. Riobo NA, Lu K, Emerson CP Jr. Hedgehog signal transduction: signal integration and cross talk in development and cancer. *Cell cycle* 2006 Aug; 5(15):1612-5.
12. Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nature reviews Cancer* 2002 May; 2(5):361-72.
13. Sanchez P, Clement V, Ruiz i Altaba A. Therapeutic targeting of the Hedgehog-GLI pathway in prostate cancer. *Cancer research* 2005 Apr 15;65(8):2990-2.

14. Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, et al. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Aug 24; 101(34):12561-6.
15. Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, et al. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Molecular cancer* 2004 Oct 13;3:29.

XI. ANEXOS

ANEXO 1.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da via de sinalização Sonic Hedgehog em carcinomas da próstata, do cólon e da mama.

Pesquisador: Daniel Abensur Athanazio

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13509213.7.0000.0049

Instituição Proponente: Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 326.094

Data da Relatoria: 05/06/2013

Apresentação do Projeto:

Os carcinomas da próstata, mama e intestino grosso estão entre as neoplasias malignas mais incidentes em países desenvolvidos e no Brasil. Recentemente, a via Sonic Hedgehog (SHH) foi descrita como importante na orgagênese da próstata e na progressão do carcinoma prostático. Modelos in vitro e animal sugerem o uso da via SHH como potencial alvo de inibição. A associação da ativação da via em amostras de peças cirúrgicas radicais, no entanto, é restrita a poucos estudos que são limitados pela ausência de avaliação de marcadores morfológicos tradicionais de progressão destas neoplasias. Propomos a avaliação da expressão de genes da via SHH em cinquenta produtos de peças de cirurgia radical para investigar a possível associação com marcadores morfológicos de progressão da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar o perfil de expressão de proteínas da via SHH em carcinomas da próstata, do cólon e da mama; a fim de contribuir para o conhecimento sobre a patogênese e comportamento biológico deste tumor.

Objetivo Secundário

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS- UFBA -
HUPES



Continuação do Parecer: 326.094

Avaliar a imunexpressão e imunolocalização de componentes da via SHH em carcinomas da próstata, do cólon e da mama;

- Avaliar a associação entre a expressão de componentes da via SHH com marcadores morfológicos de progressão nos carcinomas da próstata, do cólon e da mama.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há risco para a integridade física dos pacientes os quais tiveram amostra histológica analisada. Entretanto, há risco de quebra da confidencialidade dos dados, presentes em prontuário, dos pacientes avaliados.

Benefícios:

Não há benefício direto aos pacientes os quais tiveram amostra histológica analisada. O benefício consiste na contribuição científica para a compreensão da biologia dos carcinomas de mama, próstata e cólon/reto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protocolo apresenta objetivos, fundamentação, delineamento, e instrumentos adequados. Tema é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados e adequados.

Recomendações:

Aprovar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Item de pendência 1: No Regimento Interno do Biorepositório consta que "Todo o material vinculado ao Biorepositório do projeto deverá ser, necessariamente, acompanhado dos dados clínicos obtidos no prontuário do paciente, sendo as informações armazenadas e individualizadas no banco de dados do projeto", assim como no protocolo de pesquisa gerado na Plataforma Brasil prevê "Revisão de dados de prontuário e estudo imunoistoquímico do bloco histológico arquivado", entretanto no protocolo de pesquisa, item 4.2, página 33, foi apresentado que "Os casos estudados neste projeto serão obtidos a partir do arquivo de laudos, blocos e lâminas do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas Professor Edgard Santos (HUPES)". Solicito esclarecimentos sobre se haverá consulta aos prontuários, físicos ou virtual, dos pacientes envolvidos. Em caso afirmativo, apresentar a carta de anuência do SAME.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

Bairro: Canela

CEP: 40.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8043

Fax: (71)3283-8140

E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS- UFBA
- HUPES



Continuação do Parecer: 326.094

RESPOSTA: Pendência atendida

Item de pendência 2: O Regimento do Biorepositório, página 2, apresenta a última frase inacabada. Solicito a apresentação do documento na íntegra para avaliação.

RESPOSTA: Pendência atendida

Item de pendência 3: No protocolo de pesquisa gerado pela Plataforma Brasil consta que não haverá armazenamento de amostras, entretanto há Biorrepositório vinculado ao projeto de pesquisa. Solicito adequação do projeto na Plataforma Brasil.

RESPOSTA: Pendência atendida

Item de pendência 4: No tópico "Impactos/Contribuições Científicas", página 38, é citado "A aprovação deste projeto, dessa forma, permitirá o fortalecimento do intercâmbio científico entre o CPqGM (FIOCRUZ) e Universidade Federal da Bahia, consolidando ações acadêmicas interinstitucionais e contribuindo para a formação de recursos humanos, em especial alunos de graduação e pós-graduação. Cabe ressaltar, que o proponente é orientador de iniciação científica e do(sic) Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana (UFBA/FIOCRUZ). Os resultados obtidos com este projeto contribuirão para uma tese de doutoramento na referida pós-graduação". Solicito esclarecimentos acerca da função do CPqGM no projeto e, se tratar de coparticipação na pesquisa, apresentar a carta de anuência do CPqGM.

RESPOSTA: Pendência atendida

Item de pendência 5: No protocolo de pesquisa gerado pela Plataforma Brasil consta que o financiamento será próprio. Entretanto, no item "Recursos físicos, materiais e humanos disponíveis", página 41, é citado "Parte do projeto, referente ao estudo da via de sinalização SHH em carcinomas da próstata, foi recentemente contemplado no Edital Universal do CNPq processo 474596/2012-5" totalizando R\$34.000,00 e que "a equipe executora buscará financiamentos adicionais em outras agências de fomento".

RESPOSTA: Pendência atendida

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

Bairro: Canela

CEP: 40.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8043

Fax: (71)3283-8140

E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS- UFBA -
HUPES



Continuação do Parecer: 326.094

Considerações Finais a critério do CEP:

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ____/____/____ e ao término do estudo.

Situação: Projeto Aprovado.

SALVADOR, 04 de Julho de 2013

**Assinador por: Roberto José
da Silva Badaró
(Coordenador)**

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela **CEP:** 40.110-060
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 **Fax:** (71)3283-8140 **E-mail:** cep.hupes@gmail.com

