

## Artigos Originais

# O eixo EGF e o Cancro da Próstata. O Epidermal Growth Factor (EGF) - Experiência clínica

Francisco Madeira Pina<sup>1</sup>, Maria Gabriela Figueiredo<sup>2</sup>, Nuno Lunet<sup>3</sup>, Frederico Reis<sup>4</sup>, Hélder Castro<sup>4</sup>, Francisco Cruz<sup>5</sup>, Henrique Barros<sup>6</sup>

- 1 Chefe de Serviço – Serviço de Urologia do H. S. João do Porto  
Assistente Convidado de Urologia – F.M.U.P.
- 2 Licenciatura em Farmácia – Análises Clínicas, da F. Farmácia U.P.  
Assistente Principal – Serviço de Imunologia do H. S. João do Porto
- 3 Mestre em Saúde Pública, Doutor em Saúde Pública  
Professor Auxiliar Convidado – Serviço de Higiene e Epidemiologia - F.M.U.P.
- 4 Licenciatura em Medicina – F.M.U.P.  
Assistente Hospitalar – Serviço de Urologia do H. S. João do Porto
- 5 Director de Serviço – Serviço de Urologia do H. S. João do Porto  
Professor Titular de Urologia – F.M.U.P.
- 6 Director de Serviço – Serviço de Higiene e Epidemiologia da F.M.U.P.  
Professor Catedrático de Epidemiologia – F.M.U.P.

**Correspondência:** Francisco Madeira Pina - Rua dos Fogueteiros n° 517, 4° Esq, Custóias, 4460-725, Matosinhos  
- Telefone: 964065644, 229521877 - Fax: 229521877 - E-mail: madeirapina@gmail.com

## Resumo

O epidermal growth factor (EGF) é um dos principais ligantes do Eixo EGF de activação parácrina e autócrina da próstata, privilegiando a estimulação da migração celular no carcinoma da próstata (CP) metastisado, especialmente em fase de androgéneo-insensibilidade. Os estudos sobre o EGF nos líquidos biológicos do homem são escassos e baseados em amostras pequenas, não se tendo objectivado diferenças de níveis no plasma entre CP e controlos saudáveis, nem diferenças de valores no líquido prostático entre grupos de estádios ou de graus de Gleason diferentes.

Decidimos analisar o comportamento do EGF sérico em doentes com CP, descrevendo os valores obtidos em função de diferentes indicadores de prognóstico.

Foram avaliados 103 doentes com CP não tratado, tendo 47 deles realizado posteriormente prostatectomia radical (PR). Foi efectuada a medição de EGF no soro por ELISA (determinações duplas) com anticorpo monoclonal humano EGF (DEG 00, Quantikine™/RD Systems).

O EGF foi detectável em todos os casos, com uma mediana de 662,8 pg/ml, sendo os valores superiores a 622 pg/ml (o valor mais alto comunicado no teste comercial) em 53,3% dos casos. Não se observaram diferenças significativas nas medianas de EGF no soro entre os diferentes grupos de prognóstico clínico de estádio cTNM (cancros localizados vs. metastizados: 634,8 pg/ml vs. 685,2 pg/ml, p=0,92), de grau de Gleason

na Biópsia Prostática (cancros bem diferenciados vs. mal diferenciados: 673,0 pg/ml vs. 711,6 pg/ml,  $p=0,41$ ), de PSA total ( $\leq 10,0$  vs.  $\geq 50,1$  ng/ml: 676,0 pg/ml vs. 593,4 pg/ml,  $p=0,35$ ), ou de Razão de PSA l/t para casos com PSA<sub>t</sub> < 10 ng/ml ( $R < 0,26$  vs.  $R \geq 0,26$ : 662,8 pg/ml vs. 862,0 pg/ml,  $p=0,07$ ). Nos casos tratados com PR também não se observaram diferenças significativas entre os grupos de prognóstico D'AMICO (grupo 1 vs. grupo 3: 612,8 pg/ml vs. 667,4 pg/ml,  $p=0,90$ ).

O EGF no soro não mostrou capacidade discriminativa da agressividade tumoral, medida pelos estádios clínico ou patológico, pela diferenciação histológica, pelos valores de PSA total ou pela agregação de factores de risco de recidiva/progressão (classificação D'AMICO).

## Abstract

Epidermal Growth Factor (EGF) is one of the most important ligands of the EGF axis of prostate paracrine and autocrine activations, with privilege stimulation of cellular migration on metastatic prostate cancer (PC), particularly under androgen-insensibility status. Previous studies on human biologic liquids, relying in small samples, could not show differences in EGF plasma levels between PC patients and controls, or different EGF prostate secretion levels among PC staging or Gleason score groups.

We analysed serum EGF behaviour on PC patients, describing EGF levels according to different prognostic factors.

Serum EGF levels were evaluated by ELISA (duplicate essays) with human EGF monoclonal antibody (DEG 00, Quantikine™/RD Systems), in 103 untreated PC patients, from which 47 underwent radical prostatectomy (RP) latter on.

EGF was detectable in all patients (median of 662.8 pg/ml), with 53.3% presenting levels >622 pg/ml (the highest level described by the test manufacturers). No significant differences were observed in the median EGF levels between cTNM stages (localized vs. metastatic: 634.8 pg/ml vs. 685.2 pg/ml,  $p=0.92$ ), biopsy Gleason score (well differentiated vs. bad differentiated: 673.0 pg/ml vs. 711.6 pg/ml,  $p=0.41$ ), total PSA ( $\leq 10.0$  vs.  $\geq 50.1$  ng/ml: 676.0 pg/ml vs. 593.4 pg/ml,  $p=0.35$ ), or f/t PSA ratio, in cases with total PSA < 10 ng/ml (ratio < 0.26 vs. ratio  $\geq 0.26$ : 662.8 pg/ml vs. 862.0 pg/ml,  $p=0.07$ ). In cases subsequently treated by RP no significant differences were observed also for D'AMICO prognostic groups (group 1 vs. group 3: 612.8 pg/ml vs. 667.4 pg/ml,  $p=0.90$ ).

