



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA

CARLOS GUSTAVO HIRTH

**VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO
NEUROENDÓCRINA E DE CÉLULAS-TRONCO NO CÂNCER DE
PRÓSTATA LOCALIZADO**

FORTALEZA - CE

2016

CARLOS GUSTAVO HIRTH

VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO
NEUROENDÓCRINA E DE CÉLULAS-TRONCO NO CÂNCER DE PRÓSTATA
LOCALIZADO

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- H576v Hirth, Carlos Gustavo.
VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA E DE
CÉLULAS-TRONCO NO CÂNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO / Carlos Gustavo Hirth. – 2016.
133 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Patologia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Conceição Aparecida Dornelas.
1. Neoplasias da próstata.. 2. Carcinoma neuroendócrino.. 3. Cromogranina. . 4. Aurora quinase. . 5.
Genes, MYC.. I. Título.

CDD 571.9

CARLOS GUSTAVO HIRTH

VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO E DE
CÉLULAS-TRONCO NO CÂNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

Aprovada em 17/11/2016

BANCA EXAMINADORA

DR CELSO MÁRIO COSTA LARA

DR FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU

DR ROBERTO WAGNER BEZERRA ARAÚJO

DRA CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Hospital Infantil Albert Sabin, pela contribuição com a repetição de reação manual de imuno-histoquímica.

Ao Serviço de Urologia da Universidade Federal do Ceará.

À técnica de laboratório de Patologia, do Centro de Referência do Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente, Francisca Daniele Alves da Silva pela reinclusão de blocos e cortes histológicos.

À Dra Maria Perpétuo Socorro Saldanha e à Dra Fernanda Judith Viana Correa, pelo auxílio na revisão de lâminas histológicas.

Aos alunos da graduação de medicina (bolsistas de extensão da UFC) Felipe Carneiro Castelo Branco, João Pedro Vasconcelos Bessa, Henrique Carvalho Lima Faria e Adriele Machado dos Santos, pelo auxílio no acompanhamento ambulatorial dos pacientes.

À técnica de laboratório do DPML, *in memoriam*, Zenaide dos Santos Pereira.

Aos Patologistas do DPML Dra Regia Maria Vidal do Patrocínio e Adriana Regina Vilarinho de Oliveira.

Às técnicas do Laboratório de Patologia do Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará Manuela Cristina Silva Sales, Shirley Queirós Pinheiro Ribeiro, Veralúcia Araujo da Silva, pelo auxílio na realização das reações de imuno-histoquímica.

Ao parceiro Bruno Lopes Vasconcelos, pela paciência.

“Eu acho que todos deveriam fazer versos. Ainda que saiam maus, não tem importância. É preferível, para a alma humana, fazer maus versos a não fazer nenhum. O exercício da arte poética representaria, no caso, como que um esforço de autossuperação. É fato consabido que esse refinamento do estilo acaba trazendo necessariamente o refinamento da alma. Sim, todos devem fazer versos. (...)” (Mário Quintana)

VALOR PROGNÓSTICO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA E DE CÉLULAS-TRONCO NO CÂNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO. CARLOS GUSTAVO HIRTH. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação (stricto sensu) em Patologia. Orientador: Prof Dra Conceição Aparecida Dornelas

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar novos marcadores imuno-histoquímicos relacionados à indução da diferenciação neuroendócrina e células-tronco com fatores de prognóstico e recorrência bioquímica, em pacientes submetidos à prostatectomia radical. Para tanto, pacientes operados no Hospital Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, no período de 2008 a 2013, foram submetidos a acompanhamento clínico-ambulatorial, entre os anos de 2008 a 2016. Avaliou-se a proporção daqueles que apresentaram recorrência bioquímica, bem como as características clínico-patológicas e a marcação em reações de imuno-histoquímica para cromogranina (diferenciação neuroendócrina), Aurora quinase A (AURKA), N-MYC, C-MYC e CD44s, em material parafinado. De 74 pacientes submetidos à cirurgia, obteve-se acompanhamento de 69, com tempo de seguimento de 41 (2-89) meses; diferenciação neuroendócrina na neoplasia se associou com infiltração de vesículas seminais ($p=0,032$) e estadiamento ($p=0,030$). C-MYC associou-se com escore de Gleason ($p=0,001$) e infiltração de vesículas seminais ($p=0,014$). AURKA expressou-se em raros casos. N-MYC foi negativo em todos os pacientes. CD44s se associou com menores níveis de PSA pré-operatório e menores escores de Gleason. Observou-se recorrência bioquímica em 27,0% dos pacientes. Recorrência se associou, em pelo menos uma das formas de análise, com níveis séricos de PSA pré-operatório, escore de Gleason, invasão de vesículas seminais e estadiamento. Não houve associação significativa entre recorrência e diferenciação neuroendócrina, C-MYC e CD44s. Dessa forma, nesse estudo, a detecção imuno-histoquímica da diferenciação neuroendócrina; a expressão de C-MYC e a perda da expressão de CD44s relacionaram-se com carcinomas mais agressivos (PSA, Gleason, infiltração de vesícula seminal e/ou estadiamento), porém sem associação com a recorrência bioquímica; bem como confirma a importância de fatores prognósticos considerados como clássicos em série regional de pacientes com câncer de próstata.

Palavras-chave: Neoplasias da próstata. Carcinoma neuroendócrino. Cromogranina. Aurora quinase. Genes, MYC. Antígenos, CD44. Células-tronco. Fator prognóstico.

THE PROGNOSTIC VALUE OF NEUROENDOCRINE DIFFERENTIATION AND STEM CELLS MARKERS FOR LOCALIZED PROSTATE CANCER.

CARLOS GUSTAVO HIRTH. Graduate Program in Pathology Master's Thesis.
Advisor: Dr. Conceição Aparecida Dornelas

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the new immunohistochemical markers related to neuroendocrine differentiation induction and stem cells with prognostic factors and biochemical recurrence in patients submitted to radical prostatectomy. Therefore, patients operated at the Hospital Walter Cantídio, Federal University of Ceará, in the period of 2008-2013, underwent clinical and outpatient follow-up, between the years 2008-2016. Biochemical recurrence was evaluated and was correlated with pathological characteristics and immunohistochemical reactions. Chromogranin (neuroendocrine differentiation), Aurora Kinase A (AURKA), N-MYC, C-MYC and CD44s were performed in paraffined material. From 74 patients underwent surgery was obtained the followup of 69, in a median period of 41 (2-89) months. Neoplastic neuroendocrine differentiation was associated with seminal vesicles infiltration ($p = 0.032$) and stage ($p = 0.030$). C-MYC was associated with Gleason score ($p = 0.001$) and seminal vesicles infiltration ($p = 0.014$). AURKA was expressed in rare cases. N-MYC protein was negative in all patients. CD44s was associated with lower preoperative PSA levels and lower Gleason scores. Biochemical recurrence was observed in 27.0% of patients. Recurrence was associated with serum preoperative PSA, Gleason score, seminal vesicle invasion and staging at least in one form of analysis. There was no significant association between recurrence and neuroendocrine differentiation, C-MYC and CD44s expression. Therefore, immunohistochemical detection of neuroendocrine differentiation, expression of C-MYC and loss of CD44s were related to more aggressive carcinomas (PSA, Gleason, seminal vesical invasion and/or stage), but no association with biochemical recurrence. Classic prognostic factors were affirmed like biochemical recurrence predictors.

Keywords: Prostate neoplasm. Prostate neuroendocrine. Chromogranin. Aurora kinase. Myc gene. CD44 prostate. Prognostic factor

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Fotomicrografia da próstata normal	21
Figura 02 - Fotomicrografia da próstata normal com marcação de células-tronco/CD44s.....	22
Figura 03 - Fotomicrografia de ácinos e ductos prostáticos normais com marcação para diferenciação neuroendócrina.....	23
Figura 04 - Representação esquemática dos componentes da próstata normal.....	23
Figura 05 - Fotomicrografia de adenocarcinoma acinar usual da próstata.....	24
Figura 06 - Estimativa da distribuição dos 10 principais tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2016	25
Figura 07 - Estimativa da distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Nordeste Brasileiro em 2016.....	26
Figura 08 – Estimativa da distribuição proporcional dos 10 tipos mais incidentes de câncer nos EUA em 2016.....	26
Figura 09 - Evolução temporal da taxa de mortalidade das 5 localizações primárias mais prevalentes em 2013, ajustadas por idade, pela população mundial por 100.000 homens, Brasil, entre 1979 e 2013	27
Figura 10 - Mortalidade estimada de câncer, por órgão primário, comparativo entre homens e mulheres, com número total e proporção, nos EUA, 2016	27
Figura 11 - Fotomicrografia adenocarcinoma acinar Gleason 3	32
Figura 12 - Fotomicrografia adenocarcinoma acinar Gleason 4.....	32
Figura 13 - Fotomicrografia adenocarcinoma acinar, Gleason 5.....	33
Figura 14 - Fotomicrografia de margens cirúrgicas comprometidas.....	35
Figura 15 - Fotomicrografia de adenocarcinoma acinar com diferenciação neuroendócrina	56
Figura 16 - Fotomicrografia de diferenciação neuroendócrina no epitélio não neoplásico.....	56
Figura 17 - Fotomicrografia da marcação de C-MYC observada nas células malignas.....	59
Figura 18 - Fotomicrografia da marcação do C-MYC em células vasculares.....	59
Figura 19 - Fotomicrografia da marcação de C-MYC observada em raras células na porção basal do epitélio não neoplásico	60

Figura 20 - Fotomicrografia de controle externo de C-MYC em carcinoma escamoso.....	60
Figura 21 - Fotomicrografia controle externo para C-MYC na porção críptica da mucosa cólica normal	61
Figura 22 - Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para N-MYC no carcinoma acinar usual prostático.	63
Figura 23 - Fotomicrografia da reação de FISH para N-MYC em neuroblastoma metastático.....	64
Figura 24 - Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para N-MYC em neuroblastoma metastático.	64
Figura 25 - Fotomicrografia de carcinoma neuroendócrino de pequenas células com imuno-histoquímica para N-MYC.....	65
Figura 26 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica com marcação de AURKA na neoplasia	66
Figura 27 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica com marcação para AURKA no epitélio não neoplásico.	67
Figura 28 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica com marcação para AURKA em células inflamatórias	67
Figura 29 - Fotomicrografia da marcação do CD44s em células neoplásicas.....	70
Figura 30 - Fotomicrografia da marcação imuno-histoquímica do CD44s no epitélio não neoplásico	70
Figura 31 - Fotomicrografia da marcação imuno-histoquímica do CD44s em células inflamatórias.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Resumo da características clínico-patológicas dos 74 pacientes submetidos à prostatectomia no período de 2008 a 2013.....	54
Tabela 02 - Resultado das reações de imuno-histoquímica para cromogranina considerado por escores	55
Tabela 03 - Parâmetros de avaliação clínico-patológicos verificados em pacientes com câncer de próstata conforme a marcação para cromogranina na neoplasia: estratificação em negativo (0 e 1+) e positivo (2+ e 3+), baseada nos resultados de 66 reações, nível de significância avaliado pelo Teste exato de Fisher	57
Tabela 04 - Resumo dos resultados para reações de imuno-histoquímica com C-MYC, avaliado como positivo e negativo.....	58
Tabela 05 - Parâmetros de avaliação clínico-patológicos verificados em pacientes com câncer de próstata conforme a marcação para C-MYC na neoplasia: estratificação em negativo e positivo, baseada nos resultados de 66 reações, nível de significância avaliado pelo Teste exato de Fisher	62
Tabela 06 - Resumo do resultado das reações de imuno-histoquímica para N-MYC.....	63
Tabela 07 - Resumo das reações imuno-histoquímicas para AURKA.....	66
Tabela 08 - Parâmetros de avaliação clínico-patológicos verificados em pacientes com câncer de próstata conforme a marcação para AURKA na neoplasia: estratificação em negativo e positivo, baseado nos resultados de 68 reações, nível de significância avaliado pelo Teste exato de Fisher	68
Tabela 09 - Resumo das reações de imuno-histoquímica para o CD44s, plotado conforme ausência total de positividade e positividade ao menos focal e marcação conforme escores negativo (0-3) e positivo (4-6)	69
Tabela 10 - Correlação entre o padrão de de Gleason conforme positividade para CD44s estratificado em escores negativo (0-3) e positivo (4-6).....	72
Tabela 11 - Parâmetros de avaliação clínico-patológicos verificados em pacientes com câncer de próstata conforme a marcação para CD44s na neoplasia, estratificação em negativo (0-3) e positivo (4-6), baseado	

nos resultados de 65 reações, nível de significância avaliado pelo Teste exato de Fisher

Tabela 12 -	Análise da recorrência bioquímica conforme fatores de prognóstico dos pacientes submetidos a seguimento clínico baseada na razão de chances e análise estatística pelo teste exato de Fisher	75
Tabela 13 -	Análise de risco conforme fatores de prognóstico para recorrência bioquímica de pacientes submetidos a seguimento clínico após prostatectomia pelo método de regressão de Cox univariada	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Comparação entre o número de pacientes com e sem recorrência bioquímica conforme ano da prostatectomia	74
Gráfico 02 - Probabilidade de recorrência bioquímica conforme marcação imuno-histoquímica para cromogranina na neoplasia: negativo (0 e 1+), negativo (2+ e 3+) curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank	76
Gráfico 03 - Probabilidade de recorrência bioquímica conforme positividade C-MYC na neoplasia, curva de Kaplan-Meier. significância avaliada pelo teste de Log Rank	77
Gráfico 04 - Probabilidade de recorrência bioquímica conforme positividade AURKA na neoplasia, curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank	77
Gráfico 05 - Probabilidade de recorrência bioquímica conforme positividade para CD44s na neoplasia, Curva de Kaplan-Meier, nível de significância avaliada pelo teste de Log Rank	78
Gráfico 06 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função da idade agrupada em <65 anos e ≥65 anos, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank	79
Gráfico 07 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função do PSA sérico pré-operatório categorizado em <10 ng/ml e ≥10 ng/ml, Curva de Kaplan-Meier.	79
Gráfico 08 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função do escore de Gleason, agrupado em escore 6 e ≥7, Curva de Kaplan-Meier, significância analisada pelo teste de Log Rank	80
Gráfico 09 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função da Extensão Extraprostática, presente ou ausente, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank	80
Gráfico 10 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função da Infiltração da Vesícula Seminal, presente ou ausente, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank	81

Gráfico 11 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função do Estadiamento, agrupado em pT2 e pT3, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank	81
Gráfico 12 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função das Margens Cirúrgicas, livres ou comprometidas, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Estadiamento do câncer de próstata conforme AJCC , 2010	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA	Instituto Nacional do Câncer
EUA	Estados Unidos da América
PSA	Antígeno Prostático Específico
NSE	Neuroenolase
TNM	Tumor LinfoNodo Metástase (Classificação – Estadiamento)
DNA	Ácido DesoxiRribonucléico
RA	Receptor de Andrógeno
cAMP	Monofosfato de Adenosina cíclico.
AURKA	Aurora Quinase A
AURK	Aurora Quinase
TGFBeta	Fator de Crescimento Transformador Beta.
RNA	Ácido RiboNucléico.
SYP	Sinaptofisina
OMS	Organização Mundial da Saúde
AJCC	American Joint Committee on Cancer
PIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática
PCR	Polymerase Chain Reaction
FISH	Fluorescent in situ Hybridization

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm	Mais ou menos
\geq	Maior ou igual a
\leq	Menor ou igual a
$>$	Maior que
$<$	Menor que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	A próstata normal	20
1.2	O câncer de próstata	24
1.2.1	Epidemiologia	25
1.2.2	Carcinogênese	27
1.2.3	Tratamento	28
1.3	Fatores de prognóstico	30
1.3.1	Antígeno prostático específico (PSA)	31
1.3.2	Escore de Gleason	31
1.3.3	Estadiamento	33
1.3.4	Margens cirúrgicas	35
1.3.5	Marcadores de prognóstico moleculares e imuno-histoquímicos	36
1.4	Recorrência bioquímica	36
1.5	Diferenciação neuroendócrina neoplásica e células-tronco cancerígenas	37
1.6	Fatores indutores de diferenciação neuroendócrina e de células-tronco	38
1.6.1	Família MYC	38
1.6.2	Aurora Quinase A (AURKA)	40
1.6.3	CD44s	41
2	OBJETIVOS	44
2.1	Objetivo Geral	44
2.2	Objetivos Específicos	44
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	45
3.1	Ética do estudo, pacientes e desenho do estudo	45
3.2	Revisão de laudos histopatológicos, prontuários e lâminas histológicas	46
3.3	Imuno-histoquímica	48
3.3.1	Cromogranina A	49
3.3.2	C-MYC	49
3.3.3	N-MYC	50
3.3.4	Aurora Quinase A	50
3.3.5	CD44s	51
3.4	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	53

4.1	Parâmetros clínico-patológicos.....	53
4.2	Imuno-histoquímica	54
4.2.1	Cromogranina.....	55
4.2.2	C-MYC	57
4.2.3	N-MYC	62
4.2.4	Aurora Quinase A.....	65
4.2.5	CD44s.....	68
4.3	Recorrência Bioquímica.....	72
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A – CORRELAÇÃO ENTRE FATORES CLÍNICO PATOLÓGICOS	117
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TLCE)	128
	ANEXO A– AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	131
	ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL.....	132
	ANEXO C – AUTORIZAÇÃO DO SERVIÇO DE UROLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO.....	133

