



INFLUÊNCIA DA DURAÇÃO DA TERAPIA DE PRIVAÇÃO ANDROGÊNICA SOBRE A AGRESSIVIDADE DE TUMORES NEUROENDÓCRINOS EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE CÂNCER DE PRÓSTATA

Palavras-Chave: CASTRAÇÃO CIRÚRGICA, FENÓTIPO NEUROENDÓCRINO, TRAMP

Autores(as):

JAQUELINE DE SOUZA GIANCHETTO, IB – UNICAMP

BIANCA BARBOSA REZENDE, IB – UNICAMP

Profa. Dra. VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON, IB – UNICAMP

Prof. Dr. FABIO MONTICO (orientador), IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O câncer de próstata (CaP) recorrente ou metastático possui como principal tratamento a terapia de privação androgênica (ADT), também designada como castração terapêutica¹. Em cerca de 35% dos pacientes submetidos a ADT, após um intervalo de 12 a 24 meses de resposta positiva ao tratamento, a doença progride para o chamado câncer de próstata resistente à castração (CPRC), uma forma agressiva da doença, que não possui tratamento e por isso progride e metastiza, tornando-se letal para o indivíduo². A resistência à castração tem sido relacionada à emergência de tumores prostáticos neuroendócrinos, uma vez que as células neuroendócrinas presentes no epitélio prostático se caracterizam pela insensibilidade hormonal, devido à expressão ausente de receptores de andrógeno (AR)³. Tal fato já foi observado no modelo transgênico de adenocarcinoma da próstata de camundongo (TRAMP) após ablação androgênica realizada via castração cirúrgica, condição em que ocorreu rápido desenvolvimento de tumores pouco diferenciados, altamente proliferativos e positivos para marcadores neuroendócrinos^{4,5}. Contudo, embora o compartimento epitelial neuroendócrino possa estar associado ao desenvolvimento do CPRC, a associação entre a privação hormonal e a emergência do câncer de próstata neuroendócrino (NEPC) é assunto discutido na literatura especializada. Dúvidas persistem sobre em que grau o NEPC é dependente do *status* hormonal das lesões ou da progressão da doença no modelo TRAMP, emergindo de forma intrínseca e invariável nos estágios mais avançados, mesmo na presença de andrógenos. Dessa forma, o presente trabalho buscou investigar a relação entre a emergência do fenótipo neuroendócrino e o CPRC em camundongos TRAMP em diferentes períodos da vida, com o intuito de confirmar o comportamento refratário a hormônios desse fenótipo e de se obter um panorama temporal da evolução do NEPC, contribuindo assim para o delineamento experimental de futuros estudos.

METODOLOGIA:

Camundongos machos da linhagem TRAMP (CEUA 6037-1/2022) foram submetidos à orquiectomia bilateral (TRCAS) ou à simulação de castração cirúrgica (TRCON) ao atingirem as idades de 12, 16 e 22 semanas. Após 6

semanas, os animais foram eutanasiados e amostras da próstata dorsolateral foram coletadas para análise histopatológica sob microscopia de luz e imunohistoquímica para PCNA (ab29) (Abcam), Sinaptofisina (ab32127) (Abcam) e Cromogranina A (ab45138) (Abcam). Adicionalmente, incluiu-se um grupo de ablação androgênica prolongada, no qual os animais foram submetidos à castração ou à simulação do procedimento a partir de 12 semanas de idade, sendo então eutanasiados após 10 semanas. A incidência de tumores macroscópicos nos diversos lobos prostáticos também foi contabilizada para os diferentes grupos experimentais. A análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey foi utilizada para comparação entre médias de dados paramétricos, ao passo que valores com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A incidência de tumores macroscópicos e a comparação entre as proporções dos diversos parâmetros morfológicos epiteliais nos grupos experimentais foram analisadas pelo teste ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% e expressas como média \pm desvio padrão^{6,7}.