Serum EGF was not able to distinguish tumour aggressiveness, measured by clinical or pathological staging, histological differentiation, base-line total PSA risk groups or by recurrence/progression risk factors aggregation (D'AMICO classification).

## Introdução

O epidermal growth factor (EGF) partilha com vários outros ligantes, nomeadamente com o transforming growth factor-alfa (TGF- $\alpha$ ), o receptor EGF-R, no âmbito do Eixo EGF de activação parácrina e autócrina da próstata, apresentando concentrações tecidulares evidentes nas secreções prostáticas, das vesículas seminais, e na urina (1-7).

Dentro das funções biológicas do EGF realçamos a sua capacidade mitogénica, a indução de

malignização e migração celular epitelial, e a promoção da angiogénese, sendo o cancro da próstata (CP) um dos tumores com capacidade de o produzir (1, 3, 4, 6-11).

A co-mediação da sensibilidade androgénica tumoral (3, 11-17), e a produção autócrina destinada particularmente à estimulação da migração celular (4, 6, 7, 10, 14, 18) parecem mais evidentes no CP metastático androgéneo-insensível.

Os estudos de imunoexpressão tecidular do EGF no CP primário, sugerem uma co-expressão significativa com o TGF- $\alpha$ , e uma expressão duas

vezes superior a este (19), mesmo no tecido metastático ósseo (5). No entanto não são concordantes nem quanto ao grau de expressão entre os diferentes tipos de tecidos prostáticos (normal, HBP e CP) (3, 17, 19-24), nem quanto ao grau de expressão entre tumores de agressividade biológica diferente (medida pelo grau de Gleason) (3, 19, 24).

Se para o estágio clínico foi afirmado um aumento significativo de expressão para os CP metastizados ósseos, para o estágio patológico já não houve sugestão de diferenças entre estádios determinados após a prostatectomia radical (24).

A análise do EGF no líquido prostático demonstrou níveis significativamente mais baixos nos indivíduos com CP, embora sem diferenças entre grupos de estádios ou de graus de Gleason diferentes (25).

A determinação do EGF no plasma não encontrou diferenças entre CP e controlos saudáveis (26).

Uma vez que os estudos em líquidos biológicos humanos são muito escassos, incluem um pequeno número de participantes, e não contemplam a relação entre o EGF no soro e marcadores prostáticos séricos, decidimos analisar o comportamento do EGF no soro de doentes com CP, descrevendo os valores obtidos em função de diferentes indicadores de prognóstico.

## Material e Métodos

Cento e vinte doentes com o diagnóstico histológico de CP e previamente não tratados, foram estadiados pela classificação cTNM-UICC-2002, e subdivididos de acordo com os grupos de risco de progressão de cTNM, de grau de Gleason na Biópsia Prostática, de PSA total, e de Razão de PSA l/t.

Os doentes colheram sangue em jejum, na ausência de doenças febris agudas ou de segundas neoplasias primárias síncronas, para hemograma, bioquímica geral, fosfatase alcalina, PSA total (PSAt), PSA livre (PSAl), Testosterona total, e Prolactina.

Também foi colhido sangue para sistema de marcação dupla celular com anticorpos monoclonais da Coulter Immunotech/Becton Dickinson, para imuno-fluorescência directa (Coulter Quick Lyse), e para análise em citómetro de fluxo (Coulter Epics-Profile II and Epics-XL), para detecção de subpopulações de linfócitos T totais activados CD3+DR+, de linfócitos T helper activados

CD3+CD4+DR+, de linfócitos T citotóxicos activados CD3+CD8+DR+, de células NK (*natural killer*) CD16+CD56+, e de linfócitos B CD19+, e para medição de EGF no soro de sangue circulante (determinações duplas) com o anticorpo monoclonal *mab human EGF, DEG 00* da Quantikine™/RD Systems (ELISA). Segundo indicação do fabricante, o factor de crescimento estudado com este anticorpo apresenta valores que variam entre 0 e 622 pg/ml, é detectável em 97% de voluntários, e nos casos detectáveis apresenta uma média de 336 pg/ml (27).

Dezassete casos foram rejeitados da análise populacional por apresentarem valores discordantes entre as duas determinações, ficando 103 disponíveis para esta análise.

As características basais da população do estudo (n=103) estão presentes nas Tabelas 1 e 2. A mediana da idade de 72,0 anos (mínimo: 49 anos; máximo: 89 anos), a mediana do PSA total foi de 63,5 ng/ml (mínimo: 2,2; máximo: 1876,0 ng/ml), a mediana da Razão de PSA livre/total (para doentes com PSA total < 10 ng/ml) foi de 0,11 (mínimo: 0,04; máximo: 0,39), a mediana da proporção de células NK foi de 19% (mínimo: 5%; máximo: 51%), e a mediana do EGF foi de 662,8 pg/ml (mínimo 0,1; máximo: 3166) (Tabela 1).

Cerca de 25% dos doentes apresentavam estágio clínico localmente avançado ou metastizado, cerca de 20% dos tumores foram classificados histologicamente como mal diferenciados (Gleason  $\geq 8$ ), aproximadamente 30% tinham PSA total basal maior do que 20 ng/ml, e nos doentes com PSA total < 10 ng/ml a Razão de PSA l/t foi  $\leq 0,26$  em 81% (Tabela 2).