1 INTRODUÇÃO

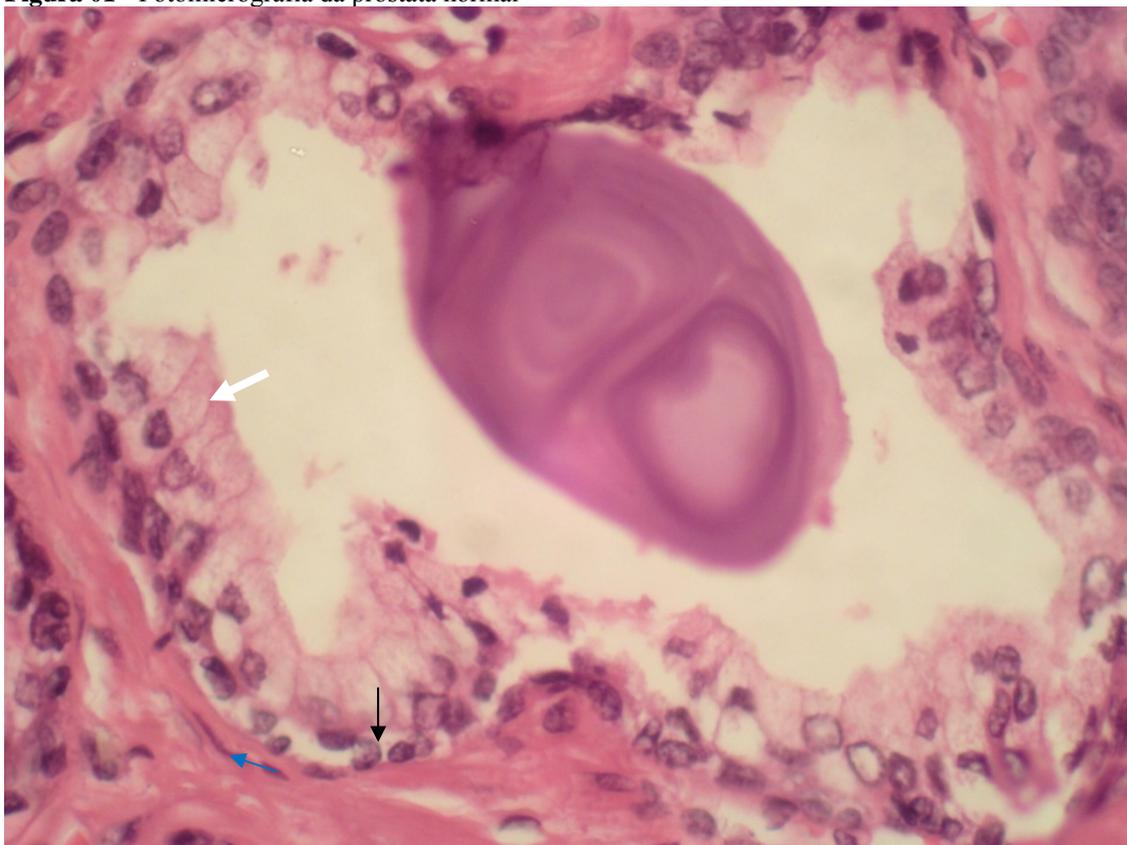
1.1 A próstata normal

A próstata pode ser observada durante o período embrionário precoce como uma condensação do mesênquima ao longo da uretra pélvica, delineando-se o contorno e a localização da próstata adulta aproximadamente na nona semana de gestação.¹ Na décima semana surgem brotamentos epiteliais do segmento distal da uretra para dentro do mesênquima condensado, induzidos pela testosterona produzida pelos testículos.^{2; 3; 4; 5; 6; 7} Após o nascimento o tamanho prostático permanece estável até os 10/12 anos. Durante a puberdade a próstata aumenta seu volume, devido ao aumento dos níveis androgênicos e aproximadamente aos 20 anos atinge o tamanho médio de 20g, o qual permanece estável nos próximos 30 anos.^{8; 9; 10; 11}

Anatomicamente a próstata pode ser dividida em zona periférica, zona central e zona de transição.^{1; 8; 12} A zona periférica compõe aproximadamente 65-70% do volume prostático e é o local mais comum de neoplasia intraepitelial (PIN) e do carcinoma.^{1; 8; 13} A zona central tem formato de cone e inclui a totalidade da base prostática, compõe 25-30% do volume do órgão.^{1; 8} A zona de transição compõe o menor volume, aproximadamente 5%, mas pode aumentar extensivamente na hiperplasia prostática benigna.¹⁴ A expressão gênica e a interação epitelial-mesenquimal diferem entre as zonas prostáticas o que pode ser responsável pela localização zonal das doenças.^{15; 16; 17}

O tecido prostático normal é composto por células mesenquimais e células com diferenciação epitelial (Figura 01). As células mesenquimais formam o estroma e as células com diferenciação epitelial formam o compartimento glandular e ductal.⁴ No compartimento estromal observam-se fibroblastos em meio a colágeno, fibras musculares, filetes nervosos, células inflamatórias como linfócitos e macrófagos, bem como vasos sanguíneos e suas células endoteliais.¹⁸ O compartimento glandular forma estruturas tubulares e acinares, estes, tal como em outras glândulas exócrinas, terminam por secretar através de ductos. Os ductos prostáticos são morfológicamente idênticos aos ácinos, exceto por sua geometria. Ductos, dúctulos e ácinos não podem ser distinguidos microscopicamente, a menos que o corte histológico os mostre através do seu eixo principal.¹ O componente glandular é composto por células luminiais e células basais. A maioria das células é luminal e produtoras da secreção prostática.

Figura 01 - Fotomicrografia da próstata normal

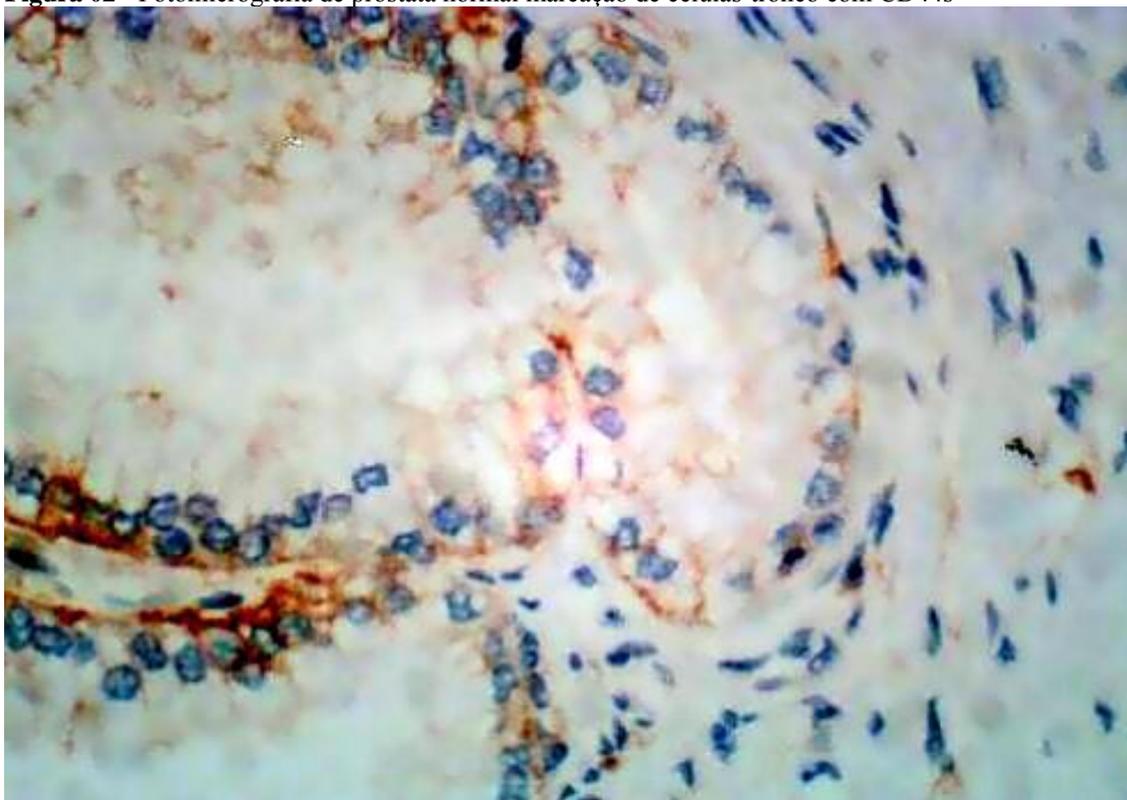


Fonte: Próprio autor.

Legenda: Aumento de 400x de corte histológico em HE de ácino prostático normal demonstra células luminais (seta branca), células basais (seta negra) e células estromais (seta azul).

Acredita-se que o componente basal contenha células com potencial para renovação das células luminais, ou células-tronco, as quais dão origem a células com diferenciação intermediária e posteriormente com diferenciação terminal.^{19; 20; 21} Células-tronco são células com a habilidade de perpetuar a si mesmas, através de autorrenovação, e de diferenciação nas demais células maduras.^{19; 20; 22; 23; 24} Células-tronco não são visíveis ao exame histológico habitual, com colorações por hematoxilina e eosina (HE), para sua identificação são necessárias técnicas como imunohistoquímica, imunofluorescência, microscopia confocal e citometria de fluxo com imunofenotipagem. Tais técnicas utilizam-se de anticorpos marcados contra antígenos presentes nas células alvo, entre os marcadores existentes para células-tronco o anticorpo direcionado à molécula CD44 tem sido bastante utilizado, bem como marcadores para integrinas e CD133^{20; 22; 23; 25} (Figura 02).

Figura 02 - Fotomicrografia de próstata normal marcação de células-tronco com CD44s

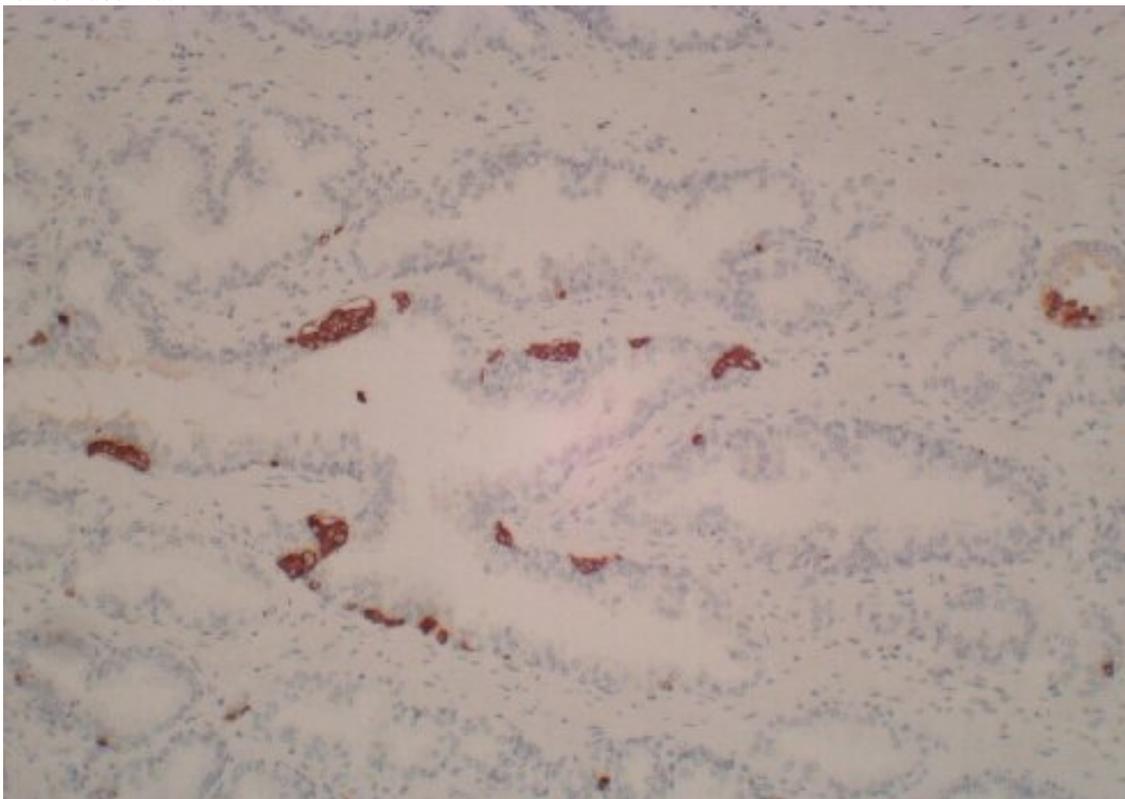


Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica com marcador CD44s, aumento de 400x, em ácino prostático normal. Observa-se marcação em marrom ao redor das células basais.

Outro compartimento de células, também dificilmente visível à microscopia convencional, é representado por pequeno número de células neuroendócrinas, com características intermediárias entre células epiteliais, neurais e endócrinas, o qual se mostra disperso entre as células glandulares e ductais da próstata.¹⁸ As células neuroendócrinas são mais facilmente reconhecidas pela microscopia eletrônica e pela imuno-histoquímica, através de seus grânulos secretórios.^{18; 26} Uma série de grânulos secretórios, principalmente caracterizados na década de 1980, tem sido descrita. Serotonina,²⁷ hormônio estimulante da tireoide (TSH), calcitonina,²⁸ somatostatina,²⁹ paratormônio, histamina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, calcitonina, neuropeptídeo Y, peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo relacionado a bombesina/gastrina, alfa gonadotrofina coriônica humana, colecistoquinina, adrenomedulina, fator de crescimento endotelial vascular, sinaptofisina, neuroenolase (NSE) e componentes do grupo da cromogranina, são alguns entre os mais de 200 componentes relatados.³⁰ Entre os grânulos secretores, a cromogranina A mostra-se um bom marcador para diferenciação neuroendócrina nas células prostáticas normais e neoplásicas^{31; 32} (Figuras 3 e 4).

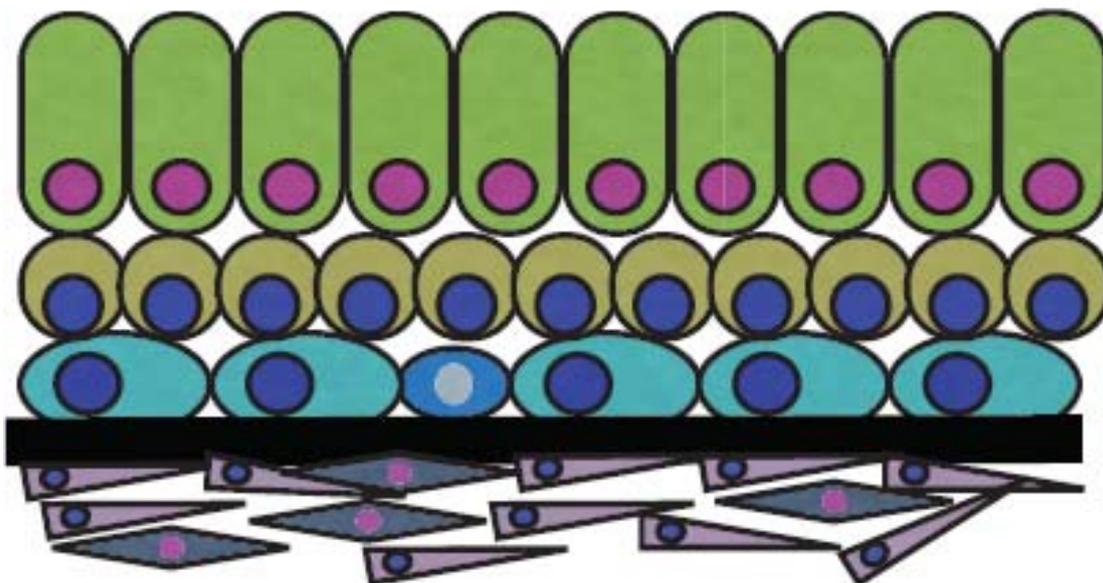
Figura 03 - Fotomicrografia de ácinos e ductos prostáticos normais com marcação para diferenciação neuroendócrina.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica com marcação para cromogranina, aumento de 100x, epitélio prostático normal, observam-se células neuroendócrinas na porção basal epitelial.

Figura 04 - Representação esquemática dos componentes da próstata normal



Fonte: Adaptado de Maitland e Collins, 2008³³

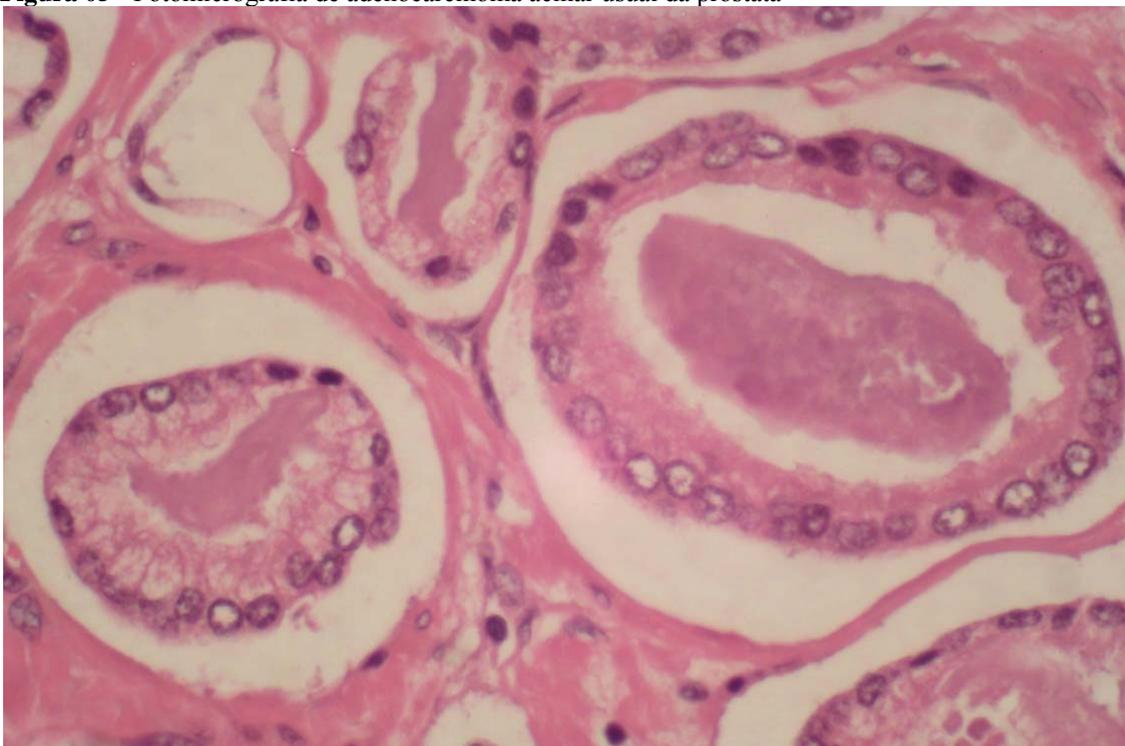
Legenda: Observa-se o componente luminal terminalmente diferenciado (■), células com diferenciação intermediária (■), células basais contendo células-tronco (■) e células neuroendócrinas (■). Há também representação da membrana basal e de células estromais (■).