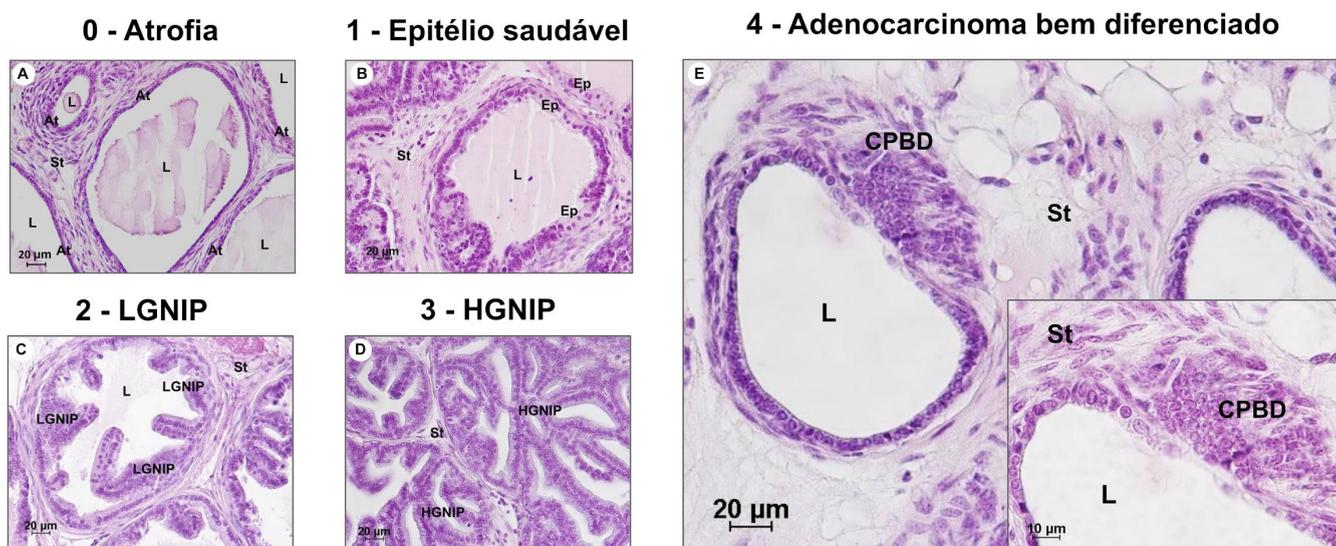


Figura 1. Análise histopatológica. Os aspectos morfológicos presentes no epitélio foram graduados de acordo com a seguinte escala: 0 - Atrofia (At); 1 - Epitélio saudável (Ep); 2 - Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGNIP); 3 - Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGNI); 4 - Adenocarcinoma bem diferenciado (CPBD). O diagnóstico das lesões prostáticas realizado foi baseado em critérios morfológicos de acordo com Gingrich *et al.* (1999) e Billis (2003)^{8,9}. St: estroma; L: lúmen.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Embora a atrofia epitelial tenha sido a lesão predominante, refletindo marcante queda nos níveis de andrógenos, todos os grupos castrados apresentaram um padrão bastante semelhante de distribuição das lesões, indicando que a castração, independentemente do período e da duração em que é realizada, não afeta a proporção dos diferentes tipos de parâmetros epiteliais quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo experimental (Tabela 1; Fig. 2). Contudo, se realizada por períodos prolongados, a castração pode interferir na agressividade dos tumores macroscópicos, uma vez que o grupo TRCAS 12-22 foi o único a apresentar incidência de tumores em todos os lobos prostáticos significativamente maior do que a de tumores restritos a um ou dois lobos, portanto menos agressivos, o que reforçou o efeito nocivo da depleção hormonal prolongada no modelo TRAMP, conforme demonstrado em estudos anteriores (Fig. 3). Sendo assim, apesar de todos os tumores macroscópicos encontrados apresentarem marcação positiva para cromogranina A e sinaptofisina (Fig. 4), demonstrando o desenvolvimento do fenótipo neuroendócrino independentemente da idade de castração e também na presença de andrógenos, notou-se

que a ablação hormonal, especialmente por períodos prolongados, estimulou o desenvolvimento de tumores neuroendócrinos de perfil mais agressivo.