Realizou-se prostatectomia radical (PR) em 47 doentes, pelo que se procedeu a reestadiamento e reestratificação pelos grupos de risco de pTNM-UICC-2002, de grau de Gleason na PR, e do índice combinado de Prognóstico de D'AMICO: Grupo 1, de baixo risco de recidiva [pT  $\leq 3a$  N0 M0, G  $\leq 7$ , e margens cirúrgicas negativas]; Grupo 2, de risco moderado de recidiva [pT3a N0 M0, G  $\leq 7$ , e margens cirúrgicas positivas]; Grupo 3, de alto risco de recidiva [pT  $\geq 3b$  ou N+ ou G  $\leq 8$ ] (Tabela 2).

Cerca de 13% dos doentes apresentaram infiltração das vesículas seminais ou metastização ganglionar obturadora, cerca de 25% tiveram grau histológico  $\geq 8$ , e aproximadamente 30% dos doentes vieram a integrar o grupo 3 de D'AMICO, de alto risco de recidiva/progressão (Tabela 2).

**Tabela 1****Características basais dos doentes do estudo, n=103 carcinomas da próstata.**

	n*	média	mediana	mínimo - máximo
Idade (anos)	103	70,1	72,0	49-89
Hemoglobina (g/dl)	96	14,8	15,0	10-18
Fosfatase alcalina (UI/ml)	96	105,5	84,0	40-73,9
PSA total (ng/ml)	102	63,5	12,4	2,2-1876
PSA livre (ng/ml)	97	5,5	1,3	0,1-149,3
Razão de PSA livre/total**	42	14,5	11,3	4,3-38,6
Testosterona total (ng/ml)	87	4,9	4,9	1,4-12,0
Prolactina (ng/ml)	75	10,6	7,4	27-75,4
Linfócitos T totais activados, CD3+DR+ (%)	89	20,8	21,0	9-40
Linfócitos T helper activados, CD3+CD4+DR+ (%)	90	3,7	3,0	1-10
Linfócitos T citotóxicos activados, CD3+CD8+DR+ (%)	89	5,3	5,0	0-15
Células NK CD16+CD56+	88	19,2	19,0	5-51
Linfócitos B CD19+	95	9,3	9,0	1-27
Razão EGF/PSA total	102	8780,7	6262,4	0,05-57743,6
Razão EGF/PSA livre	97	78335,5	47728,6	0,75-563000

\* O número de participantes com informação para alguns dos parâmetros é inferior a 103, porque essa informação não era armazenada por rotina nos laboratórios onde foram efectuadas as análises.

\*\* Aplicável a doentes com PSA≤10 ng/ml

Foram comparadas proporções com recurso à prova do  $\chi^2$ , ou à prova exacta de Fish, quando adequado. Foi utilizada a prova de Kruskal-Wallis para comparar a distribuição de variáveis quantitativas em diferentes grupos, e foram calculados coeficientes de correlação de Spearman para quantificar as associações entre variáveis quantitativas.

## Resultados

Todos os CP apresentaram valores de EGF sérico detectáveis, com uma média de 854,3 pg/ml e uma mediana de 662,8 pg/ml, a variar entre 0,1 e 3166 pg/ml, sendo detectado valor superior a 622 pg/ml (o mais alto descrito pelo fabricante do teste comercial) em 53,3% dos casos.

Os níveis de EGF no soro não foram significativamente diferentes entre os grupos de idade (mediana: 687,6 pg/ml no escalão etário ≤ 65 anos versus 670,0 pg/ml no escalão etário ≥ 76 anos,  $p=0,50$ ), nem entre os diferentes grupos de prognóstico clínico de estágio cTNM (mediana: 634,8 pg/ml em cancros localizados versus 685,2 pg/ml cancros metastizados,  $p=0,92$ ), de grau de Gleason na Biópsia Prostática (mediana: 673,0 pg/ml para tumores bem diferenciados versus 711,6

pg/ml para tumores mal diferenciados,  $p=0,41$ ), de PSAt (mediana: 676,0 pg/ml para casos com PSAt ≤ 10,0ng/ml versus 593,4 pg/ml para casos com PSAt ≥ 50,1 ng/ml,  $p=0,35$ ), ou de Razão de PSA l/t para casos com PSAt < 10 ng/ml (mediana 662,8 pg/ml para  $R < 0,26$  versus 862,0 pg/ml para  $R \geq 0,26$ ,  $p=0,07$ ) (Tabela 3).

Nos casos tratados com PR não se detectaram diferenças significativas de níveis de EGF entre os grupos prognósticos de pTNM (mediana: 612,8 pg/ml em cancros localizados versus 719,8 pg/ml nos casos com infiltração das vesículas seminais e/ou metástases ganglionares,  $p=0,92$ ), de grau de Gleason na PR (mediana: 978,6 pg/ml para tumores bem diferenciados versus 667,4 pg/ml para tumores mal diferenciados,  $p=0,17$ ), ou de Grupo de Prognóstico D'AMICO (mediana: 612,8 pg/ml para casos do Grupo 1 versus 667,4 pg/ml para casos do Grupo 3,  $p=0,90$ ) (Tabela 4).

Apenas se encontrou correlação significativa, apesar de fraca, com a Prolactina ( $r = 0,30$ ;  $p < 0,01$ ), e com as Células NK (marcação CD16+CD56+) ( $r = -0,20$ ;  $p = 0,05$ ) (Tabelas 5 e 6).

A análise do comportamento da Razão EGF/PSA total revelou diferenças estatisticamente significativas da mediana apenas entre os grupos de idade ( $p=0,01$ ), estágio clínico ( $p=0,02$ ) e

Gleason na biópsia prostática ( $p=0,005$ ) (Tabela 7).

A análise do comportamento da Razão EGF/PSA livre revelou diferenças estatisticamente significativas da mediana apenas entre os grupos de idade ( $p=0,004$ ), estágio clínico ( $p=0,006$ ) e Gleason na biópsia prostática ( $p=0,03$ ) (Tabela 8).