Produtos de secreção neuroendócrina têm sido encontrados no sêmen, levando à suspeição de que tenham função na regulação dos espermatozoides.³⁴ É proposto que as células neuroendócrinas regulem o crescimento, diferenciação e secreção das células epiteliais, possivelmente por um mecanismo parácrino, endócrino e/ou autócrino.^{26; 35} A própria atividade das células neuroendócrinas pode estar sob regulação do sistema neural, do conteúdo secretado intraluminal e de sinais endócrinos, parácrinos e/ou autócrinos.¹⁸

1.2 O câncer de próstata

A maioria das neoplasias prostáticas são carcinomas do tipo histológico adenocarcinoma na sua variante acinar.³⁶ Adenocarcinomas são neoplasias glandulares de origem epitelial e a sua alta incidência tem relação com a estrutura prostática normal, o adenocarcinoma acinar usual apresenta características morfológicas semelhantes às células epiteliais luminiais da próstata (Figura 05).

Figura 05 - Fotomicrografia de adenocarcinoma acinar usual da próstata



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Corte histológico corado em HE, aumento de 400x, demonstra estruturas acinares, compostas por células semelhantes às células luminiais, infiltrativas do parênquima prostático, sem células basais.

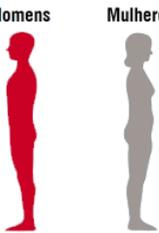
Outra proporção de carcinomas prostáticos são representados pelas variantes do adenocarcinoma acinar como as formas atrófica, pseudo-hiperplásica, de células espumosas, mucinosa, de células em anel de sinete, oncócica, linfoepitelioma-símile e sarcomatoide. Além do adenocarcinoma acinar há o adenocarcinoma ductal, o carcinoma urotelial, as neoplasias escamosas, o carcinoma basal e os carcinomas neuroendócrinos, os quais são menos comuns.^{36; 37}

1.2.1 Epidemiologia

O câncer de próstata é a segunda neoplasia mais prevalente mundialmente, seguindo o câncer de pele não melanoma.³⁸ Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), houve 68.800 novos casos de câncer de próstata no Brasil, em 2014, representando uma taxa de 70,42 casos novos a cada 100 mil homens.³⁸ Estima-se que serão feitos 61.200 novos diagnósticos em 2016.³⁹ No estado do Ceará foram realizados 2.350 novos diagnósticos, em 2014.³⁸ Já nos Estados Unidos da América (EUA) calcula-se que no ano de 2015 foram realizados 220.800 novos diagnósticos e 27.540 mortes ocorreram devido a essa neoplasia, com uma chance de desenvolver câncer de próstata do nascimento até a morte de aproximadamente 15%.⁴⁰ Para o ano de 2016 projetam-se 180.890 novos diagnósticos nos EUA.⁴¹

A Figura 06 sumariza a estimativa da distribuição e a proporção de novos casos de câncer no Brasil entre homens e mulheres, para o ano de 2016, considerando-se os 10 cânceres mais incidentes; a Figura 07 no Nordeste brasileiro e a Figura 08 nos EUA podendo-se observar uma sobreposição de dados, diferindo no número total de diagnósticos.

Figura 06 - Estimativa da distribuição dos 10 principais tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2016

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%		Homens Mulheres	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2016³⁹

Figura 07 - Estimativa da distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Nordeste Brasileiro em 2016

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	14.290	27,1%	Homens 	Mulheres 	Mama Feminina	11.190	20,5%
Estômago	2.940	5,6%			Colo do Útero	5.630	10,3%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.690	5,1%			Cólon e Reto	2.530	4,6%
Cólon e Reto	1.940	3,7%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.100	3,9%
Cavidade Oral	1.880	3,6%			Estômago	1.940	3,6%
Laringe	1.430	2,7%			Glândula Tireoide	1.810	3,3%
Esôfago	1.340	2,5%			Ovário	1.420	2,6%
Sistema Nervoso Central	1.260	2,4%			Corpo do Útero	1.320	2,4%
Leucemias	1.210	2,3%			Cavidade Oral	1.190	2,2%
Linfoma não Hodgkin	1.010	1,9%			Leucemias	1.070	2,0%

Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2016.³⁹

Figura 08 – Estimativa da distribuição proporcional dos 10 tipos mais incidentes de câncer nos EUA em 2016.

			Homens	Mulheres			
Próstata	180,890	21%			Mama	246,660	29%
Pulmões e Brônquios	117,920	14%			Pulmão e Brônquios	106,470	13%
Colo e reto	70,820	8%			Colo e reto	63,670	8%
Bexiga Urinária	58,960	7%			Corpo Uterino	60,050	7%
Melanoma da Pele	46,870	6%			Tireoide	49,350	6%
Linfoma Não Hodgkin	40,170	5%			Linfoma Não Hodgkin	32,410	4%
Rim e Pelve Renal	39,650	5%			Melanoma de Pele	29,510	3%
Cavidade Oral e Faringe	34,780	4%			Leucemia	26,050	3%
Leucemia	34,090	4%			Pâncreas	25,400	3%
Fígado e Vias biliares	28,410	3%			Rim e Pelve Renal	23,050	3%
Todos os sítios	841,390	100%	Todos os Sítios	843,820	100%		

Fonte: Adaptado de Siegel, R.L. et al, 2016⁴¹

O único fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento do câncer de próstata é a idade. Em torno de 62% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em homens acima de 65 anos.³⁸ O envelhecimento das populações associado a fatores relacionados à maior capacidade de diagnóstico e rastreamento, como o antígeno prostático específico (PSA), fizeram com que a incidência do câncer de próstata tivesse um aumento importante nas últimas décadas no Brasil e no mundo.³⁸

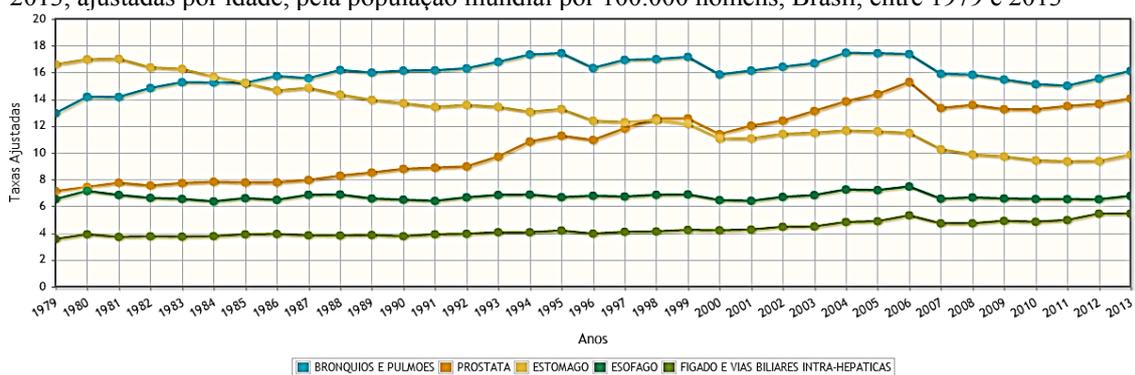
O câncer de próstata tem evolução lenta e aproximadamente 80% dos homens aos 80 anos apresentam adenocarcinoma prostático em necrópsias com causas de óbito diversas, não relacionadas à neoplasia,⁴² levando a afirmação de que a maioria dos homens morre com e não devido ao câncer de próstata. A expectativa de vida para os pacientes com metástases ao diagnóstico tipicamente é maior que 10 anos.⁴³

Apesar de o câncer de próstata apresentar baixa taxa de letalidade e da maioria dos casos serem diagnosticados em estágios precoces, a sua alta incidência faz com que constitua a segunda causa de morte por câncer.⁴⁰ Observa-se que a taxa de

mortalidade brasileira apresenta um perfil ascendente semelhante ao da incidência, embora sua magnitude seja mais baixa.³⁸ A sobrevivência em cinco anos no Brasil é estimada em 95%³⁹ enquanto nos EUA é estimada em 98,9%.⁴⁴

A Figura 09 demonstra a evolução temporal da mortalidade dos cânceres mais prevalentes no Brasil de 1979 até 2013 e a Figura 10 a estimativa de mortes por câncer nos EUA em 2016.

Figura 09 - Evolução temporal da taxa de mortalidade das 5 localizações primárias mais prevalentes em 2013, ajustadas por idade, pela população mundial por 100.000 homens, Brasil, entre 1979 e 2013



Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2015.⁴⁵

Figura 10 - Mortalidade estimada de câncer, por órgão primário, comparativo entre homens e mulheres, com número total e proporção, nos Estados Unidos da América, 2016

	Homens		Mulheres	
Pulmão e Brônquios	85,920	27%	Pulmões e Brônquios	72,160 26%
Próstata	26,120	8%	Mama	40,450 14%
Colo e reto	26,020	8%	Colo e Reto	23,170 8%
Pâncreas	21,450	7%	Pâncreas	20,330 7%
Fígado e ductos biliares	18,280	6%	Ovário	14,240 5%
Leucemia	14,130	4%	Corpo Uterino	10,470 4%
Esôfago	12,720	4%	Leucemia	10,270 4%
Bexiga Urinária	11,820	4%	Fígado e Vias Biliares	8,890 3%
Linfoma Não-Hodgkin	11,520	4%	Linfoma Não Hodgkin	8,630 3%
Cérebro e Sistema Nervoso	9,440	3%	Cérebro e Sistema Nervoso	6,610 2%
Todos os Sítios	314,290	100%	Outros Sítios	281,400 100%

Fonte: Adaptado de Siegel, R.L. et al, 2016⁴¹

1.2.2 Carcinogênese

Apesar de sua alta frequência sabe-se pouco sobre quais são as células alvo das alterações oncogênicas, se células terminais ou células-tronco, as quais representariam as células iniciadoras tumorais, nas lesões primárias e metastáticas do câncer de próstata.³³ Há evidências de que a carcinogênese prostática envolve múltiplas alterações gênicas, incluindo perdas de sequências específicas, as quais podem estar

associadas à inativação de genes supressores tumorais ou ganhos de sequências que podem estar associadas com ativação de oncogenes. As aberrações citogenéticas mais comumente descritas são o ganho do cromossomo 7, ganho do 8q e perdas do 8p, 10q, 16q e 18q.⁴⁶ A fusão entre o gene responsivo a andrógeno TMPRSS2 e os membros da família de fatores de transcrição ETS são encontrados em 70% dos cânceres de próstata e parece ser específica para esse tipo de malignidade.⁴⁷ Outro gene frequentemente superexpresso no carcinoma prostático, mas não no epitélio prostático benigno, é o antígeno do câncer prostático 3 (PCA3), que está localizado no cromossomo 9q21-22.^{48;}

49

1.2.3 Tratamento

Existe uma série de opções para o tratamento do câncer de próstata que, de uma forma geral, dependem do estadiamento, do escore de Gleason, da idade do paciente, da expectativa de vida, da existência de comorbidades e do nível sérico do PSA pré-operatório.⁵⁰

Homens com neoplasia localizada são candidatos a vigilância ativa, cirurgia ou radioterapia.⁵¹ Não havendo informações suficientes para comparar as três formas de tratamento, bem como, observam-se dados divergentes quanto aos resultados obtidos com as diferentes abordagens.^{52; 53; 54; 55} A cirurgia, com prostatectomia radical, é uma intervenção comum para neoplasia localizada, a qual consiste na retirada completa da glândula e das vesículas seminais, por via retropúbica ou perineal; aberta, laparoscópica ou robótica.^{51; 56; 57; 58; 59; 60} Outros tratamentos que podem ser oferecidos em casos selecionados de câncer localizado incluem hormonioterapia primária,⁶¹ ablação por radiofrequência,^{62; 63; 64} crioterapia⁶⁵ e ultrassom de alta frequência localizado (HIFU).⁶⁶

Não existe consenso para o tratamento do câncer de próstata localmente avançado (T3, NX/+ M0), cirurgia, radioterapia, hormonioterapia e quimioterapia tem sido empregadas isoladamente ou em combinação.^{67; 68; 69; 70; 71}

Para pacientes com doença disseminada a terapia hormonal é uma das principais formas de abordagem.⁷² O conceito de terapia hormonal para o controle de doenças prostáticas remonta ao século XVIII,⁷³ sendo que há relatos de orquiectomias para tratamento de “hiperplasia prostática” realizadas no século XIX.⁷⁴ O estabelecimento da regulação entre hipófise, testículo e próstata data do início do século XX.⁷³ Em 1967 relatou-se que as células prostáticas normais e as neoplásicas sofriam

atrofia e regressão depois da retirada dos testículos.⁷⁵ Posteriormente, descobriu-se que a privação hormonal deflagrava redução na atividade proliferativa e indução da apoptose.⁷⁶ A análise histológica dos espécimes de pacientes que foram submetidos a tratamento neoadjuvante por 3 a 6 meses, mostra alterações regressivas, como atrofia e metaplasia escamosa nos ductos e ácinos não neoplásicos, vacuolização citoplasmática, picnose nuclear e fibrose nas áreas tumorais.⁷⁷ Os métodos de tratamento endócrino incluem a castração cirúrgica, ou orquiectomia, e a castração medicamentosa. A castração medicamentosa pode ser atingida com o uso de estrógenos sintéticos, como o dietilestradiol, com os análogos ou antagonistas do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), com a inibição da síntese androgênica e/ou com os antiandrogênicos.⁷³ Estas terapias podem ser usadas em isolado ou em combinação, atentando para a o bloqueio testicular e adrenal.⁷⁸

Uma minoria dos pacientes com neoplasia localizada desenvolve recorrência tumoral com resistência a terapêutica hormonal.⁷⁹ A resistência à terapêutica de privação androgênica é um passo fundamental na aquisição de agressividade tumoral e evolução fatal. Virtualmente todos os pacientes com neoplasia prostática metastática apresentam uma resposta inicial à privação hormonal, porém acabam tendo evolução fatal devido ao estado de insensibilidade androgênica.⁷⁶ O mecanismo pelo qual as células neoplásicas se tornam hormônio-independentes não é de todo conhecido, bem como quando essas alterações ocorrem.⁸⁰ Evidências de que as alterações são prévias à terapêutica podem ser vistas, por exemplo, no artigo de Cher et al, 1996,⁸¹ o qual, analisando as sequências gênicas de adenocarcinomas prostáticos metastáticos, sem tratamento prévio, com adenocarcinomas que desenvolveram estado de irresponsividade androgênica, observou que as análises quantitativas do DNA desses pacientes eram bastante semelhantes. Porém, Marcelli et al, 2000,⁸² demonstrou que mutação no receptor de andrógeno (RA) é mais comum em carcinomas metastáticos que em carcinomas primários. Koivisto et al, 1997,⁸³ demonstrou amplificação dos receptores de andrógeno em 28% dos pacientes que desenvolveram falência terapêutica após terapia de privação hormonal, porém não encontraram amplificação em nenhum dos tumores primários prévios ao tratamento, concluindo que a resistência à privação hormonal pode ser consequência da expansão clonal de células capazes de proliferar mesmo com baixos níveis de andrógeno.

Segundo o artigo de revisão de Feldman et al, 2001,⁸⁰ cinco mecanismos têm sido responsabilizados pelo desenvolvimento de independência androgênica, sendo

eles a hipersensibilidade a baixos níveis de andrógenos, mutação ou alteração dos correguladores dos RAs, ativação dos receptores de esteróides independentes de ligação (caminho criminoso – outlaw pathway), seleção de células contendo caminhos alternativos para inibição da apoptose e desenvolvimento de subpopulação de células tumorais andrógeno-independentes presentes previamente ao tratamento e que se desenvolveriam após a ablação hormonal, como as células-tronco e células neuroendócrinas neoplásicas.

Além da hormonioterapia, pacientes com neoplasia metastática ou hormônio insensível são candidatos à quimioterapia.^{84; 85; 86; 87; 88} Drogas como o docetaxel, estramustina e mitoxantrona podem ser indicadas.^{89; 90; 91}

Sintomas obstrutivos podem ser tratados com ressecções prostáticas transuretrais (RTU).⁹²

Múltiplas formas alternativas para o tratamento do câncer avançado têm sido pesquisadas e uma das mais promissoras é a terapia alvo envolvendo imunoterapia.^{93; 94; 95}

1.3 Fatores de prognóstico

A despeito do desconhecimento da patofisiologia inicial do câncer de próstata e das contradições referentes à melhor forma de abordagem, uma grande quantidade de trabalhos já foi realizada no intuito de se avaliar fatores que possam prever a evolução dos pacientes, ou fatores prognósticos.⁹⁶

A busca por fatores prognósticos e possíveis alvos terapêuticos para doenças neoplásicas e não neoplásicas tem se intensificado acentuadamente nas últimas décadas.⁹⁷ Fatores prognósticos permitem prever eventos futuros e podem ser intrínsecos à pessoa ou à comorbidade.⁹⁷ Idealmente devem estar livres da subjetividade do observador, devem ser úteis e praticáveis na clínica e deveriam estar presentes no início do curso clínico da doença.⁹⁷ O câncer de próstata, por ser uma neoplasia de curso indolente na maioria dos casos, acaba tendo uma atenção especial em relação a fatores que possam prever evolução.