Adicionalmente, apesar de não ter afetado a proporção entre os diversos parâmetros epiteliais nos grupos experimentais, é notável que a castração realizada mais precocemente foi mais eficiente em interromper e/ou desacelerar a progressão das lesões microscópicas no modelo TRAMP, uma vez que o grupo TRCAS 12-18 foi o único a apresentar diminuição significativa de ambos os graus de lesões pré-malignas (LGNIP e HGNI), precursoras do adenocarcinoma *in situ*, com simultâneo acréscimo das áreas de atrofia epitelial (Figs. 2A, 2C, 2D e 2G). Todavia, ainda que a intervenção precoce tenha afetado a incidência de lesões prostáticas pré-malignas, verificou-se que os grupos castrados apresentaram focos de intensa proliferação celular epitelial (Fig. 5), além de incidências de focos de adenocarcinoma estatisticamente semelhantes aos respectivos grupos controle (Fig. 2E). Nesse cenário, considerando que essas lesões malignas se desenvolveram em um microambiente de privação androgênica e que, concomitantemente, os focos de HGNI apresentaram incidência significativamente menor em todos os grupos castrados (Fig. 2D), é possível sugerir que tais lesões constituem focos de CPRC com origem independente da progressão de lesões prostáticas pré-malignas.

Tabela 1. Distribuição das incidências dos diferentes aspectos morfológicos do epitélio secretor na próstata dorsolateral dos grupos experimentais.

Grupos	Aspectos Morfológicos				
	Atrofia	Epitélio Saudável	LGNIP	HGNI	CPBD
TRCON 12-18	0,57 ± 0,57	15,12 ± 5,26	46,2 ± 2,46	35,33 ± 3,54	2,78 ± 1,05
TRCAS 12-18	61,77 ± 3,18 **	1,69 ± 1,11 *	33,83 ± 1,49	0,97 ± 0,36 *	1,74 ± 0,46
TRCON 12-22	4,12 ± 3,01	15,68 ± 3,06	48,66 ± 5,92	30,02 ± 2,46	1,52 ± 0,91
TRCAS 12-22	53,18 ± 5,31	4,10 ± 2,23	38,72 ± 3,74	1,04 ± 1,04	2,97 ± 1,10
TRCON 16-22	0,82 ± 0,81	12,05 ± 3,65	50,70 ± 2,67	32,06 ± 6,51	4,38 ± 1,91
TRCAS 16-22	58,77 ± 2,80 *	3,84 ± 1,53	35,78 ± 3,02	0,42 ± 0,41*	1,19 ± 0,62
TRCON 22-28	0,00 ± 0,00	3,26 ± 1,30	58,39 ± 4,68	34,83 ± 3,64	3,52 ± 1,48
TRCAS 22-28	57,30 ± 2,12	3,16 ± 1,56	38,81 ± 0,99	0,28 ± 0,28 *	0,47 ± 0,30

Asteriscos indicam diferença estatística significativa em relação ao respectivo grupo controle (* = p<0,05; ** = p<0,01).