## Discussão

Vários factores de crescimento têm sido notados com a progressão da doença neoplásica prostática, nomeadamente para a fase de androgéneo-insensibilidade, e portanto propostos como marcadores biológicos de mau prognóstico (2). Nós próprios resolvemos ampliar o conhecimento disponível sobre o EGF em doentes com CP não previamente tratados, relacionando os seus níveis no soro com os diferentes grupos de prognóstico de CP (28).

Os estudos sobre EGF têm-se debruçado predominantemente sobre a sua presença tecidual tumoral prostática benigna ou maligna (5,12,14, 17,18,20-25,29,34,35), sobre o seu grau de imunopressão em múltiplas linhas celulares de CP eternizadas, com a observação sobre comportamentos celulares quanto à morfogénese acinar e migratória em função da estimulação da EGF exógena ou da co-estimulação DHT/EGF nessas mesmas linhas celulares (4,12,15), bem como sobre a capacidade de bloqueio selectivo do seu receptor EGF-R (4,9,10,27). Duma forma geral os estudos evidenciaram uma alta frequência de imunopressão do EGF no CP primário, sendo o dobro da observada para o TGF- $\alpha$  (19).

No entanto, o EGF tecidualmente disponível nos tecidos prostáticos apresenta comportamentos diferentes conforme a linhagem celular em causa, variando desde o efeito proliferativo glandular parácrino androgéneo-dependente nas linhas celulares epiteliais não neoplásicas (CAPE, PWR1E, RWPE1, PNT1A) ou benignas (HBP), passando pelo estímulo proliferativo glandular autócrino nas linhas celulares de agressividade reduzida (LNCaP, ALVA 101, CPA, MDAPCa2a, WPE-NB27, PC3-AR) a moderada (DU145), até ao estímulo migratório autócrino com anulação do estímulo proliferativo acinar nas linhas celulares de fenótipo androgéneo-insensível mais agressivo (PC3, TSU-Pr1, ND1, WPE-NB26), onde o FC do eixo EGF mais implicado na proliferação celular

**Tabela 2**

**Estratificação da população total de doentes por Grupos de Risco de Recidiva/Progressão, n = 103 carcinomas da próstata; n = 47 prostatectomias radicais.**

	n	%
<b>Estádio clínico</b>		
cT1-2 N0 M0	77	74,8
cT3a-b N0 M0	10	9,7
cT4 N0 M0 ou N+ ou M+	16	15,5
<b>Grau de Gleason na Biópsia Prostática</b>		
Gleason 2 a 6	48	48,5
Gleason 7	31	31,3
Gleason 8 a 10	20	20,2
<b>PSA total (ng/ml)</b>		
PSAt $\leq$ 10,0	43	42,2
PSAt $>$ 10,1 $<$ 20,0	28	27,4
PSAt $>$ 20,1 $<$ 50,0	16	15,7
PSAt $\geq$ 50,1	15	14,7
<b>Razão de PSA livre/total*</b>		
$<$ 0,26	37	81,1
$\geq$ 0,26	5	11,9
<b>Estadio patológico</b>		
pT1-2 N0 M0	29	61,7
pT3a N0 M0	12	25,5
pT3b ou pT1-3 N+ M0	6	12,8
<b>Grau de Gleason na Prostatectomia Radical</b>		
2 a 6	12	25,5
7	23	48,9
8 a 10	12	25,5
<b>Grupos de Risco de Prognóstico de D'AMICO</b>		
<b>Grupo 1</b>		
(baixo risco de recidiva)	25	53,2
<b>Grupo 2</b>		
(risco moderado de recidiva)	8	17,0
<b>Grupo 3 (alto risco de recidiva)</b>		
	14	29,8

\*Aplicável a doentes com PSA  $\leq$  10 ng/ml

está representado pelo TGF- $\alpha$  (3, 14, 17-24, 26, 33-35).

Também a investigação em tecidos humanos de CP sugere que, na aquisição de androgéneo-insensibilidade, o EGF cede a sua função de estímulo proliferativo glandular ao TGF- $\alpha$ , privilegiando o estímulo à migração celular (24, 19).

Gann et al. estudaram o líquido prostático de vários grupos de indivíduos, tendo verificado que os doentes com CP apresentavam níveis de EGF mais baixos (mediana 92,5 ng/ml), quando comparados com indivíduos com HBP ou com próstata normal (mediana 175,5 ng/ml) (25).

**Tabela 3**  
**Distribuição dos valores séricos da EGF em função dos grupos de risco de progressão/recidiva clínicos, n = 103 cancros da próstata.**

	n	mediana (pg/ml)	Mínimo - máximo (pg/ml)	p
Todos os participantes	103	662,8	0,1-3166	
Idade (anos)				
≤ 65	28	687,6	304-3166	
66 a 75	52	606,1	0,1-2742	
≥ 76	23	670,0	186-1730	0,50
Estadio clínico				
cT1-2 N0 M0	77	634,8	0,1-2742	
cT3a-b N0 M0	10	702,0	340-2330	
cT4 N0 M0 ou N+ ou M+	16	685,2	262,8-3166	0,92
Grau de Gleason na Biópsia Prostática				
2 a 6	48	673,0	291,8-2548	
7	31	577,6	0,1-3166	
8 a 10	20	711,6	262,8-2742	0,41
PSA total (ng/ml)				
≤ 10,0	43	676,0	304-2252	
> 10,1 < 20,0	28	647,0	186,8-2548	
> 20,1 < 50,0	16	677,1	264-3166	
≥ 50,1	15	593,4	0,1-1288	0,35
Razão de PSA livre/ total*				
< 0,26	37	662,8	304-2252	
≥ 0,26	5	862,0	526-1838	0,07

\*Aplicável a doentes com PSA ≤ 10 ng/ml

Descortina-se uma bibliografia escassa disponível quanto ao comportamento do EGF circulante nos doentes com CP (26-28), limitando a extração de ilações de paralelismo comportamental entre o que se passa a nível tecidual e o que se encontra a nível periférico, tanto mais que para alguns dos parâmetros estudados a unanimidade de opiniões está longe de existir.