A dosagem de PSA pré-operatório, escore de Gleason, estadiamento TNM e margens cirúrgicas são considerados como comprovadamente úteis no manejo clínico dos pacientes conforme a classificação do Colégio Americano de Uropatologistas (ISUP) de 1995.^{98; 99} Classificação posteriormente reproduzida pela Organização

Mundial da Saúde (OMS) em 2004.³⁶ Fatores estes que serão discutidos na sequência e utilizados para elaboração deste trabalho.

Volume tumoral, tipo histológico e a ploidia tumoral são fatores que têm sido extensivamente estudados, porém, sua importância ainda precisa ser validada por estudos estatisticamente robustos.³⁶ Invasão perineural, diferenciação neuroendócrina, densidade de microvasos, morfometria nuclear e marcadores moleculares são fatores insuficientemente estudados para provar seu valor prognóstico.³⁶

1.3.1 Antígeno prostático específico (PSA)

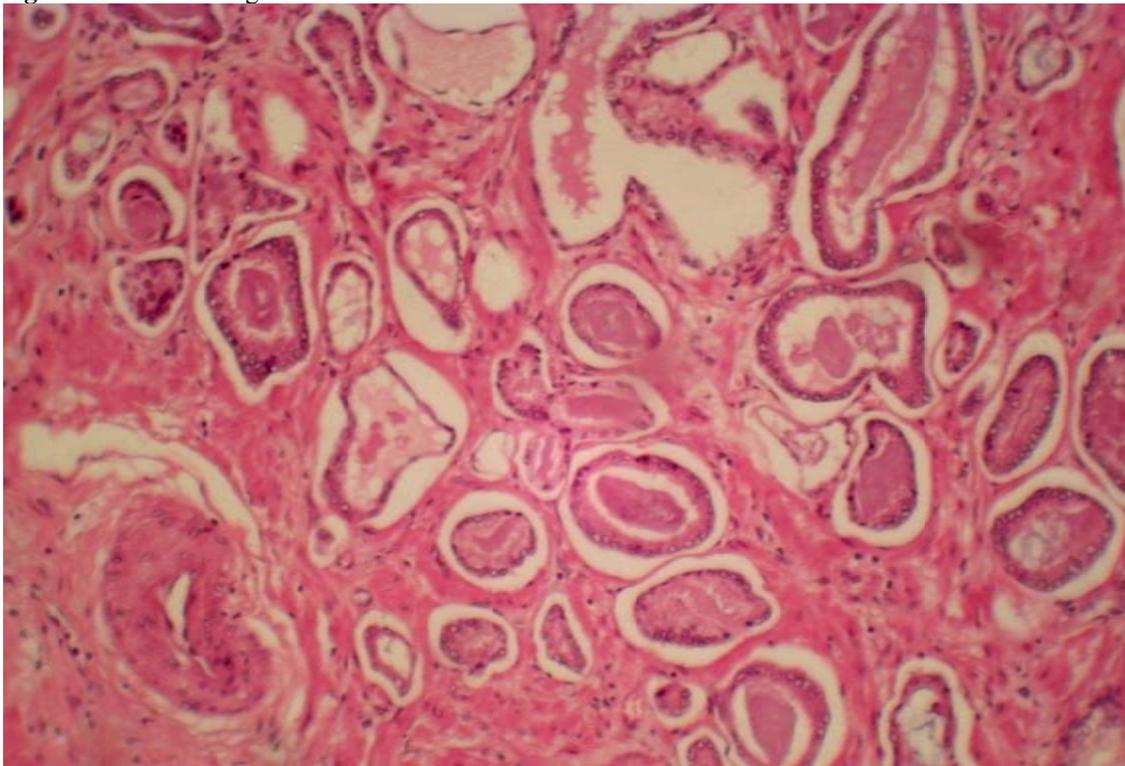
O PSA é uma glicoproteína de 237 aminoácidos, com função de protease, membro da família das calicreínas, secretado quase que exclusivamente pelo epitélio prostático e que tem função de dissolução do coágulo seminal em gel, permitindo a migração dos espermatozoides em direção ao óvulo.^{8; 100; 101; 102} O PSA trouxe grande contribuição à prática médica urológica, sendo capaz de identificar desde tumores indolentes até tumores extraprostáticos. Atualmente o PSA está incluído em todos os algoritmos de diagnóstico e prognóstico, sendo um dos melhores marcadores tumorais em oncologia.¹⁰⁰

O nível sérico de PSA aumenta em diferentes doenças prostáticas, incluindo o câncer e é rotineiramente utilizado para detecção precoce, como fator prognóstico e de recorrência tumoral, estando elevado acima de 4 ng/ml na maioria dos pacientes com câncer.^{36; 100; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; 110}

1.3.2 Escore de Gleason

O escore de Gleason foi proposto por Donald F. Gleason em 1966 e baseia-se na arquitetura glandular microscópica da neoplasia.¹¹¹ Apresenta cinco padrões histológicos com diferenciação decrescente. Os padrões 1, 2 e 3 mantêm a polaridade epitelial com diferenciação luminal em virtualmente todas as glândulas (Figura 11). No padrão 4 há perda parcial da polaridade (Figura 12). No padrão 5 há quase total perda da polaridade com diferenciação luminal ocasional (Figura 13).

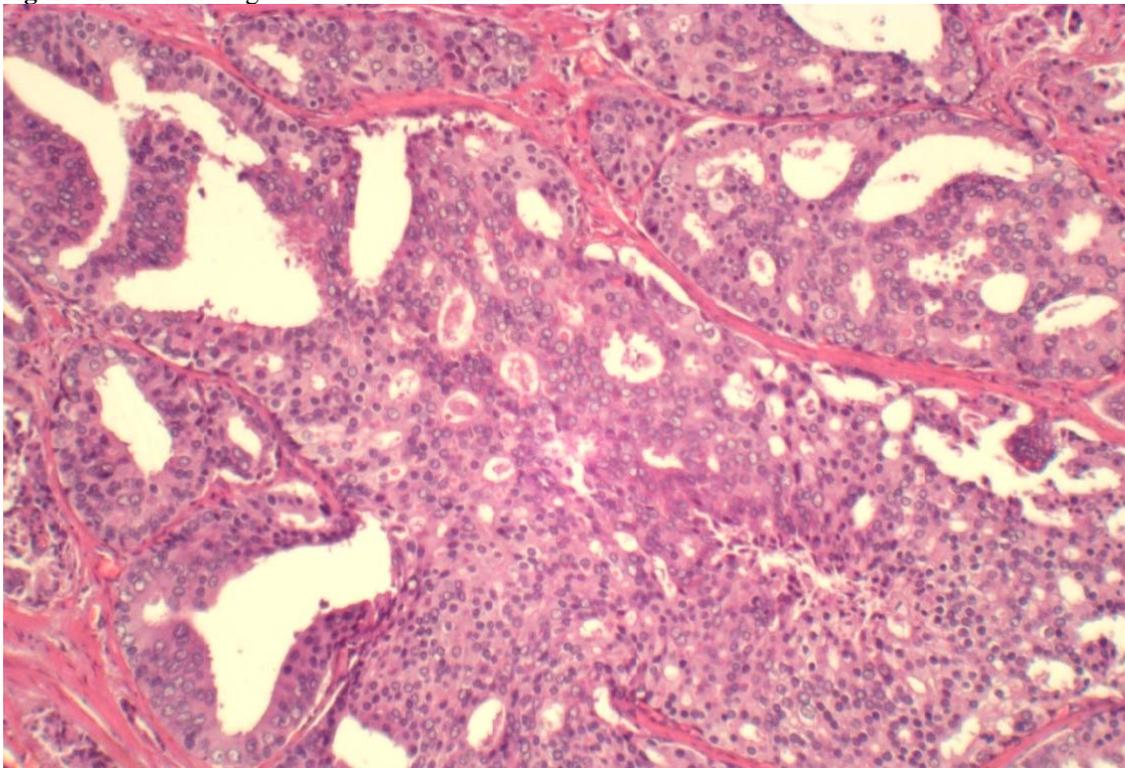
Figura 11 - Fotomicrografia adenocarcinoma acinar Gleason 3



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Corte histológico corado em HE, 100x, estruturas acinares infiltrativas, irregulares, mantendo a polarização celular e luzes amplas.

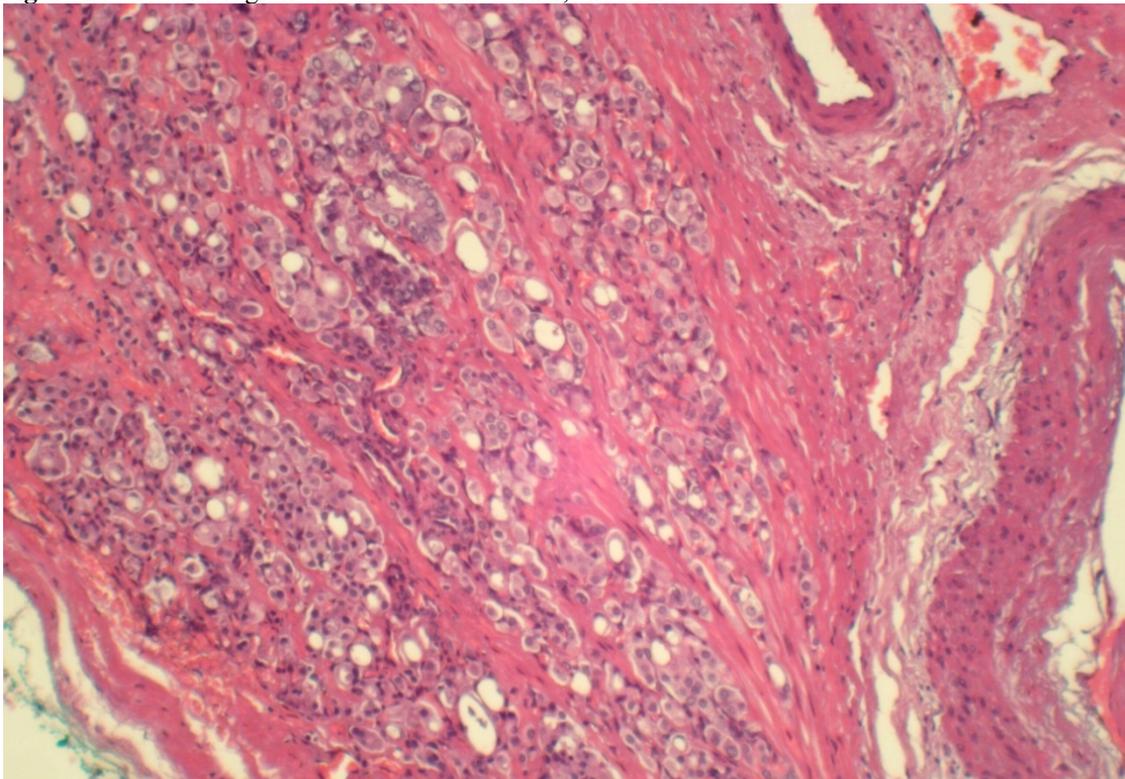
Figura 12 - Fotomicrografia adenocarcinoma acinar Gleason 4



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Corte histológico corados em HE, 100x, perda da organização acinar, havendo glândulas justapostas em padrão cribriforme (em peneira), infiltrando estroma.

Figura 13 - Fotomicrografia adenocarcinoma acinar, Gleason 5



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Corte histológico corado em HE, 100x, neoplasia composta por células isoladas ou em blocos infiltrado o estroma, ocasionalmente formando luzes.

Avalia-se o padrão mais prevalente, ou primário, e o menos prevalente, ou secundário, somando-se os padrões o que resulta no escore de Gleason.³⁶ Os escores de Gleason secundários devem corresponder a mais de 5% da neoplasia.³⁷

Desde a sua descrição original, algumas modificações foram realizadas na forma de se avaliar o escore, como por exemplo, a maioria das neoplasias previamente categorizadas como Gleason 1, mostram-se ser proliferações benignas na imunohistoquímica¹¹² e todos os padrões ditos cribriformes e glomeruloides, passaram a ser considerados como Gleason 4.^{37; 112; 113; 114}

O escore de Gleason está fortemente associado com o prognóstico e provavelmente um dos melhores preditores de evolução do câncer de próstata.^{115; 116}

1.3.3 Estadiamento

O estadiamento pode ser dividido em clínico e patológico. O estadiamento clínico utiliza parâmetros pré-tratamento para prever a extensão da doença.⁴³ Comumente são utilizados os dados do exame de toque retal, os níveis de PSA sérico,

os achados histológicos de biópsias (Gleason e extensão) e os achados radiográficos, dividindo os pacientes em estádios com tumores não palpáveis e tumores palpáveis.¹¹⁷

O estadiamento patológico é baseado no exame de prostatectomias radicais e linfonodos pélvicos, determinando-se a extensão da neoplasia.⁴³

O estadio clínico T1 corresponde a tumores detectados incidentalmente na análise histopatológica, principalmente de ressecções transuretrais e enucleações, não identificados clinicamente pelo toque retal e exames de imagens, inexistindo no estadiamento patológico.¹¹⁸ O estadio clínico T2 aplica-se a tumores confinados à próstata com tumores palpáveis ao toque retal e/ou visualizados em exames de imagem, com confirmação histológica de neoplasia.¹¹⁸ Estádios clínicos T1 e T2, N0 e M0, são considerados cânceres localizados. O estadio clínico T3 corresponde a tumores com extensão extraprostática para tecidos adjacentes à próstata ou às vesículas seminais, avaliados pelo toque retal e/ou por exames de imagem e/ou exame histológico.¹¹⁸ O estadio clínico T4 corresponde a tumores fixos ou que grosseiramente infiltraram o colo vesical, o esfíncter anal externo, o reto, os músculos elevadores e/ou a parede pélvica.¹¹⁸

O Quadro 01 apresenta o estadiamento baseado em características do tumor (T) conforme o “American Joint Committee on Cancer”, 2010.¹¹⁸

Quadro 01 - Estadiamento do câncer de próstata conforme AJCC , 2010¹¹⁸

TX	Tumor primário não encontrado
T0	Sem evidências de tumor primário
T1	Tumor não identificado clinicamente pela palpação e por exames de imagem
T1a	Tumor identificado incidentalmente em exame histológico representando 5% ou menos do tecido ressecado.
T1b	Tumor identificado incidentalmente em exame histológico representando mais de 5% do tecido ressecado.
T1c	Tumor identificado em biópsia (por exemplo devido ao aumento do PSA).
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor envolve metade ou menos de um dos lobos
T2b	Tumor envolve mais da metade de um lobo
T2c	Tumor envolve os dois lobos
T3	Tumor se estende além da cápsula prostática
T3a	Tumor apresenta extensão além da cápsula prostática ou infiltra colo vesical
T3b	Tumor invade vesículas seminais
T4	Tumor fixo ou que se invade estruturas adjacentes, excluindo-se a vesícula seminal

Fonte: AJCC, 2010¹¹⁸

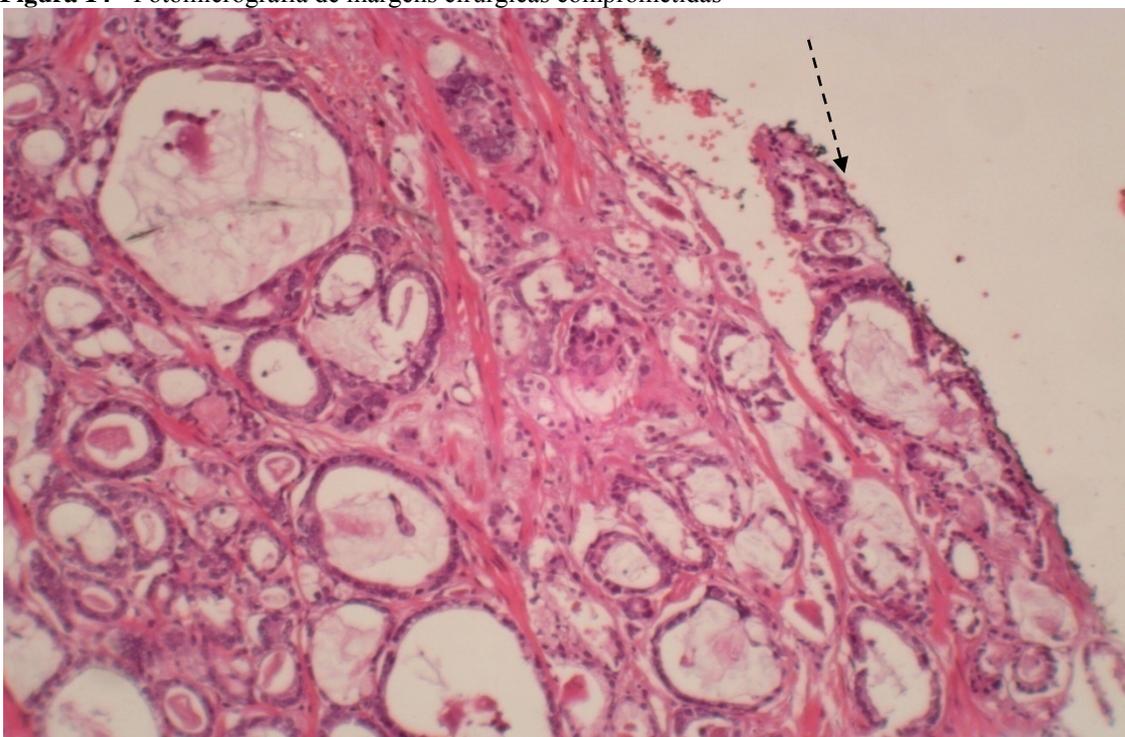
É bem documentado que a presença de neoplasia além dos limites prostáticos e a infiltração da vesícula seminal (estadiamento pT3) estão associados a maiores taxas de recorrência bioquímica.³⁷ Pacientes com extensão extraprostática e infiltração da vesícula seminal concomitantemente apresentam pior prognóstico.¹¹⁹

O estadiamento é um dos mais importantes índices de prognóstico para recorrência e mortalidade por câncer de próstata.³⁷

1.3.4 Margens cirúrgicas

As margens cirúrgicas são avaliadas em exame histopatológico, onde se observa a presença ou não de neoplasia na região de ressecção da próstata.¹²⁰ A permanência de câncer residual após a cirurgia é indicativo da impossibilidade de se ressecar toda a neoplasia no ato operatório (Figura 14).