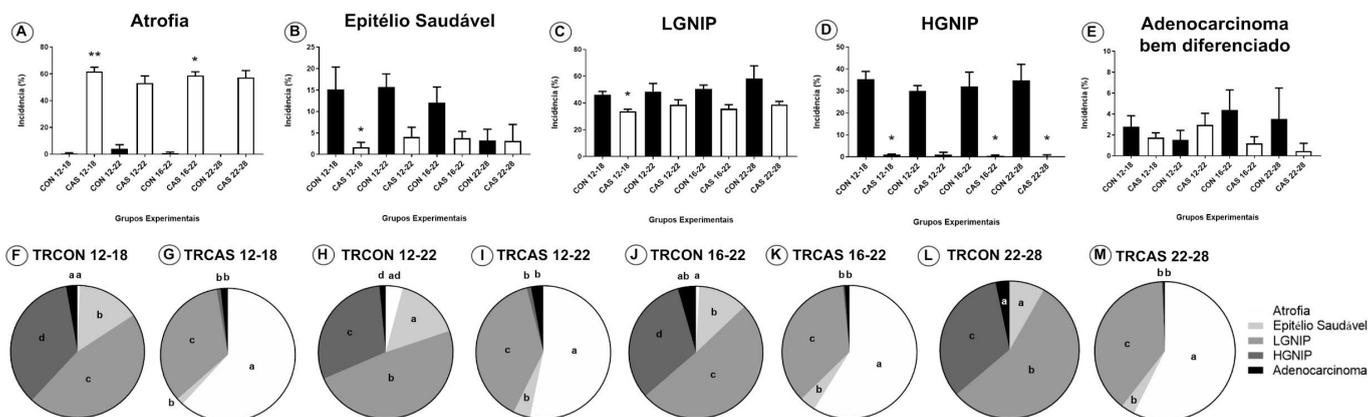


Figura 2. Resultados da análise histopatológica. **(A-E)** Gráficos de incidência dos aspectos morfológicos nos diferentes grupos experimentais. Asteriscos indicam diferença estatística significativa entre dois grupos (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). **(F-M)** Gráfico de proporção dos diferentes aspectos morfológicos considerando cada grupo experimental individualmente. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre dois aspectos do epitélio prostático.