Miyazaki et al. (26) encontraram de níveis de EGF no plasma em 19 casos de CP significativamente mais baixos do que em 30 controlos saudáveis. Os estudos com voluntários usados para aferição dos testes comerciais revelaram que 3% dos indivíduos não apresentam valores séricos detectáveis de EGF, e que o valor mais alto obtido foi de 622 pg/ml (27). No presente estudo, onde se usou o mesmo teste comercial, todos os casos de CP apresentaram níveis de EGF no soro detectáveis, e 53,3% apresentaram valores superiores a 622 pg/ml, facto que não pode ser ex-

plicado pelo volume de tecido tumoral benigno envolvido, que se sabe poder produzir EGF em função do estímulo androgénico circulante (32), uma vez que não se relacionou com o volume global prostático nos casos operados de PR (28); nem pode ser explicado pelo nível de androgéneo circulante, uma vez que não se encontrou qualquer relação entre o EGF e a Testosterona sérica basal. Emitimos portanto a hipótese da “hiperprodução” de EGF poder ser atribuível à própria neoplasia prostática.

A escasso número de estudos disponíveis sobre o EGF circulante levou-nos a procurar descobrir paralelismos comportamentais com o que tem sido encontrado nos estudos de imunexpressão tecidual do mesmo factor de crescimento em material proveniente de Ressecção Transuretral da Próstata, de Prostatectomia Radical ou em Metástases de doentes com CP quer androgéneo-sensível quer androgéneo-insensível.

**Tabela 4**  
**Distribuição dos valores séricos de EGF em função dos grupos de risco de progressão/recidiva patológicos, n = 47 prostatectomias radicais.**

	n	mediana (pg/ml)	mínimo - máximo (pg/ml)	p
<b>Estádio patológico</b>				
pT1-2 N0 M0	29	612,8	304-2462	
pT3a N0 M0	12	724,7	438-2252	
pT3b N0 M0, pT1-3 N+ M0	6	719,8	291,8-1532	0,92
<b>Grau de Gleason na Prostatectomia Radical</b>				
2 a 6	12	978,6	499-2462	
7	23	608,4	304-1386	
8 a 10	12	667,4	291,8-2252	0,17
<b>Grupos de Risco de Prognóstico de D'AMICO</b>				
Grupo 1 (baixo risco de recidiva)	25	612,8	304-2462	
Grupo 2 (risco moderado de recidiva)	8	689,1	471-1245,4	
Grupo 3 (alto risco de recidiva)	14	667,4	291,8-2252	0,90

Miyasaki et al. efectuaram uma investigação inicial de EGF em vários líquidos biológicos humanos (19 CP, 8 HBP e 30 controlos saudáveis de ambos os sexos), sugerindo uma tendência decrescente de níveis de EGF no plasma a par do envelhecimento (26). Pelo contrário, na nossa série a o EGF sérico não variou significativamente com o envelhecimento dos doentes.

A relação entre o EGF e o agravamento do estágio clínico foi objecto de estudo inicial por parte de Fowler et al. (24) que analisaram a imunexpressão tecidual do EGF em material parafinado proveniente de tecido prostático de 65 doentes com CP, encontrando positividade em 68% de 45 CP localizados versus 100% de 20 CP com metástases ósseas. Gann et al. estudaram 19 casos de CP, não tendo encontrado diferenças de níveis de EGF no líquido prostático entre os diferentes estádios (25). Mais recentemente, Culig et al. (5) curiosamente encontraram um decréscimo de imunexpressão histoquímica tecidual para o EGF, quando compararam tecido de HBP com tecido de metástases ósseas, observando um comportamento contrário para o TGF- $\alpha$ , onde a expressão foi predominante.

Na nossa população de 103 CP (com apenas 10% de metastizados) não observamos qualquer variação significativa de EGF no soro entre os diferentes estádios clínicos.

Fowler et al. (24) estudaram a imunexpressão do EGF em 45 CP tratados com Prostatectomia Ra-

dical e não encontraram diferenças entre os estádios patológicos. Nos 47 doentes da nossa série, tratados com Prostatectomia Radical, o EGF no soro não apresentou qualquer variação com o agravamento do estágio patológico.

O relacionamento entre o EGF e o agravamento da diferenciação histológica foi também alvo de raras investigações. Quanto à relação entre a imunofixação tecidual para o EGF e o grau de Gleason no CP parece não haver acordo entre os investigadores. Assim, no estudo de Fowler et al. (24) não foi encontrada correlação significativa entre a imunofixação para o EGF e o grau de Gleason, tanto entre os 45 CP localizados como entre os 20 CP metastizados. No estudo de Yang et al. (19), em 10 CP encontraram uma correlação positiva e significativa mas ligeira, com grau de expressão mais elevado para os tumores com Gleason 8 a 10. Mais recentemente, Soultziz et al. (29) em 42 CP descobriram expressão do ARNm do EGF significativamente mais elevada para os tumores com grau de Gleason menor que 7. Gann et al. (25) no estudo do EGF no líquido prostático de 19 CP não encontraram diferenças de níveis de EGF em função do grau de Gleason dos tumores.