Figura 14 - Fotomicrografia de margens cirúrgicas comprometidas



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Corte histológico corado em HE, 100x, presença de adenocarcinoma acinar presente na área de ressecção cirúrgica, evidenciada pela presença de tinta naquin negra (seta).

A presença de neoplasia nas margens de ressecção cirúrgicas representa um fator prognóstico bem definido para recorrência tumoral, porém, não está bem definido se margens cirúrgicas positivas são indicativas de aumento nas taxas de mortalidade por câncer após prostatectomias.^{37; 121; 122}

Em geral, há forte correlação entre os quatro parâmetros descritos, por exemplo, os níveis séricos de PSA se correlacionam com volume tumoral, estadiamento e graduação de Gleason.⁴³

1.3.5 Marcadores de prognóstico moleculares e imuno-histoquímicos

Uma série de marcadores de prognóstico moleculares tem sido pesquisados com certa inconstância e inconsistência nos resultados obtidos, entre eles pode-se citar o gene de fusão TMPRSS2-ERG,^{123; 124; 125; 126} o aumento da expressão do PCA3,^{127; 128; 129; 130; 131; 132; 133; 134; 135} o aumento do Bcl2,^{136; 137; 138} mutações do p53,^{139; 140} a perda de expressão do PTEN,¹⁴¹ alterações do p21^{142; 143} e do p27Kip1.^{144; 145; 146} Múltiplos marcadores imuno-histoquímicos têm sido propostos, podendo-se acreditar que os mais promissores sejam o aumento na expressão do Ki67, perda da expressão do PTEN, expressão anormal do p53, perda do NKX3.1 e expressão anormal do C-MYC, porém a maior limitação observada nos estudos desses marcadores é a não validação por estudos prospectivos.¹⁴⁷

1.4 Recorrência bioquímica

Antes do advento do PSA, a recorrência neoplásica pós-prostatectomia e/ou radioterapia era baseada na avaliação clínica com evidências de massa palpável na próstata ou na fossa prostática ou pela presença de metástases em exames de imagem, e conceituada como recorrência clínica.¹⁴⁸ O monitoramento com PSA permitiu a detecção da recorrência bioquímica, muitos anos antes do desenvolvimento de doença clínica. A recorrência bioquímica indica a probabilidade de um paciente tratado por câncer de próstata permanecer livre de doença manifesta pelo aumento do PSA e é um bom preditor ao se observar a longa expectativa de vida dos pacientes.¹¹⁸ A incidência de recorrência bioquímica varia a depender de uma série de fatores sendo observada em aproximadamente 15 a 40% dos pacientes que receberam tratamento localizado.¹⁴⁹ As definições de recorrência e os pontos de corte variam conforme o método de detecção e o tratamento empregado. Muitos dos homens que apresentam recorrência bioquímica não apresentam recorrência clínica e não vão a óbito pela neoplasia prostática.¹⁴⁹ Considera-se haver controle da doença após cirurgia quando os níveis de PSA atingem o nadir menor que 0,2 ng/ml, 60 a 90 dias do pós-operatório, após esse período, salvo raras exceções, valores maiores são traduzidos como recorrência bioquímica.^{100; 150}

1.5 Diferenciação neuroendócrina neoplásica e células-tronco cancerígenas

Em 1971 relatou-se a existência de células argentafins, células com afinidade pela prata em 50 casos de adenocarcinoma prostático.¹⁵¹ Posteriormente essas células argentafins foram renomeadas como células neuroendócrinas. Tal descoberta levou a uma corrida para se entender seu potencial papel prognóstico e regulatório no câncer de próstata. A partir de 1980 começaram a surgir trabalhos demonstrando a negatividade das células neuroendócrinas para receptores de andrógeno (RA).¹⁵² Hipotetizou-se extensamente sobre a correlação entre as células neuroendócrinas e o estado de resistência androgênica com possível pior evolução. Bem como progressão dos adenocarcinomas para neoplasias neuroendócrinas de alto grau a partir das células neuroendócrinas neoplásicas negativas para RA, concluindo-se que as células neuroendócrinas poderiam crescer e sobreviver em ambiente livre de estimulação androgênica.¹⁵² Receptores para produtos secretados por células neuroendócrinas têm sido reconhecidos nas células epiteliais prostáticas normais e neoplásicas.¹⁸ Em última instância, a secreção de fatores moduladores das células neuroendócrinas causa crescimento, diferenciação, transformação e infiltração tumoral, através de receptores acoplados a proteína G via cAMP, proteína quinase A, tirosina quinase e MAP quinases.¹⁵³

Segundo a OMS,^{36; 37} os adenocarcinomas e os carcinomas prostáticos contendo ou compostos por células neuroendócrinas são classificados como adenocarcinomas com diferenciação neuroendócrina; carcinomas neuroendócrinos de alto grau de pequenas ou grandes células e tumores carcinoides. Sendo que a maioria dos carcinomas neuroendócrinos de alto grau da próstata corresponde à progressão de adenocarcinomas usuais tratados ou não tratados ou são concomitantes a estes.³⁶

Outro tópico sobre a diferenciação neuroendócrina neoplásica que tem despertado atenção científica, é a origem dessas células e qual o mecanismo molecular subjacente do seu desenvolvimento.¹⁸

As células neuroendócrinas neoplásicas poderiam ser provenientes das células neuroendócrinas normalmente presentes na próstata;¹⁵⁴ porém, células neuroendócrinas normalmente presentes na próstata perdem sua capacidade proliferativa representando células com diferenciação terminal¹⁵⁵ e dificilmente seriam precursoras das neoplasias com diferenciação neuroendócrina.¹⁵⁶

Células neuroendócrinas neoplásicas compartilham mutações com as células epiteliais do adenocarcinoma prostático e a hipótese de migração de células de outros órgãos para a próstata tem sido abandonada.¹⁵⁷

As células neuroendócrinas poderiam ser provenientes de células-tronco cancerígenas ou células epiteliais multipotentes,^{156; 158; 159} ou poderiam ter origem da transdiferenciação das células epiteliais malignas para células com fenótipo neuroendócrino.^{157; 159} Estas hipóteses têm se mostrado bastante promissoras, observando-se certa sobreposição nestes mecanismos.¹⁵⁷

Células-tronco cancerígenas (cancer-initiating cells) têm sido definidas como uma população específica de células transformadas que apresentam crescimento em série quando transplantadas em modelos xenográficos. Ao contrário das células-tronco não cancerígenas podem apresentar instabilidade genética e heterogeneidade.¹⁶⁰ Estudos recentes, demonstram a associação com fatores de desdiferenciação celular a células-tronco cancerígenas, além de transdiferenciação com indução de fenótipo neuroendócrino relacionado aos genes ou produtos dos genes da família MYC, principalmente o N-MYC, associado a Aurora Quinase A (AURKA)^{157; 161} *In vitro* observou-se plasticidade entre os fenótipos das células tumorais, podendo-se obter células com diferenciação neuroendócrina a partir de células não neuroendócrinas. A deprivação hormonal é a via clássica para transdiferenciação, outras vias foram descritas, como por exemplo, a ação indutora de componentes de sistema inflamatório (interleucina 6 e interleucina 1Beta) e a ação inibitória da interleucina 2,¹⁶² porém, ainda é necessário demonstração de que sejam independentes da sinalização androgênica.¹⁸ Dessa forma, acredita-se que pacientes tratados por longos períodos com terapia de deprivação hormonal, desenvolvam carcinomas neuroendócrinos agressivos, ou pela seleção de células-tronco cancerígenas que se diferenciam em células neuroendócrinas, ou pela indução da transdiferenciação de células epiteliais malignas em células neuroendócrinas de alto grau. O papel prognóstico da presença de células neuroendócrinas nas fases iniciais do carcinoma, ou seja, em cânceres localizados, ou a presença de células-tronco, nessa fase inicial, ainda está por ser definido.

1.6 Fatores indutores de diferenciação neuroendócrina e de células-tronco

1.6.1 Família MYC

O gene MYC foi originariamente descrito por Ivanov et al, em 1964¹⁶³ como um oncogene transfectado para retrovírus aviário (V-MYC) capaz de induzir diversas neoplasias. Na sequência foi descrito o seu homólogo celular C-MYC^{164; 165} e os demais componentes da família de protooncogenes, N-MYC e L-MYC.¹⁶⁵ As proteínas codificadas pela família MYC localizam-se preferencialmente no núcleo celular e sua expressão correlaciona-se com atividade proliferativa, diferenciação celular e tumorigênese. A expressão do MYC é regulada por uma série de moléculas como fatores de crescimento, citocinas, mitogênicos, interleucina 2, fator estimulante de colônia de macrófagos, Epo, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento derivado de plaquetas, TGFβ e Interferon gama.^{166; 167; 168; 169; 170; 171; 172} A superexpressão de MYC em condições não fisiológicas leva a uma menor necessidade de fatores de crescimento, bloqueio da saída do ciclo celular e divisão celular acelerada, porém, na ausência de fatores de sobrevivência MYC leva à apoptose.^{173; 174; 175} Os níveis de MYC diminuem durante a fase terminal de diferenciação de muitas células e a manutenção de sua expressão inibe ou modula a diferenciação terminal. A forma mais comum em que o MYC está envolvido no câncer é através da superexpressão e desarranjo dos mecanismos reguladores de sua atividade. Diversos tumores apresentam rearranjos genéticos do MYC, como translocações, ampliações e inserções virais, na maioria das vezes levando ao aumento da expressão e raramente a formas mutantes. O aumento da expressão dá-se principalmente pelo aumento da transcrição, pela estabilização do RNA mensageiro (mRNA) e associação com a proteína produto do gene Ras. Proteínas mutadas podem ser mais estáveis, o efeito da estabilização é desconhecido, mas pode levar a um aumento na atividade transcricional promovida pelo MYC. A superexpressão do MYC pode ainda levar à instabilidade genética, à imortalização celular, à redução na adesão celular à matriz, à angiogênese e à hipertrofia celular, fatores que colaborativamente permitem a progressão tumoral.^{165; 176; 177; 178; 179;}¹⁸⁰ Além disso, a introdução de um pool de genes, incluindo o C-MYC podem transformar fibroblastos adultos em cultura em células-tronco.¹⁸¹

Os componentes da família MYC apresentam localizações diferentes em cromossomos humanos normais, o C-MYC localiza-se no braço longo do cromossomo 8 (8q24);¹⁸² o N-MYC localiza-se na porção distal do braço curto do cromossomo 2 (2p23-24)¹⁸³ e o L-MYC localiza-se no braço curto do cromossomo 1 (1p32).¹⁸⁴

Alterações do N-MYC são predominantemente implicadas em carcinomas neuroendócrinos de alto grau e em neoplasias com diferenciação neural e

neuroendócrina.¹⁸⁵ O fato de N-MYC não ser expresso normalmente em tecidos adultos, mas o ser em tumores do sistema nervoso e em tumores com diferenciação neural sugere uma correlação com sua expressão e a desdiferenciação para células-tronco neuronais.¹⁸⁵ Dano a N-MYC é bastante prevalente em tumores com derivação neuroectodérmica,¹⁸⁶ sendo que o entendimento dos eventos regulatórios do N-MYC é principalmente originário de estudos em neuroblastomas, neoplasia neural com diferenciação neuroendócrina.¹⁸⁷ Há forte correlação entre amplificação do N-MYC e agressividade de neuroblastomas,¹⁸⁸ bem como a sua superexpressão imunohistoquímica pode estar associada a maior agressividade tumoral.¹⁸⁹

Há poucos estudos sobre alterações do N-MYC no câncer de próstata e os existentes são recentes e focados na transdiferenciação do adenocarcinoma usual para carcinoma neuroendócrino. Experimentos “in vitro” demonstram que a superexpressão da N-MYC ou da AURKA em células RWPE-1 (células prostáticas benignas) leva a indução de marcadores neuroendócrinos.¹⁵⁷ Células knockout para AURKA perdem a expressão da neuroenolase (NSE).¹⁵⁷ Células LNCaP (células de adenocarcinoma usual) estavelmente transfectadas com N-MYC, passam a apresentar morfologia de carcinomas neuroendócrinos, positivas para neuroenolase e reduzem a expressão de genes relacionados com a expressão de RA.¹⁵⁷ N-MYC liga-se às sequências promotoras de NSE, SYP (sinaptofisina) e RA, sugerindo uma modulação direta do fator de transcrição na diferenciação neuroendócrina.¹⁵⁷ Carcinomas neuroendócrinos demonstram baixa expressão de genes conhecidos com a regulação da expressão dos RA – KLK3 (PSA), TMPRSS2 e NKK3.1 e alta expressão de genes associados a expressão neuroendócrina – CGA (cromogranina) e SYP.¹⁵⁷

1.6.2 Aurora Quinase A (AURKA)

A aurora quinase é uma serina/treonina quinase essencial para a segregação dos centrômeros durante a mitose.¹⁹⁰ Faz parte de uma família composta pela Aurora quinase A, B e C em mamíferos.¹⁹¹ As três formas da Aurora quinase parecem ser fundamentais para a mitose e meiose, porém a Aurora quinase A (AURKA) tem recebido bastante atenção pelo seu papel na oncogênese.¹⁹¹ A ativação e a degradação da AURKA no início e no fim da mitose envolvem múltiplas proteínas regulatórias induzidas no tempo e no espaço.¹⁹¹ Fora do ciclo celular, a sua ativação é importante em processos de transformação maligna com influência na dinâmica dos microtúbulos,

migração celular, polaridade celular e regulação do cálcio.¹⁹¹ Detecção da expressão citoplasmática da AURKA em células mamárias de aspecto morfológico normal, na periferia de neoplasias, está associado a alterações cromossômicas, sugerindo ser a alteração da AURKA um fator precoce na tumorigênese.¹⁹⁰

O gene da AURKA está situado no braço longo do cromossomo 20 (20q13.2), locus frequentemente amplificado em tumores sólidos e a amplificação é, em termos, responsável pelo aumento de sua expressão, sendo que aumentos da AURKA podem ser vistos sem rearranjo gênico e são causados pela estabilização protéica com redução da degradação.¹⁹¹ Proteínas estabilizadoras da AURKA estão elevadas por si mesmas no câncer.¹⁹¹ A amplificação ou superexpressão da AURKA está relacionado com instabilidade genômica e aneuploidia em tumores de próstata, mama, cólon, ovário, cérvix e neuroblastomas. A superexpressão da AURKA se relaciona com aumento do número de centrosomos e formação de fusos mitóticos multipolares.¹⁹¹

Interações entre AURKA e os membros da família MYC (N-MYC e C-MYC) frequentemente contribuem para a carcinogênese.^{191; 192} N-MYC e AURKA formam um ciclo de realimentação positivo, a expressão da AURKA é induzida pelo N-MYC e a expressão da AURKA leva a estabilização do N-MYC¹⁹³ por interação física direta¹⁵⁷ e/ou inibição do sistema de degradação SCF^{Fbxw7}.¹⁹³ O bloqueio da AURKA leva à redução da expressão de diversos genes regulados pelo N-MYC, com inibição da proliferação de células em cultura.¹⁹³

Em modelos experimentais com linfomas observou-se aumento da transcrição da AURKA induzida pelo C-MYC.¹⁹⁴ A superexpressão da AURKA aumenta a expressão e a atividade transcricional do C-MYC e a inibição do C-MYC diminui o potencial oncogênico da AURKA resultando em redução da taxa proliferativa e da formação de fusos mitóticos aberrantes.¹⁹² A expressão ectópica de AURKA induz atividade de telomerasas em células epiteliais mamárias e ovarianas e o bloqueio do C-MYC inibe a atividade de telomerase induzida pela AURKA.¹⁹⁵

Superexpressão de Aurora Quinase B pode ser vista em menor grau em adenocarcinoma usuais e carcinomas neuroendócrinos prostáticos e Aurora quinase C é minimamente expressa.¹⁵⁷

1.6.3 CD44s

O CD44 é uma glicoproteína de membrana responsável pela adesão célula-célula e célula matriz.^{196; 197; 198; 199; 200} CD44, integrinas e caderinas, são moléculas de adesão que além de suas funções de fixação e manutenção da integridade do tecido, têm sido implicadas na transdução de sinais que alteram o comportamento celular através da formação de complexos compostos por ligantes extracelulares, receptores de tirosina quinase e proteínas do citoesqueleto.¹⁹⁸ As interações com fatores do microambiente acabam participando em processos como regulação do crescimento, sobrevivência, diferenciação e mobilidade.¹⁹⁸ Células positivas para CD44 expressam genes relacionados a propriedades de células-tronco, como o C-MYC, com capacidades intrínsecas de células progenitoras, que as permite apresentar autorrenovação, capacidade proliferativa por longos períodos e capacidade para darem origem a outros tipos celulares.²⁰¹ Como consequência, a expressão de CD44 tem sido bastante utilizada para identificar células-tronco cancerígenas.¹⁶⁰

Por outro lado, e fato bastante antagônico ao descrito acima, células que não expressam CD44 tem menor ligação com o ácido hialurônico, o que teoricamente aumenta o potencial tumorigênico e metastático.²⁰²