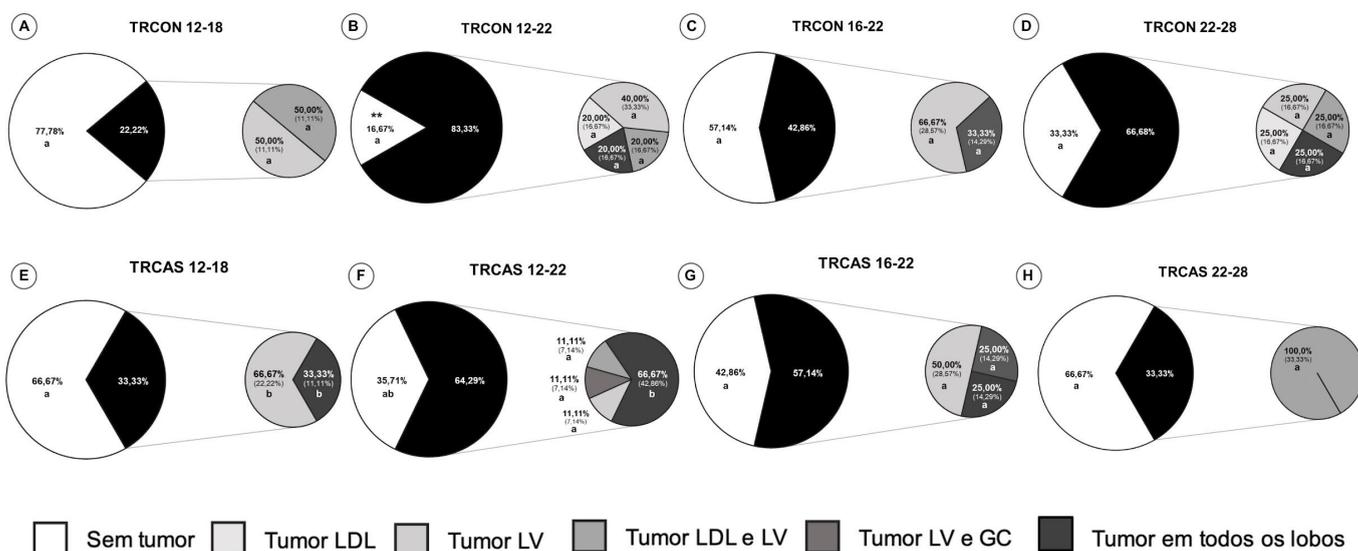


Figura 3. Incidência de tumores macroscópicos nos diferentes lobos da próstata de camundongos TRAMP dos diferentes grupos experimentais. Nos gráficos menores, as porcentagens apresentadas entre parênteses indicam a proporção de animais com cada tipo de tumor em relação ao número total de animais no grupo (com e sem tumor), ao passo que as demais indicam a proporção de cada tipo tumoral considerando-se o apenas o total de animais do grupo com tumores macroscópicos. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre as proporções de cada tipo tumoral em determinado grupo experimental específico. Asteriscos indicam diferença estatística significativa em relação à proporção de animais sem tumores macroscópicos no grupo TRCON 12-18 (** = $p < 0,01$).

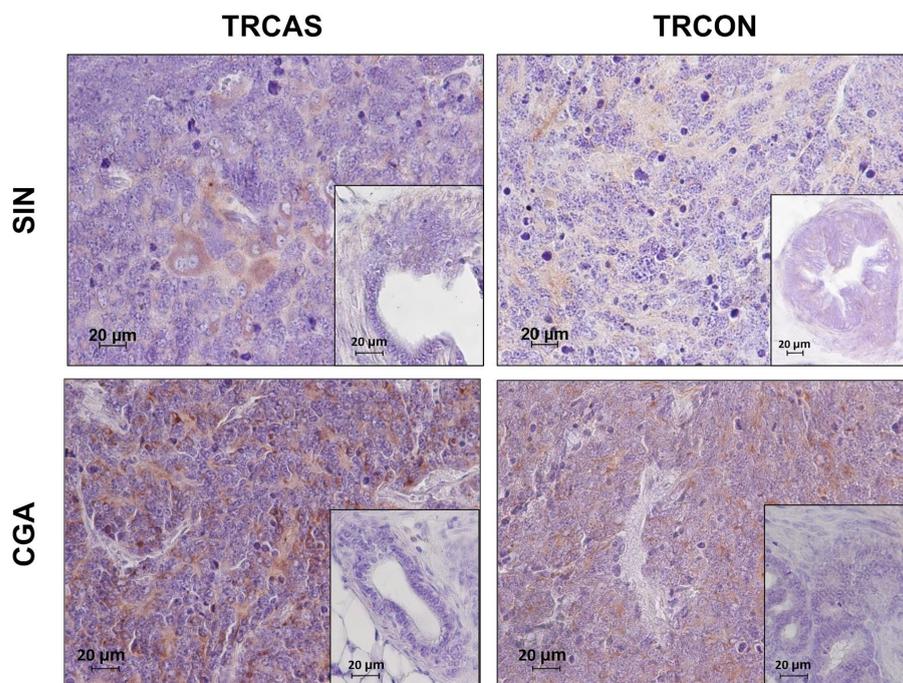


Figura 4. Positividade dos tumores macroscópicos dos diferentes grupos experimentais para sinaptofisina (SIN) e cromogranina A (CGA). As figuras menores demonstram a ausência de imunomarcação nos focos de adenocarcinoma *in situ*.