Na série aqui estudada não foi encontrada associação significativa entre os níveis séricos de EGF e o agravamento histológico, quer na gradação (classificação de Gleason combinado) realizada no material de biópsia dos 103 CP, quer

**Tabela 5****Correlação entre o EGF circulante e as diferentes variáveis biológicas basais dos doentes com carcinoma da próstata; n = 103 carcinomas da próstata.**

	n	r	p
Idade	103	-0,04	0,70
Hemoglobina	96	-0,06	0,58
Fosfatase alcalina	96	-0,06	0,56
Testosterona total	87	-0,01	0,93
Prolactina	75	0,30	<0,01
PSA total	102	-0,13	0,21
PSA livre	97	-0,03	0,79
Razão PSA livre/total*	42	0,25	0,11
Proporção de Linfócitos T CD3+DR+	89	-0,07	0,49
Proporção de Linfócitos T helper CD4+DR+	90	-0,12	0,28
Proporção de Linfócitos T citotóxicos CD8+DR+	89	-0,18	0,09
Células NK CD16+CD56+	88	-0,20	0,05
Linfócitos B CD19+	95	0,10	0,35

\*Aplicável a doentes com PSA ≤ 10 ng/ml

**Tabela 6****Correlação entre o EGF circulante e as diferentes variáveis biológicas basais dos doentes com carcinoma da próstata; n = 47 prostatectomias radicais.**

	n	r	p
Idade	47	-0,09	0,95
Hemoglobina	46	-0,12	0,43
Fosfatase alcalina	45	-0,07	0,64
Testosterona total	42	-0,09	0,57
Prolactina	34	0,20	0,25
PSA total	47	-0,20	0,18
PSA livre	46	0,09	0,56
Razão PSA livre/total*	29	0,13	0,49
Proporção de Linfócitos T CD3+DR+	40	0,10	0,56
Proporção de Linfócitos T helper CD4+DR+	41	-0,01	0,96
Proporção de Linfócitos T citotóxicos CD8+DR+	41	-0,68	0,61
Células NK CD19+CD56+	40	-0,08	0,28
Linfócitos B CD19+	44	0,16	0,28

\*Aplicável a doentes com PSA ≤ 10 ng/ml

na efectuada nas 47 peças de prostatectomia radical.

A análise do EGF sérico em função dos três grupos de risco de recidiva/progressão de D'AMICO também não evidenciou diferenças significativas de valores entre os grupos.

Foi recentemente conhecida a interferência negativa do EGF no PSA a nível tecidual: Hakarya

et al. (30) demonstraram o poder do EGF exógeno sobre células LNCaP C-81, onde a par do estímulo proliferativo celular foi evidente a supressão da imunexpressão e da secreção de PSA, com redução simultânea da imunexpressão do receptor androgénico AR.

Não foram evidentes diferenças significativas na mediana de EGF sérico entre os quatro grupos

**Tabela 7****Razão EGF/PSAt em função dos grupos de risco de progressão/recidiva clínicos (n = 103 CP), e patológicos (n = 47 PR).**

	n	mediana (pg/ml)	Mínimo - máximo (pg/ml)	p
<b>Todos os participantes</b>				
<b>Idade (anos)</b>				
≤ 65	28	8076,8	147,9-57743,6	
66 a 75	51	6078,0	0,05-25887,3	
≥ 76	23	3472	14,0-54062,5	0,01
<b>Estadio clínico</b>				
cT1-2 N0 M0	76	7051,7	0,05-57743,6	
cT3a-b N0 M0	10	3255,0	332,7-24000	
cT4 N0 M0 ou N+ ou M+	16	1460,4	14,0-31043,8	0,02
<b>Grau de Gleason na Biópsia Prostática</b>				
2 a 6	47	8139,9	520,8-57743,6	
7	31	4328,1	0,05-54062,5	
8 a 10	20	3418,1	14,0-31043,8	0,005
<b>Estádio patológico</b>				
pT1-2 N0 M0	19	8139,9	1780,5-57743,6	
pT3a N0 M0	27	8088,2	1823,8-22381,8	
pT3b N0 M0, pT1-3 N+ M0	1	54062,5	—	0,35
<b>Grau de Gleason na P R</b>				
2 a 6	29	7771,8	2456,7-54062,5	
7	12	9226,4	1780,5-57743,6	
8 a 10	6	6838,4	1823,8-29724,1	0,77
<b>Grupos de Risco de Recidiva - Prognóstico de D'AMICO</b>				
Grupo 1 (baixo risco)	12	14305,6	2932,0-54062,5	
Grupo 2 (risco moderado)	23	8088,2	2369,1-21000,0	
Grupo 3 (alto risco)	12	5574,4	1780,5-57743,6	0,05

de prognóstico de PSA total basal estabelecidos, nem se observou correlação significativa entre o EGF e o PSA total. Também não se observou associação com o PSA livre, nem diferenças na mediana de EGF entre os dois grupos de razão de PSA livre/total ( $< 0,26$  versus  $= 0,26$ ) criados para os casos com PSA total basal inferior a 10 ng/ml. A relação entre o EGF no soro e marcadores prostáticos séricos não tinha ainda sido efectuada por outros autores.

A procura dum índice basal composto que pudesse evidenciar um papel de prognóstico no CP, levou-nos a verificar o comportamento da Razão EGF/PSA total e da Razão EGF/PSA livre. Foram evidentes reduções significativas das medianas destas duas razões com o envelhecimento, agravamento do estágio clínico, e agravamento da diferenciação histológica na biópsia prostática,

mas que apenas traduzem o conhecido poder discriminatório do PSA.

O papel da testosterona na modulação positiva do eixo EGF é bem conhecida, não só porque as células de Leydig testiculares realizam esteroidogénese induzida pelo EGF, porque a testosterona leva directamente ao aumento da concentração do EGF-R (36), mas também porque existe uma relação directa entre as concentrações tecidulares de testosterona ( $r=0,62$ ;  $p<0,05$ ) e de DHT, e o grau de imunoexpressão do EGF, em tecidos de CP humano (19). Não se conhecem estudos que tivessem procurado a associação entre estas duas proteínas séricas. Na nossa série não foi evidente qualquer relação entre os valores de EGF e de testosterona total no soro, postulando nós que a “hiperprodução” de EGF observada em cerca de metade dos casos seja independente do estímulo androgénico.