Outra característica interessante relacionada ao CD44 é que carcinomas neuroendócrinos prostáticos de alto grau o expressam difusamente.^{203; 204} Além disso essa expressão de CD44 pode ser induzida pela secreção do fator neuroendócrino calcitonina.²⁰⁵

O gene do CD44 apresenta no mínimo 19 éxons com 10 deles podendo ser combinados de forma alternativa com o potencial de gerar diversas isoformas.²⁰⁶ A menor forma do CD44 ou CD44s (standard), é universalmente expresso em vertebrados^{198; 207} apresenta um domínio extracitoplasmático capaz de se ligar ao ácido hialurônico e ao colágeno e uma porção intracitoplasmática que se liga ao citoesqueleto.^{197; 208; 209} CD44s tem sido detectado em linfócitos, macrófagos, granulócitos, fibroblastos e células epiteliais.¹⁹⁷ Há no mínimo outras 15 formas do CD44 ou CD44v (variantes), as quais possuem a mesma sequência terminal diferindo na sua porção central.^{197; 198} As diversas formas do CD44v são expressas em uma pequena proporção de células epiteliais e em diversas formas de câncer.^{198; 210} No adenocarcinoma de próstata tem sido demonstrado o CD44s e CD44v.¹⁹⁷ A pesquisa de células-tronco neoplásicas no câncer têm se baseado em marcadores pan-CD44 que não diferenciam as formas CD44s e CD44v.¹⁶⁰

Frente ao exposto, justifica-se o estudo de novos marcadores de prognóstico do câncer de próstata, uma vez que grande número de homens receberá o diagnóstico de neoplasia, porém, uma pequena proporção destes irá a óbito pelo câncer. Sendo necessário identificar pacientes sob maior risco para evolução desfavorável e merecedores de tratamentos mais agressivos, bem como pacientes de baixo risco, evitando-se tratamentos desnecessários. Há um bom número de trabalhos realizados com esse intuito. Nível sérico de PSA, escore de Gleason, estadiamento e avaliação das margens cirúrgicas têm sido considerados como fatores de prognóstico clássicos. De uma forma geral, são úteis e praticáveis na clínica, entretanto não são suficientes para prever evolução de todos os tumores, sinalizando a necessidade de avanços nesse sentido. Quanto à diferenciação neuroendócrina como marcador de evolução, ainda não se obteve consenso quanto a sua utilidade clínica. Considerando-se as propriedades indutoras de crescimento, diferenciação, transformação e infiltração tumoral espera-se que pacientes com diferenciação neuroendócrina estejam sob risco de evolução desfavorável. Pacientes com carcinomas neuroendócrinos de alto grau, que se sucedem a tratamento de deprivação hormonal, apresentam tumores agressivos e fatais. Agora a hipótese de que a presença de células neuroendócrinas em adenocarcinomas acinares usuais representaria neoplasias mais agressivas ainda precisa ser embasada. Por outro lado, o achado de que neoplasias neuroendócrinas de alto grau estão relacionadas com a amplificação gênica de AURKA e N-MYC, leva ao questionamento se a superexpressão imuno-histoquímica desses fatores poderia estar presente em fases precoces do adenocarcinoma, principalmente naqueles com diferenciação neuroendócrina e se poderiam prever evolução. Como também há evidências de que a diferenciação neuroendócrina ocorre em um processo de transdiferenciação de células terminalmente diferenciadas ou através da diferenciação de células-tronco neoplásicas, questiona-se se a marcação para o produto do gene relacionado com a indução de fenótipo de células-tronco, como é considerado o C-MYC, ou a marcação para moléculas presentes em células-tronco, como o CD44, especificamente o CD44s, poderia delimitar um grupo de pacientes à parte entre os portadores de adenocarcinomas usuais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o valor prognóstico dos marcadores imuno-histoquímicos relacionados à diferenciação neuroendócrina e de células-tronco, no câncer de próstata localizado, correlacionando com fatores de prognóstico clássicos e recorrência bioquímica de pacientes submetidos a prostatectomia radical, entre os anos de 2008 a 2013, no Hospital Universitário Walter Cantídio, na Universidade Federal do Ceará.

2.2 Objetivos Específicos

Correlacionar a imunoexpressão do marcador de diferenciação neuroendócrina cromogranina, em tecido parafinado de prostatectomias, de pacientes portadores de câncer de próstata localizado, com fatores de prognóstico clássico e recorrência bioquímica.

Correlacionar a imunoexpressão do marcador C-MYC, em tecido parafinado de prostatectomias, de pacientes portadores de câncer de próstata localizado, com fatores de prognóstico clássicos e recorrência bioquímica.

Correlacionar a imunoexpressão do marcador N-MYC, em tecido parafinado de prostatectomias, de pacientes portadores de câncer de próstata localizado, com fatores de prognóstico clássicos e recorrência bioquímica.

Correlacionar a imunoexpressão do marcador da Aurora quinase A, em tecido parafinado de prostatectomias, de pacientes portadores de câncer de próstata localizado, com fatores de prognóstico clássicos e recorrência bioquímica.

Correlacionar a imunoexpressão do marcador CD44s, em tecido parafinado de prostatectomias, de pacientes portadores de câncer de próstata localizado, com fatores de prognóstico clássicos e recorrência bioquímica.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Ética do estudo, pacientes e desenho do estudo

Este estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 011.03.12 (Anexo A). Foi, também, autorizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (Anexo B) e pelo Serviço de Urologia do Hospital Walter Cantídio da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (Anexo C). Os pacientes foram consultados pessoalmente e individualmente, apresentando-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice B), em entrevista, conforme exigência legal, para que, uma vez cientes deste trabalho, avaliassem e decidissem pela autorização ou não, sobre o uso de seu material para estudo, bem como se estavam disposto às avaliações periódicas em acompanhamento clínico-ambulatorial, firmando por escrito (assinando) a sua autorização.

Com intuito de se atingir os objetivos propostos realizou-se coorte hospitalar, de pacientes submetidos a prostatectomia, entre os anos de 2008 a 2013, no Serviço de Urologia do Hospital Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará.

Foram incluídos no estudo todos os pacientes submetidos a prostatectomia radical (prostatovesiculectomia), por via aberta e laparoscópica, operados por câncer de próstata clinicamente localizado (estadio clínico T1 e T2), no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2013. Foram excluídos pacientes submetidos a outras formas de prostatectomia ou que tenham sido operados por doenças não neoplásicas. Os pacientes sem retornos ambulatoriais foram retiradas da análise de recorrência bioquímica.

A partir dos dados de laudos histopatológicos e prontuários os pacientes foram contactados, via telefônica ou por correspondência, para agendamento de consulta clínica ambulatorial. Nesta, foi realizado anamnese, exame físico e toque retal, com avaliação do estado geral, re-estadiamento clínico e revisão de aparelhos e sistemas. Solicitou-se análise laboratorial de PSA sérico e plotaram-se os níveis séricos de PSA pré-operatório. Após consulta inicial, semestralmente os pacientes foram resubmetidos a avaliação clínica com dosagem de PSA sérico. O seguimento clínico foi realizado até junho de 2016.

Nos meses de abril a maio de 2015, realizou-se revisão de prontuários, revisão de pedidos médicos de exame anátomo-patológico, revisão de lâminas histológicas e levantamento de blocos de material parafinado para realização de reações de imuno-histoquímica.

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas e avaliadas entre os meses de junho a novembro de 2015. Os resultados das reações foram plotados como variáveis explanatórias, em um primeiro momento pesquisando-se a associação com dados demográficos (idade dos pacientes à cirurgia), laboratoriais (nível sérico de PSA pré-operatório) e histopatológicos (escore de Gleason, extensão extraprostática, invasão de vesículas seminais, estadiamento e estatos das margens cirúrgicas). Em um segundo momento, buscou-se a associação entre os resultados das reações de imuno-histoquímica, a idade, o nível sérico de PSA pré-operatório e as variáveis histopatológicas com a recorrência bioquímica, considerada como variável de desfecho.

A recorrência bioquímica foi definida como a elevação sustentada do PSA, com aumento do nível sérico $\geq 0,2$ ng/ml, em no mínimo duas medidas sequenciais, depois de atingido o nadir inferior a esse valor (0,03 ng/ml).^{211; 100; 150} Os dados foram plotados conforme o tempo decorrido da cirurgia e a recorrência, ou na inexistência de recorrência, até a última dosagem sérica de PSA. Os pacientes que não apresentaram elevação dos níveis séricos de PSA foram censurados na data da última dosagem.

3.2 Revisão de laudos histopatológicos, prontuários e lâminas histológicas

Foram inicialmente levantados e tabulados os seguintes dados a partir dos laudos e requisições médicas de exame anatomopatológico:

- a) Número de registro da peça cirúrgica;
- b) Número do prontuário médico;
- c) Data de nascimento do paciente;
- d) Idade do paciente à cirurgia;
- e) Data da cirurgia;
- f) Tipo histológico do adenocarcinoma;
- g) Escore de Gleason;
- h) Extensão para tecidos extraprostáticos;
- i) Infiltração da vesícula seminal;
- j) Comprometimento de margens cirúrgicas; e

k) Estadiamento patológico.

As lâminas histológicas foram coletadas do arquivo e revisadas, em microscópio óptico Nikon Elipse E200, por médico patologista, cego em relação aos dados clínicos e aos dados histopatológicos dos laudos previamente emitidos. Foram revistos e avaliados os seguintes parâmetros:

- a) Presença de diferenciação neuroendócrina morfológica:
 - Adenocarcinoma com diferenciação morfológica neuroendócrina de baixo grau;
 - Adenocarcinoma com diferenciação neuroendócrina com células de Paneth similares;
 - Carcinoma neuroendócrino bem diferenciado de baixo grau; e
 - Carcinoma neuroendócrino de alto grau de grandes e pequenas células.
- b) Escore de Gleason modificado, conforme recomendações da Organização Mundial da Saúde, 2016;³⁷
- c) Extensão tumoral para tecidos extraprostáticos e infiltração da vesícula seminal, avaliadas conforme orientações da International Society of Urological Pathology (ISUP), 2011^{212; 213};
- d) Avaliação do estatus das margens cirúrgicas se comprometidas ou livres;¹²⁰
- e) Estadiamento patológico, conforme o American Joint Committee on Cancer (AJCC), 2010¹¹⁸.

Os achados de revisão de lâminas foram comparados com os laudos originais e as discordâncias foram discutidas com patologista experiente, em microscópio pentaocular.

Para apresentação dos dados e análise estatística, a idade dos pacientes foi categorizada em <65 anos e ≥65 anos, a dosagem de PSA sérico pré-operatório foi categorizada em <10 ng/ml e ≥ 10 ng/ml, os escores de Gleason foram agrupados em 6 e ≥ 7 e o estadiamento foi agrupado em pT2 e pT3.²¹⁴

3.3 Imuno-histoquímica

Após a revisão de lâminas, os blocos para realização de imuno-histoquímica foram selecionados conforme a existência dos seguintes parâmetros:

- a) Amostra com representação de adenocarcinoma;
- b) Amostra com representação de glândulas não neoplásicas; e
- c) Amostra com maior variabilidade de graus de Gleason; preferindo-se aquelas com maiores escores.

Com o intuito de se ter cortes com aproximadamente a mesma representação, todos os blocos foram cortados sequencialmente, em 3 micrômetros, em lâminas silanizadas, com técnica padronizada.²¹⁵ O primeiro corte foi mantido como reserva, o segundo utilizado para reação com a cromogranina, o terceiro para o N-MYC, o quarto para a AURKA, o quinto para o C-MYC e o sexto para o CD44s.

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas na seguinte sequência: as lâminas permaneceram em estufa a 60°C por uma hora. Os processos de diafanização, reidratação e recuperação do epítipo (induzida por calor) foram realizadas utilizando-se o módulo de pré-tratamento Dako PT Link™ e Tampão Tris/EDTA pH 9,0 (Dako). Posteriormente, as lâminas contendo os cortes histológicos foram retiradas do módulo de pré-tratamento e deixadas em temperatura ambiente por cinco minutos, imersas em tampão de lavagem (Dako). Procedendo-se ao bloqueio da peroxidase endógena com o reagente EnVision™ Peroxidase-Blocking (Dako) por dez minutos. Logo após, os cortes histológicos foram colocados em três banhos de água destilada e, depois, em tampão de lavagem por cinco minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário a 25°C com tempo variando entre os anticorpos. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem por três minutos e incubadas com um amplificador de sinal por trinta minutos, com imersão em dois banhos de tampão de lavagem, por três minutos cada. Para a detecção foi utilizado o sistema polimérico livre de biotina (Dako) incubando-se os cortes histológicos por sessenta minutos a 25°C. Posteriormente, foram lavadas duas vezes por três minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados em solução substrato cromógeno (polímero Envision Flex™ DAKO) por 5 minutos a 25°C. Logo após, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas com Hematoxilina (Hematoxylin) por quatro minutos, sendo depois lavadas em água corrente e desidratadas em etanol absoluto através de três

banhos de trinta segundos cada, seguidos de três banhos de xilol por trinta segundos. Por fim, realizou-se a montagem da lâmina, anexando a lamínula com o Bálsamo do Canadá. Controles externos e internos próprios foram utilizados para validação da reação.

A leitura das reações foi realizada, por médico patologista, em microscópio óptico Nikon Eclipse E200, comparando-se com os cortes corados em HE para delimitação e comparação entre as áreas normais e áreas de carcinoma. Os dados foram avaliados e plotados conforme a especificidade de cada marcador.

3.3.1 Cromogranina A

As reações para cromogranina A, foram realizadas com o clone LK2H10 (Cell Marque, EUA, 2015), obtendo-se marcação citoplasmática em controle externo com apêndice cecal, na diluição de 1/500, recuperação antigênica em pH 9,0 (Flex TRS High) e tempo de incubação de 30 minutos, observando-se também controle interno no epitélio prostático não neoplásico.

A interpretação das reações para cromogranina foi estimada de forma semiquantitativa conforme escore previamente padronizado^{216; 217; 218} no epitélio não neoplásico e na neoplasia:

- a) 0: ausência de células positivas;
- b) 1+: presença de células positivas isoladas;
- c) 2+: presença de mais de três células agregadas positivas; e
- d) 3+: positividade extensiva com grande número de células positivas.
- e) Escores 0 e 1+ foram considerados negativos, escores 2+ e 3+ foram considerados positivos.

3.3.2 C-MYC

As reações para o C-MYC foram realizadas como Clone Y69 (Abcam – ab32072, EUA, 2015), obtendo-se positividade nuclear em controle externo composto por carcinoma escamoso e mucosa colônica não neoplásica, com a diluição de 1/100, recuperação antigênica realizada em pH 9,0 (Flex TRS High) e tempo de incubação de 60 minutos. Com estes parâmetros obteve-se controle interno em células basais do epitélio prostático benigno e células endoteliais.

A avaliação dos resultados das reações para C-MYC foi plotada como positiva ou negativa no epitélio não neoplásico, em vasos sanguíneos e na neoplasia invasiva.²¹⁹

Após leitura das lâminas, as reações foram repetidas com o Clone EP121 (Cell Marque, EUA, 2015), obtendo-se marcação nuclear em carcinoma escamoso, com diluição de 1/100, recuperação antigênica em pH 9,0 (Flex TRS High) e tempo de incubação de 60 minutos.

3.3.3 N-MYC

As reações para o N-MYC foram realizadas com o clone NCM II 100 (Abcam – ab16898, EUA, 2015), anticorpo não padronizado para imuno-histoquímica em tecido parafinado. Primeiramente realizou-se validação da técnica em neuroblastoma metastático para linfonodo cervical sabidamente amplificado para N-MYC, obtendo-se marcação nuclear com diluição de 1/100, conforme recomendado pelo fabricante para outras técnicas (1-5 microgramas/ml), a recuperação antigênica foi realizada em pH 9,0 (Flex TRS High) e tempo de incubação de 30 minutos. As reações não possuem controle interno positivo conhecido na próstata.

Após leitura das reações do N-MYC no tecido prostático, realizou-se novo teste em carcinoma neuroendócrino de alto grau da próstata, proveniente de ressecção transuretral com tempo de fixação controlado de 20 horas e realizado com formol tamponado a 10%.

3.3.4 Aurora Quinase A

As reações para AURKA foram realizadas com o Clone 35C1 (Santa Cruz – sc-56881, EUA, 2015), obtendo-se positividade citoplasmática em células inflamatórias estromais prostáticas, na diluição de 1/500, recuperação antigênica em pH 9,0 (Flex TRS High) e tempo de incubação de 30 minutos. Observou-se controle interno em células inflamatórias no estroma prostático.

Qualquer marcação citoplasmática em células epiteliais foi considerada positiva, mesmo que focal, no epitélio não neoplásico e na neoplasia. Considerou-se e plotou-se também a marcação nas células inflamatórias estromais como controle interno da reação.

3.3.5 CD44s

As reações para o CD44s foram realizadas com o Clone SFF-2 (Santa Cruz – sc-65405, EUA, 2015), obtendo-se marcação de membrana no epitélio de bexiga normal como controle externo, na diluição de 1/100, recuperação antigênica em pH 9,0 (Flex TRS High) e tempo de incubação de 30 minutos.