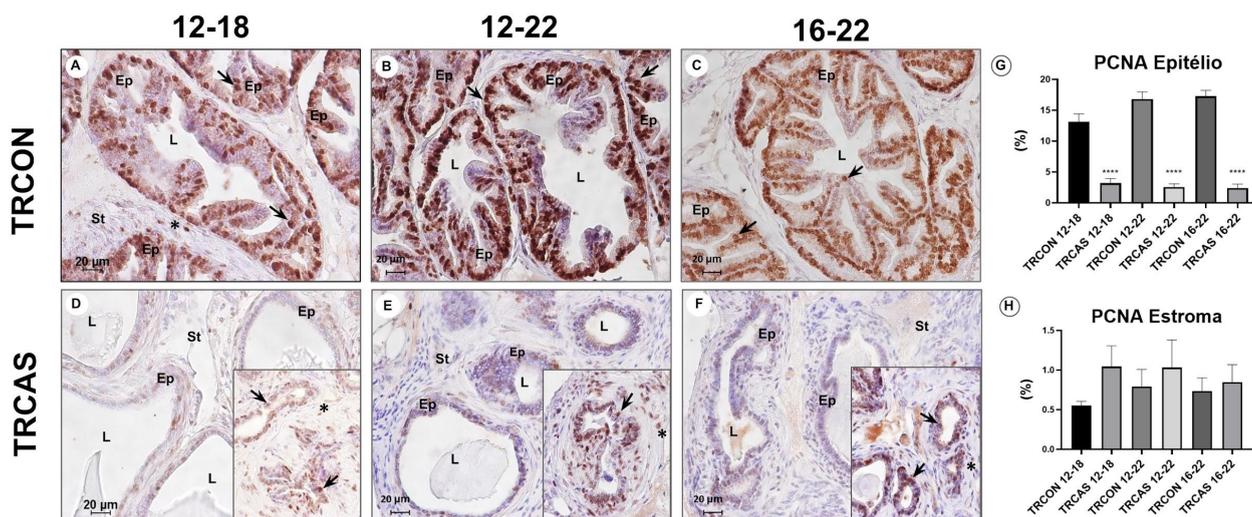


Figura 5. Imunolocalização e porcentagens da reatividade de PCNA no núcleo das células epiteliais e estromais da próstata dorsolateral dos grupos experimentais 12-18, 12-22 e 16-22. A análise do grupo 22-28 está em andamento. Pontos de imunolocalização positiva estão indicados por setas no epitélio e asterisco no estroma. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P < 0,0001$). Ep: epitélio; St: estroma; L: lúmen.

CONCLUSÕES:

Os achados indicam que a castração, se realizada através de uma abordagem precoce e de curta duração, é capaz de interromper ou desacelerar o desenvolvimento de lesões pré-malignas no modelo TRAMP de forma mais eficiente. No entanto, a ablação hormonal em nenhuma das faixas etárias e/ou intervalos de tempo foi capaz de impedir a emergência de focos de adenocarcinoma de próstata *in situ*, demonstrando que estes podem surgir em animais castrados de maneira independente da progressão de lesões pré-malignas. Por fim, os presentes resultados evidenciaram a influência crucial da duração do período de depleção hormonal sobre a agressividade dos tumores neuroendócrinos no modelo TRAMP, possivelmente em decorrência da maior expansão clonal de células tumorais com fenótipo neuroendócrino em condições de ablação androgênica prolongada.

BIBLIOGRAFIA

1. WANG, G. *et al.* Genetics and biology of prostate cancer. **Genes & Development** v. 32, n° 17-18, p. 1105-1140, 2018.
2. KIRBY, M. *et al.* Characterizing the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. **Int J Clin Pract** v. 65, n. 11, p. 1180-92, 2011.
3. HUSS, WJ. *et al.* Origin of androgen-insensitive poorly differentiated tumors in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. **Neoplasia** v. 9, n. 11, p. 938-50, 2007.
4. KAPLAN-LEFKO, PJ. *et al.* Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. **Prostate** v. 55, n. 3, p. 219-37, 2003.
5. JOHNSON, MA. *et al.* Castration triggers growth of previously static androgen-independent lesions in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. **Prostate** v. 62, n. 4, p. 322-38, 2005
6. MONTGOMERY, DC. **Design and Analysis of Experiments**. 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991.
7. ZAR, JH. **Biostatistical analysis**. 4th edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1999.
8. GINGRICH JR. *et al.* Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v. 2, n. 2, p. 70-75, 1999.
9. BILLIS, A. **Patologia cirúrgica da próstata**. Impressão Digital do Brasil Gráfica e Editora Ltda. Campinas, 2003.