**Tabela 8****Distribuição dos valores séricos da Razão EGF/PSA livre em função dos grupos de risco de progressão/recidiva clínicos (n = 103 CP), e patológicos (n = 47 PR).**

	n	mediana (pg/ml)	Mínimo - máximo (pg/ml)	p
Todos os participantes				
Idade (anos)				
≤ 65	26	100975	2208,5-563000	
66 a 75	49	44247,1	0,750-249500	
≥ 76	22	42720,0	182,1-331133,3	0,004
Estadio clínico				
cT1-2 N0 M0	72	580990	0,750-563000	
cT3a-b N0 M0	10	27357,2	3396,2-528000	
cT4 N0 M0 ou N+ ou M+	15	8551,0	182,1-331133,3	0,006
Grau de Gleason na Biópsia Próstática				
2 a 6	44	71285,7	8551,8-563000	
7	31	42434,8	0,750-224285,7	
8 a 10	19	28333,0	182,1-331133,3	0,03
Estádio patológico				
pT1-2 N0 M0	18	87360,0	8631,0-563000	
pT3a N0 M0	27	50181,8	18237,5-249500	
pT3b N0 M0, pT1-3 N+ M0	1	157272,7	—	0,15
Grau de Gleason na P R				
2 a 6	29	77333,3	8631,0-224285,7	
7	11	67771,4	33692,3-563000	
8 a 10	6	67102,9	18237,5-191500	0,62
Grupos de Risco de Recidiva - Prognóstico de D'AMICO				
Grupo 1 (baixo risco)	11	70000,0	8631,0-249500	
Grupo 2 (risco moderado)	23	72571,4	18411,8-198000	
Grupo 3 (alto risco)	12	79250,0	18237,5-563000	0,90

Observamos uma relação significativa mas fraca entre o EGF e a prolactina em circulação. Como a prolactina é um dos ligantes do eixo hipotálamo-hipófiso-gonadal, nomeadamente do receptor da prolactina (PRL-R) a nível prostático, e nesta população de doentes não pode ser considerado o poder estimulatório de quimiohormonoterapias sobre a prolactina, podemos vislumbrar aqui uma discreta interligação entre este eixo e o eixo EGF no CP.

Não foram até ao momento realizados estudos que relacionem populações linfocitárias periféricas com o EGF sérico. No presente estudo não se observaram associações significativas entre a relação entre o EGF no soro e as diferentes subpopulações de linfócitos T activados e B. No entanto emergiu uma relação inversa significativa mas fraca entre o EGF no soro e as células NK, possível tradutora duma capacidade depressora deste fac-

tor de crescimento sobre a actividade celular “natural killer”.

O EGF no soro não mostrou capacidade discriminativa da agressividade tumoral, medida quer pelos estádios clínico ou patológico, quer pela diferenciação histológica determinada no material de biópsia prostática ou da peça de prostatectomia radical, quer pela quantidade de PSA total em circulação, quer pela agregação de factores de risco de recidiva/progressão contemplados na escala de D'AMICO.

## Bibliografia

- 1 Janis Kuby. Immunology. 3th edition 1997, Part IV The Immune System in Health and Disease; Cap 24 Cancer and The Immune System: 573-596; Editors W. H. Freeman and Company, New York