As reações foram avaliadas semiquantitativamente em microscópio óptico Nikon Eclipse E200, considerando-se positivas se observado ao menos marcação focal e atribuindo-se escores baseado na porcentagem de células positivas e na intensidade da marcação:²²⁰

- a) Proporção de células positivas em relação à totalidade do fragmento: 0: (0 a 5%); 1: (6 a 25%); 2: (26 a 75%); 3: (76 a 100%);
- b) Intensidade da marcação: 0: ausente; 1: fraca, positividade vista no aumento de 400x; 2: intermediária, positividade vista facilmente no aumento de 100x e 3: forte, positividade facilmente vista no aumento de 40x;
- c) Somando-se os escores considerou-se negativo valores menores ou iguais a 3 e positivo valores maiores que 3.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS 22 (IBM). Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Compararam-se os tempos de recorrência com o teste T. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para pesquisa de associação entre a marcação imuno-histoquímica de CD44s e o nível de PAS sérico. As análises de frequências de variáveis categóricas e variáveis categorizadas foram realizadas pelo teste exato de Fisher com cálculo da razão de chances, relatando-se o intervalo de confiança de 95%. Realizou-se o teste de Spearman para pesquisa de correlação entre os escores de expressão de CD44s e os escores de padrão de Gleason, variáveis categóricas ordinais. Curvas de Kaplan-Meier foram construídas em diversos estratos e comparadas através do teste de Log Rank. Regressão Cox univariada foi utilizada na pesquisa de associação entre as variáveis explanatórias e o desfecho,

relatando-se os *hazard ratios*, os intervalos de confiança de 95% e o nível de significância. Consideraram-se significativos $p \leq 0,05$, bicaudais.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros clínico-patológicos

Entre os anos de 2008 a 2013, 74 pacientes foram submetidos a prostatectomia radical. A idade média destes foi de 65,6 anos, com a idade mínima de 48 anos e a máxima de 79 anos. Aproximadamente 60% dos pacientes teve idade superior a 65 anos e 81% dos pacientes teve idade superior a 60 anos (Tabela 01).

Em relação ao PSA pré-operatório obteve-se o valor sérico de 73 pacientes, a mediana da dosagem foi de 7,8 (3,06 – 94,30) ng/ml, a maioria dos pacientes apresentou níveis séricos de PSA acima de 4 ng/ml.

Não se observou características de diferenciação neuroendócrina morfológica em nenhum dos casos quando da revisão de lâminas.

Na avaliação do Escore de Gleason modificado, mais da metade dos pacientes foi considerada Gleason 6, sendo que escores de Gleason menores foram observados em associação ao Gleason principal. Entre os pacientes contendo Gleason 7, visto em 36,4% (27/74) dos casos, a maioria entra na categoria 3+4 (20/74 – 27%) e um menor número de pacientes entra na categoria 4+3 (7/74 – 9,4%). Escores de Gleason de alto risco foram vistos em quatro pacientes, representando 5,3% do total da amostra, três pacientes (3/74 – 4,0%) com Gleason 8 e um paciente com Gleason 9 (1/73 – 1,3%). Não houve pacientes com Gleason 10.

Extensão para tecidos extraprostáticos foi vista em 23,0% dos casos, havendo comprometimento da gordura periprostática ou de feixes vasculoneurais periprostáticos. Não foi observada infiltração do colo vesical. Aproximadamente 10% dos pacientes apresentaram comprometimento da vesícula seminal. Dos oito pacientes que apresentaram infiltração da vesícula seminal sete tiveram extensão para tecidos periprostáticos concomitantemente. Dessa forma 75,7% dos pacientes foram estadiados como pT2 e 24,3% dos pacientes como pT3.

Margens cirúrgicas comprometidas foram vistas em 27 dos 74 casos (36,5%).

Tabela 01 - Resumo da características clínico-patológicas dos 74 pacientes submetidos à prostatectomia no período de 2008 a 2013

Característica	Total
Idade	74
Média	65,6 (DP 7,6; 48-79)
<65	30 (40,5%)
≥65	44 (59,5%)
<60	14 (18,9%)
≥60	60 (81,1%)
PSA	73
Mediana	7,8 (3,06 – 94,30)
< 4	4 (5,4%)
Entre 4 e 9,9	43 (58,1%)
Entre 10 e 19,9	19 (25,7%)
≥ 20	7 (9,5%)
Gleason	74
6	43 (58,1%)
≥ 7	31 (41,9%)
7 (3+4)	20 (27,0%)
7 (4+3)	07 (9,4%)
8	03 (4,0%)
9	01 (1,3%)
10	0 (0,0%)
EEP	74
Ausente	57 (77,0%)
Presente	17 (23,0%)
IVS	74
Ausente	66 (89,2%)
Presente	08 (10,8%)
Estadiamento	74
pT2	56 (75,7%)
pT3	18 (24,3%)
Margens Cirúrgicas	74
Livres	47 (63,5%)
Comprometidas	27 (36,5%)

Fonte: Próprio autor

Legenda: Idade à cirurgia em anos; PSA – Antígeno Prostático Específico Pré-operatório (ng/ml); Gleason – Escore de Gleason modificado na prostatectomia; EEP – Extensão Extraprostática; IVS – Invasão de Vesículas Seminais;

4.2 Imuno-histoquímica

Foram obtidos no arquivo do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará os blocos de parafina de 69 pacientes, os quais foram submetidos a estudo imuno-histoquímico.

4.2.1 Cromogranina

Observou-se positividade para cromogranina na imuno-histoquímica em 21,2% dos adenocarcinomas (Tabela 02 e Figura 15). Em 78,8% dos casos não se observou marcação ou houve marcação focal em poucas células neoplásicas. Como controle interno positivo houve marcação com formação de aglomerados em 33,3% das células do epitélio benigno, sendo que marcação ao menos focal foi vista em 98,5% dos casos (Figura 16). Em três dos casos não houve representação de neoplasia nas reações.

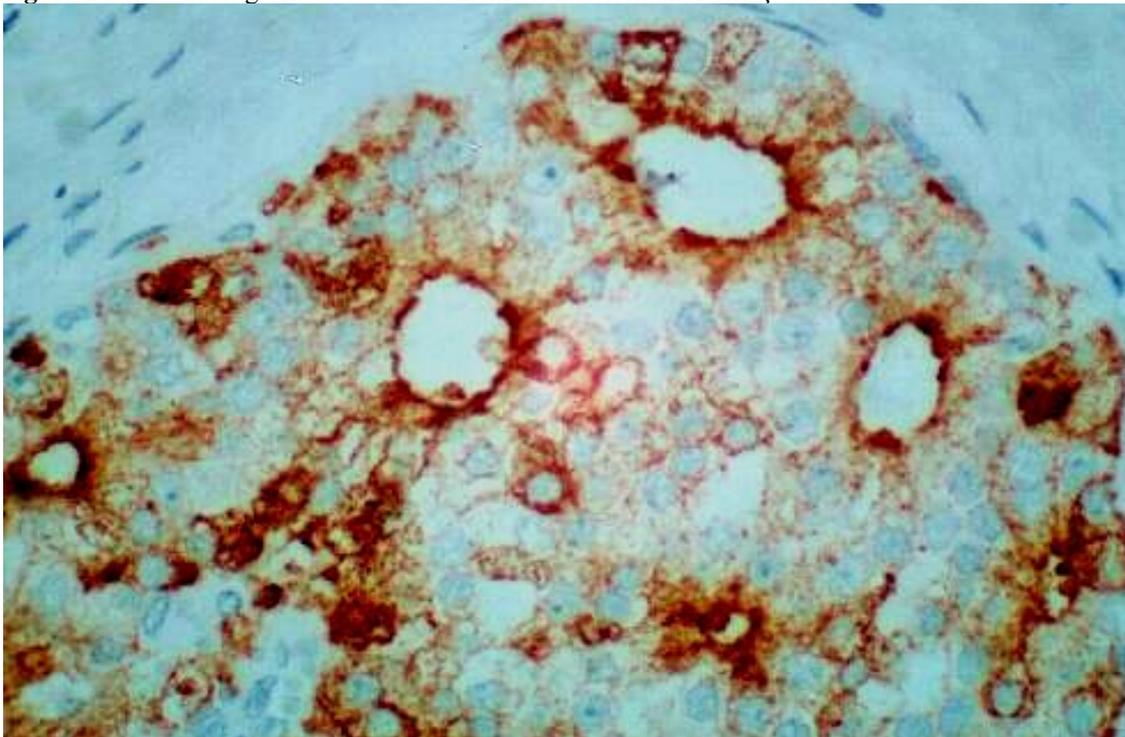
Tabela 02 - Resultado das reações de imuno-histoquímica para cromogranina considerado por escores

Cromogranina Não Neoplásico	
Total	69
Negativo total (0)	1 (1,45%)
Positivo ao menos focal (1+/3+)	68 (98,5%)
Negativo (0/1+)	46 (66,7%)
Positivo (2+/3+)	23 (33,3%)
Cromogranina Neoplásico	
Total	66
Negativo total (0)	41 (62,1%)
Positivo ao menos focal (1+/3+)	25 (37,9%)
Negativo (0/1+)	52 (78,8%)
Positivo (2+/3+)	14 (21,2%)

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Foram obtidos 69 blocos para realização de imuno-histoquímica, em três reações não houve representação de neoplasia. Porcentagem exposta sobre número de casos válidos.

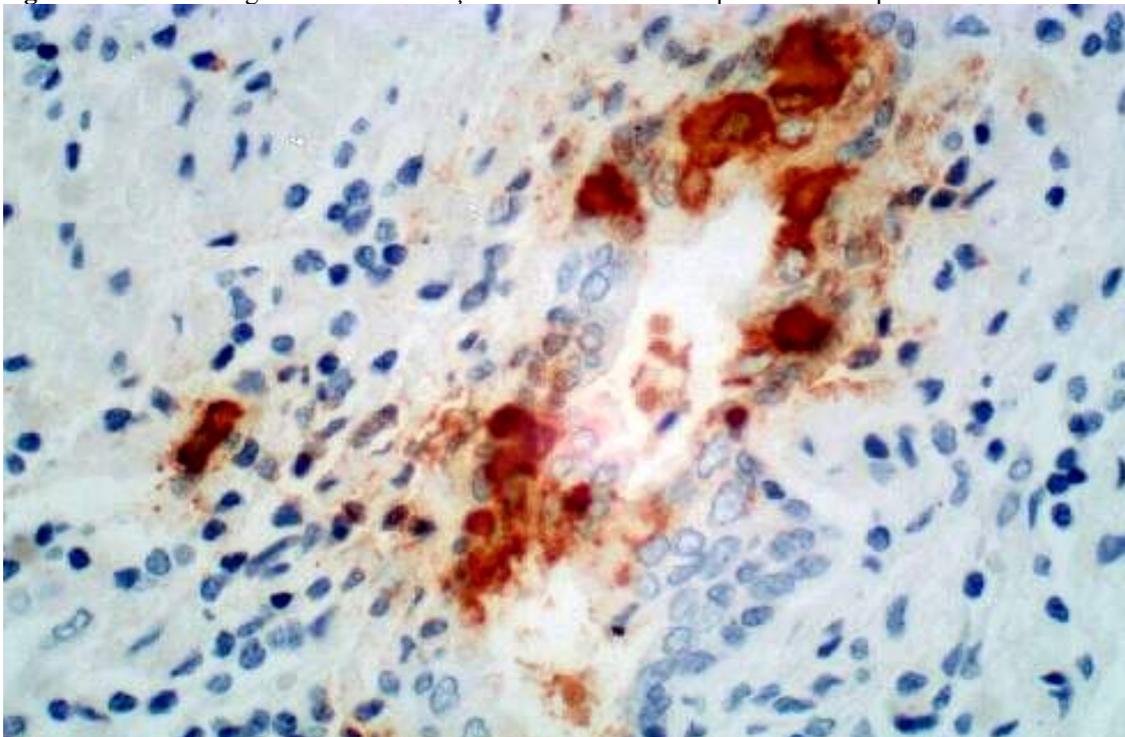
Figura 15 - Fotomicrografia de adenocarcinoma acinar com diferenciação neuroendócrina



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica, aumento de 400x, marcação com cromogranina, demonstrando a presença de aglomerados de células neoplásicas com diferenciação neuroendócrina.

Figura 16 - Fotomicrografia de diferenciação neuroendócrina no epitélio não neoplásico.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica com marcação para cromogranina, aumento 400x, demonstra marcação em aglomerados celulares no epitélio não neoplásico.

A positividade para cromogranina se associou com a invasão de vesículas seminais e com o estadiamento patológico (Tabela 03). A maioria dos pacientes negativos para cromogranina não apresentaram infiltração de vesículas seminais (94,2%) e tiveram estadiamento pT2 (82,7%). O risco associado à diferenciação neuroendócrina e invasão de vesículas seminais de 6,533. O risco associado a maior estadiamento e diferenciação neuroendócrina foi de 4,778. Por outro lado, não se observou associação entre a diferenciação neuroendócrina e idade, nível sérico de PSA pré-operatório, escore de Gleason, extensão extraprostática e margens cirúrgicas.

Tabela 03 - Parâmetros de avaliação clínico-patológicos verificados em pacientes com câncer de próstata conforme a marcação para cromogranina na neoplasia: estratificação em negativo (0 e 1+) e positivo (2+ e 3+), baseada nos resultados de 66 reações, nível de significância avaliado pelo Teste exato de Fisher

Parâmetro	Cromogranina negativo	Cromogranina positivo	Significância (Valor P)	RC(IC 95%)
Idade				
< 65	22 (42,3%)	5 (35,7%)	0,765	1,320
≥ 65	30 (57,7%)	9 (64,3%)		(0,388-4,488)
PSA				
<10	36 (69,2%)	6 (42,9%)	0,115	3,000
≥ 10	16 (30,8%)	8 (57,1%)		(0,893-10,073)
Gleason				
6	31 (59,6%)	7 (50,0%)	0,555	1,476
≥ 7	21 (40,4%)	7 (50,0%)		(0,451-4,829)
EEP				
Ausente	43 (82,7%)	8 (57,1%)	0,069	3,583
Presente	9 (17,3%)	6 (42,9%)		(0,997-12,879)
IVS				
Ausente	49 (94,2%)	10 (71,4%)	0,032	6,533
Presente	3 (5,8%)	4 (28,6%)		(1,262-33,822)
Estadiamento				
pT2	43 (82,7%)	7 (50,0%)	0,030	4,778
pT3	9 (17,3%)	7 (50,0%)		(1,341-17,018)
MC				
Livres	32 (61,5%)	9 (64,3%)	1,0	0,889
Comprometidas	20 (38,5%)	5 (35,7%)		(0,260-3,034)

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Idade em anos à cirurgia; PSA – valor do Antígeno Prostático Específico pré-operatório em ng/ml; EEP – Extensão Extraprostática; IVS – Invasão de Vesícula Seminal; MC – Margens Cirúrgicas; RC (IC 95%) – Razão de chances e intervalo de confiança de 95%; Exposto porcentagem de colunas.

4.2.2 C-MYC

Observou-se positividade nuclear para C-MYC em 27,3% dos adenocarcinomas (Tabela 04 e Figura 17). Em 40% dos casos houve marcação focal em raras células endoteliais de vasos sanguíneos subcapsulares (Figura 18) e em 25% dos

casos houve marcação em raras células do epitélio benigno (Figura 19), funcionando como controle interno. Os controles externos em carcinoma escamoso (Figura 20) e mucosa cólica normal funcionaram adequadamente (Figura 21). Não houve representação de epitélio benigno em uma das reações e não houve representação de neoplasia em três reações.

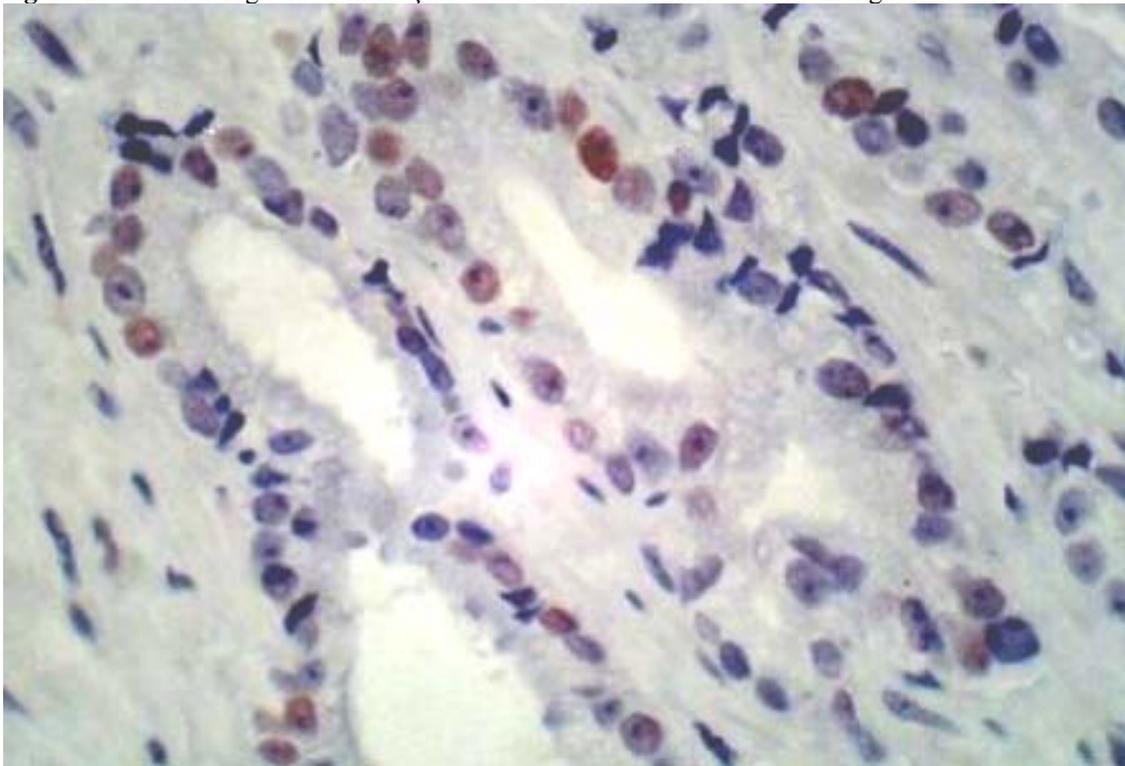
Tabela 04 - Resumo dos resultados para reações de imuno-histoquímica com C-MYC, avaliado como positivo e negativo

C-MYC Vasos	
Total	69
Negativo	41 (59,4%)
Positivo	28 (40,6%)
C-MYC Epitélio Benigno	
Total	68
Negativo	51 (75%)
Positivo	17 (25%)
C-MYC Maligno	
Total	66
Negativo	48 (72,7%)
Positivo	18 (27,3%)

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Foram obtidos 69 blocos para realização de imuno-histoquímica, em uma reação não houve representação de epitélio benigno e em três reações não houve representação de neoplasia. Porcentagem exposta sobre número de casos válidos.