- 2 Cussenot O. Growth factors and prostatic tumors. *Ann Endocrinol (Paris)*. 1997; 58 (5): 370-380.
- 3 Wong Y C, Wang Y Z, Growth Factors and Epithelial-Stromal Interactions in Prostate Cancer Development. "Growth factors regulate prostate carcinogenesis" *Int J Cytology*, 2000; 199: 65-87
- 4 John Mendelsohn, Peter M. Howley, Mark A. Israel, Lance A. Liotta. *The Molecular Basis of Cancer*, 2<sup>nd</sup> edition, 2001. Growth Factors and their Receptors in Epithelial Malignancies: 137-144; Editors W. B. Saunders Company
- 5 Z. Culig. Basic Research on Prostate Cancer: Signal Transduction (in Prostate and Renal Cancer, Begnin Prostatic Hyperplasia, Erectile Dysfunction and Basic Research: an update. Proceedings of PACIOU VII, Rotterdam), 2003, part 16: 136-144. Editors C. H. Bangma, D. W. W. Newling; The Parthenon Publishing Group
- 6 G. Bartsch, H. Klocker, C. Logothetis, K. Chi, O. Cussenot, E. Frenkel, M. Gleave, H. Miyake, J. Schalken. Innovative Approaches in Medical Management of Prostate Cancer: Other than Hormonal Therapies (in Prostate Cancer, 3<sup>rd</sup> International Consultation on Prostate Cancer, Paris), 2003, Committee 5B: 159-216. Editors L. Denis, G. Bartsch, S. Khoury, M. Murai, A. Partin; 3<sup>rd</sup> ICPC, UICC, WHO, IARC, SIU
- 7 Quantikine Human EGF Immunoassay, Catalog Number DEG00. R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA. 1994
- 8 Arie Belldegrun, Roger S. Kirby, Donald W. W. Newling. *New Perspectives In Prostate Cancer*, 2<sup>nd</sup> edition, 2000, Cap 1 Prostate Cancer: Summary and Update: - Genetic Pathways: 1-10; Cap 2 Molecular Epidemiology of Prostate Cancer: 11-27; Cap 5 Angiogenesis, p53, bcl-2, and Ki-67 in the Progression of Prostate Cancer after Radical Prostatectomy: 157-167; Editors Isis Medical Media
- 9 Mimeault M, Pommery N, Henichart JP. New advances on prostate carcinogenesis and therapies: involvement of EGF-EGFR transduction system. *Growth Factors*. 2003 Mar; 21 (1): 1-14.
- 10 Kim H G, Kassiss J, Souto J C, Turner T, Wells A. EGF receptor signalling in prostate morphogenesis and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 1999 Oct; 14 (4): 1175-1182
- 11 Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Hittmair A, Zhang J, Thurnher M, Bartsch G, Klocker H. Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate*. 1996 Jun; 28 (6): 392-405.
- 12 Mulder E, van Loon D, de Boer W, Shuurmans A L, Bolt J, Voorhorst M M, Kuiper G G, Brinkmann A O. Mechanism of androgen action: recent observations on the domain structure of androgen receptors and the induction of EGF-receptors by androgens in prostate tumor cells. *J Steroid Biochem* 1989 Jan; 32 (1B): 151-156.
- 13 Story MT. Polypeptide modulators of prostatic growth and development. *Cancer Surv*. 1991; 11: 123-146.
- 14 Sherwood ER, Lee C. Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate. *World J Urol*. 1995; 13 (5): 290-6.
- 15 Byrne RL, Leung H, Neal DE. Peptide growth factors in the prostate as mediators of stromal epithelial interaction. *Br J Urol*. 1996 May; 77 (5): 627-633.
- 16 Konety BR, Nelson JB. Nonandrogenic mediators of prostatic growth. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2001 Jun; 15 (3): 459-476
- 17 Hellawell GO, Brewster SF. Growth Factors and their Receptors in Prostate Cancer. *B. J. U. International*. 2002; 89: 230-240.
- 18 Ware JL. Growth factors and their receptors as determinants in the proliferation and metastasis of human prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 1993 Sep; 12 (3-4): 287-301.
- 19 Yang Y, Chisholm GD, Habib FK. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha concentrations in BPH and cancer of the prostate: their relationships with tissue androgen levels. *Br J Cancer*. 1993 Jan; 67 (1): 152-155.
- 20 De Miguel P, Royuela, Bethencourt R, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R. Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates. *Cytokine*. 1999 Sep; 11 (9): 722-727.
- 21 Glynne-Jones E, Goddard L, Harper ME. Comparative analysis of mRNA and protein expression for epidermal growth factor receptor and ligands relative to the proliferative index in human prostate tissue. *Hum Pathol*. 1996 Jul; 27 (7): 688-94.
- 22 Ching KZ, Ramsey E, Pettigrew N, D'Cunha R, Jason M, Dodd JG. Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines. *Mol Cell Biochem*. 1993 Sep 22; 126 (2): 151-158.
- 23 Davies P, Eaton CL. Binding of epidermal growth factor by human normal, hypertrophic, and carcinoma-tous prostate. *Prostate*. 1989; 14 (2): 123-132.
- 24 Fowler JE Jr, Lau JL, Ghosh L, Mills SE, Mounzer A. Epidermal growth factor and prostatic carcinoma: an immunohistochemical study. *J Urol*. 1988 Apr; 139 (4): 857-861.
- 25 Gann PH, Klein KG, Chatterton RT, Ellman AE, Grayhack JT, Nadler RB, Lee C. Growth factors in expressed prostatic fluid from men with prostate cancer, BPH, and clinically normal prostates. *Prostate*. 1999 Sep 1; 40 (4): 248-255.
- 26 Miyazaki S. Clinical study of the epidermal growth factor contents in urine, plasma and tissue from the patients with urological diseases. *Hinyokika Kiyo*. 1992 Aug; 38 (8): 919-924.

- 27 Bonaccorsi L, Marchiani S, Muratori M, Carloni V, Forti G, Baldi E. Signaling mechanisms that mediate invasion in prostate cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec; 1028: 283-288.
- 28 Pina F, Figueiredo G, Barros H, Sousa T, Silva J, Reis M. Epidermal Growth Factor (EGF) in Prostate Cancer Patients: correlation to clinical and pathological prognostic factors. Abstract Book of the PACIOU VII (URFR-SUWO) and 7th International Congress of the Dutch Urological Association (DUA VII), 2002, Rotterdam, Holland
- 29 Soultz N, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGFB1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol.* 2006 Aug; 29 (2): 305-14.
- 30 Hakariya T, Shida Y, Sakai H, Kanetake H, Igawa T. EGFR signaling pathway negatively regulates PSA expression and secretion via the PI3K-Akt pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 31; 342 (1): 92-100. Epub 2006 Feb 2.
- 31 Humez S, Monet M, Legrand G, Lepage G, Delcourt P, Prevarskaya N. Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2006 Mar; 13 (1): 181-95.
- 32 Harper ME, Glynn-Jones E, Goddard L, Mathews P, Nicholson RI. Expression of androgen receptor and growth factors in premalignant lesions of the prostate. *J Pathol.* 1998 Oct; 186 (2): 169-77.
- 33 Jones HE, Eaton CL, Barrow D, Dutkowski CM, Gee JM, Griffiths K. Comparative studies of the mitogenic effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha and the expression of various growth factors in neoplastic and non-neoplastic prostatic cell lines. *Prostate.* 1997 Mar 1; 30 (4): 219-231.
- 34 Myers RB, Kudlow JE, Grizzle WE. Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor and the epidermal growth factor receptor in adenocarcinoma of the prostate and benign prostatic hyperplasia. *Mod Pathol.* 1993 Nov; 6 (6): 733-737.
- 35 Shaikh N, Lai L, McLoughlin J, Clark D, Williams G. Quantitative analysis of epidermal growth factor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma and its prognostic significance. *Anticancer Res* 1990 Jul-Aug; 10 (4): 873-877.
- 36 Limonta P, Moretti RM, Dondi D, Marelli MM, Motta M. Androgen-dependent prostatic tumors: biosynthesis and possible actions of LHRH. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994 Jun; 49 (4-6): 347-50.