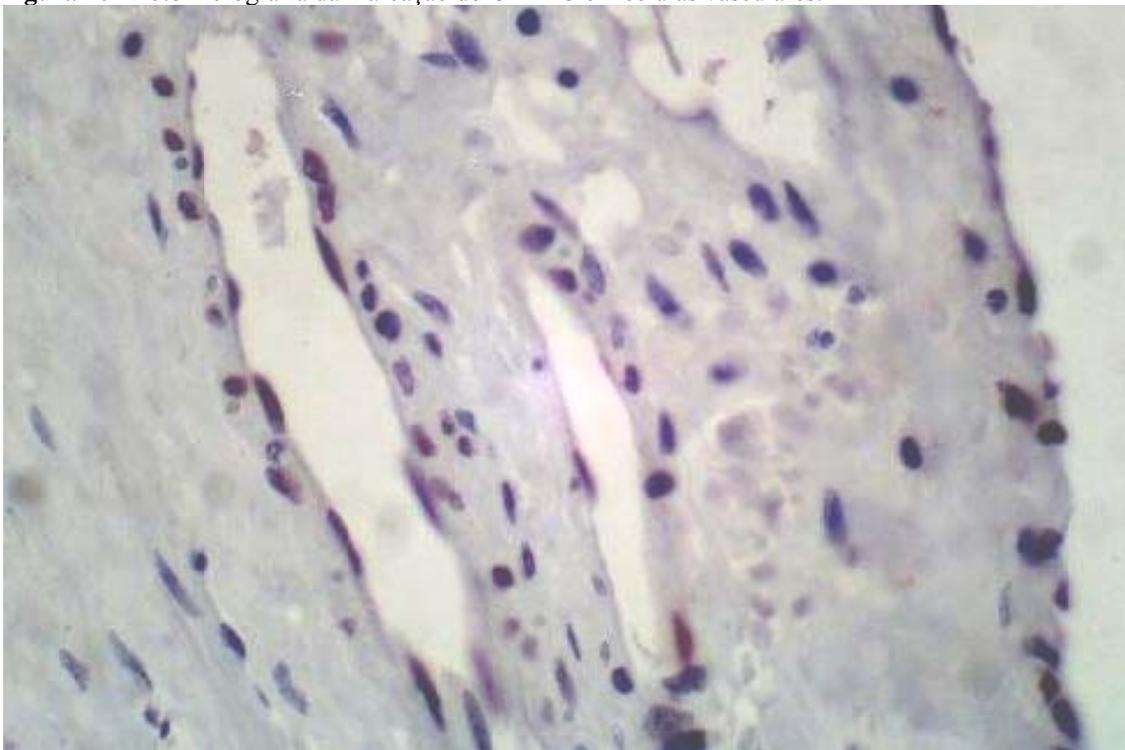
Figura 17 - Fotomicrografia da marcação de C-MYC observada nas células malignas



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica, aumento 400x, marcação nuclear para C-MYC em glândulas neoplásicas infiltrativas.

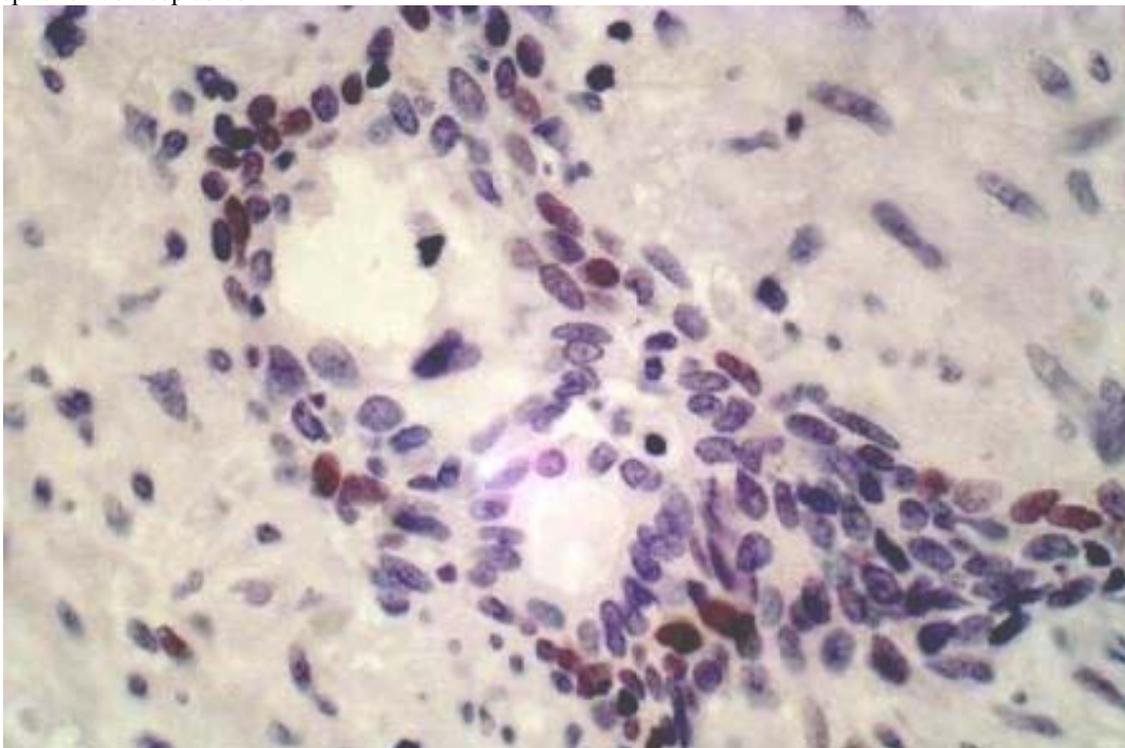
Figura 18 - Fotomicrografia da marcação do C-MYC em células vasculares.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica, 400x, marcação nuclear para C-MYC em raras células vasculares.

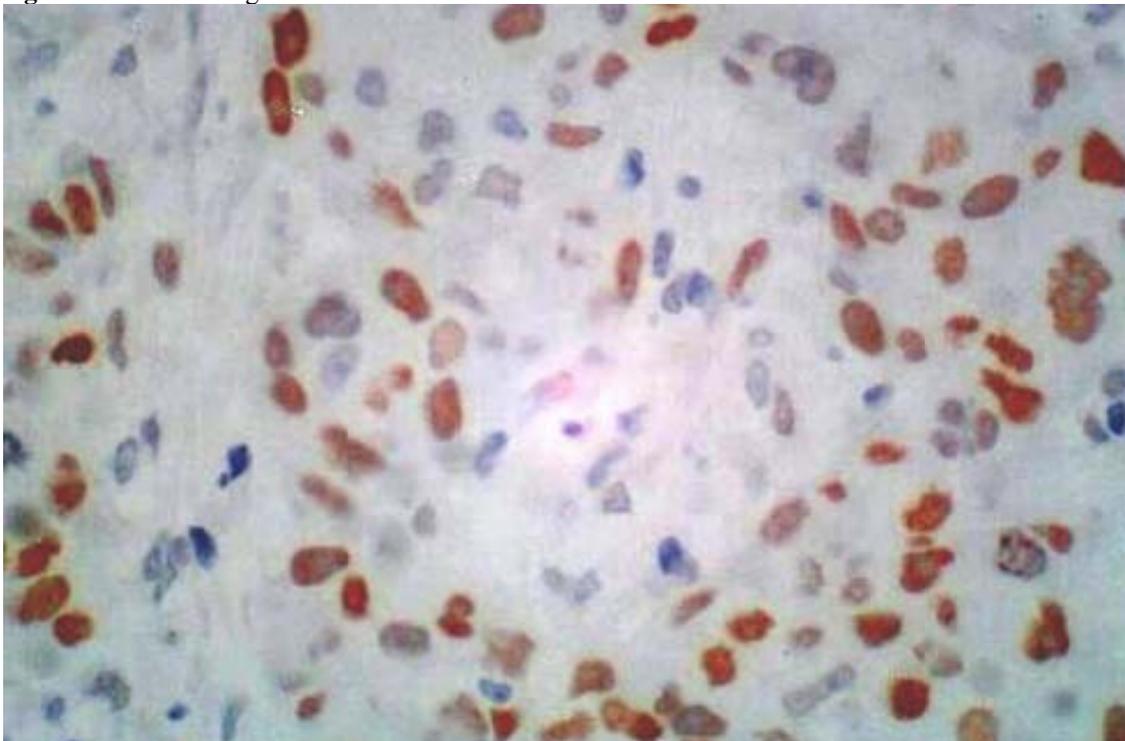
Figura 19 - Fotomicrografia da marcação de C-MYC observada em raras células na porção basal do epitélio não neoplásico



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica, 400x, marcação nuclear em células basais do epitélio não neoplásico.

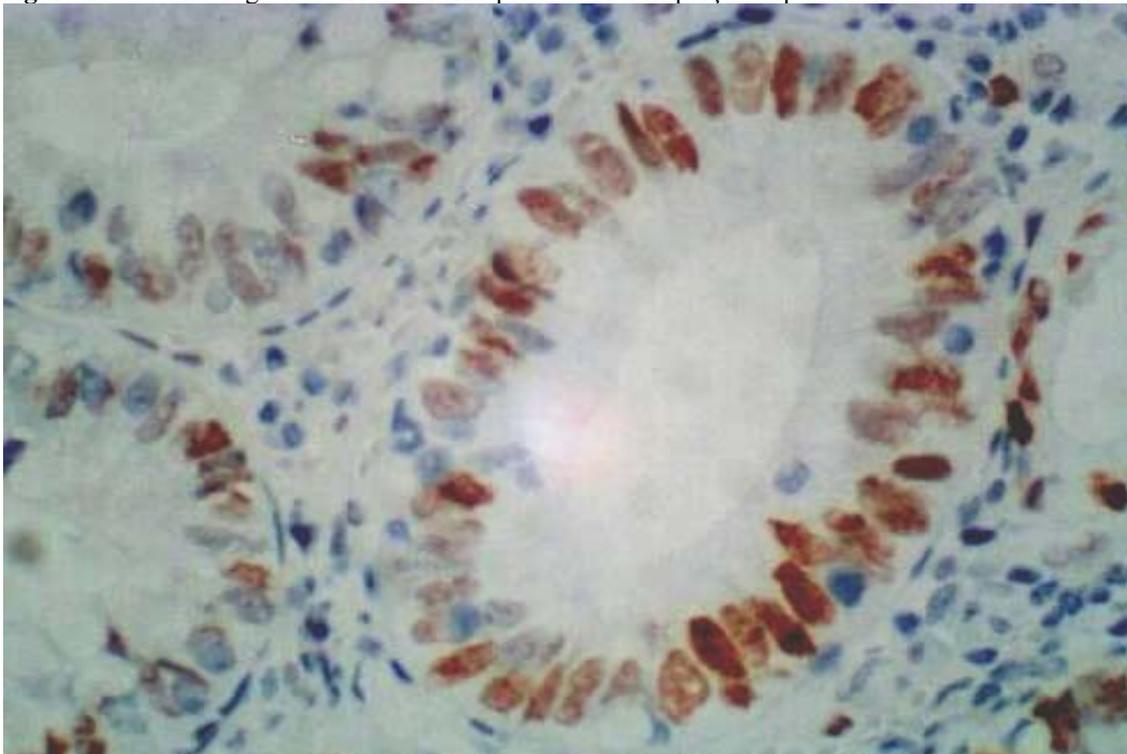
Figura 20 - Fotomicrografia de controle externo de C-MYC em carcinoma escamoso



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica, 400x, controle externo de padronização do C-MYC, demonstra marcação nuclear.

Figura 21 - Fotomicrografia controle externo para C-MYC na porção críptica da mucosa cólica normal



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica, aumento 400x, controle externo do C-MYC em células de criptas de colo normal.

A positividade para C-MYC se associou com a infiltração da vesícula seminal e com o escore de Gleason (Tabela 05). Prostatectomias com positividade para C-MYC na neoplasia demonstraram risco de infiltração da vesícula seminal na ordem de 8,846, enquanto que o risco para escores de Gleason maiores que 6 foi de 8,500. Não houve associação significativa com a idade dos pacientes, PSA pré-operatório, extensão extraprostática, margens cirúrgicas e estadiamento.

Tabela 05 - Parâmetros de avaliação clínico-patológicos verificados em pacientes com câncer de próstata conforme a marcação para C-MYC na neoplasia: estratificação em negativo e positivo, baseada nos resultados de 66 reações, nível de significância avaliado pelo Teste exato de Fisher

Parâmetro	C-MYC negativo	C-MYC positivo	Significância (Valor p)	RC (IC 95%)
Idade				
< 65	19 (39,6%)	8 (44,4%)	0,783	0,819 (0,274-2,448)
≥ 65	29 (60,4%)	10 (55,6%)		
PSA				
< 10	30 (62,5%)	12 (66,7%)	1,0	0,833 (0,266-2,608)
≥ 10	18 (37,5%)	6 (33,3%)		
Gleason				
6	34 (70,8%)	4 (22,2%)	0,001	8,500 (2,378-30,377)
≥ 7	14 (29,2%)	14 (77,8%)		
EEP				
Ausente	39 (81,3%)	12 (66,7%)	0,322	2,167 (0,640-7,331)
Presente	9 (18,8%)	6 (33,3%)		
IVS				
Ausente	46 (95,8%)	13 (72,2%)	0,014	8,846 (1,535-50,987)
Presente	2 (4,2%)	5 (27,8%)		
Estadiamento				
pT2	39 (81,3%)	11 (61,1%)	0,112	2,758 (0,836-9,092)
pT3	9 (18,8%)	7 (38,9%)		
MC				
Livre	33 (68,8%)	8 (44,4%)	0,091	2,750 (0,904- 8,362)
Comprometida	15 (31,3%)	10 (55,6%)		

Fonte: Próprio autor

Legenda: Idade em anos à cirurgia; PSA – valor do Antígeno Prostático Específico pré-operatório em ng/ml; EEP – Extensão Extraprostática; IVS – Invasão de Vesícula Seminal; MC – Margens Cirúrgicas; RC (IC 95%) – Razão de chances e intervalo de confiança de 95%; Exposto porcentagem de colunas.

4.2.3 N-MYC

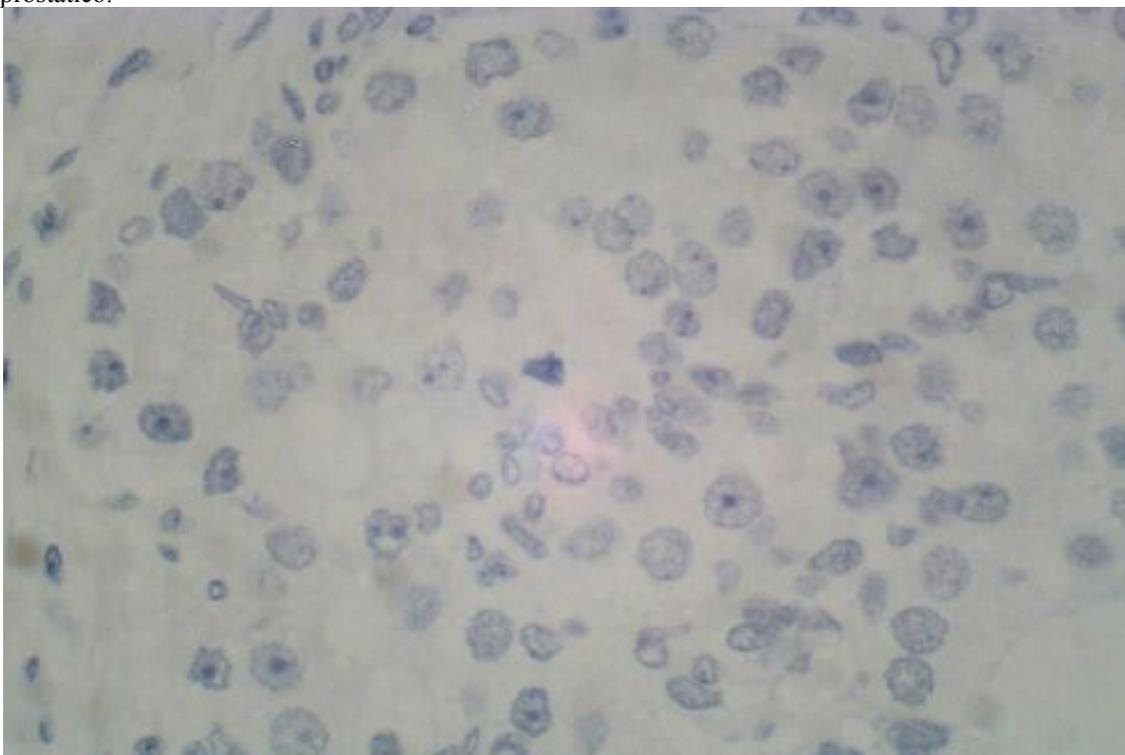
Todos os casos foram completamente negativos para o N-MYC na imuno-histoquímica, não se observando marcação na porção benigna e na porção maligna (Tabela 06 e Figura 22).

Tabela 06 - Resumo do resultado das reações de imuno-histoquímica para N-MYC

N-MYC Epitélio Benigno	
Total	69
Negativo	69 (100%)
Positivo	0 (0%)
N-MYC Maligno	
Total	66
Negativo	66 (100%)
Positivo	0 (0%)

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Foram obtidos 69 blocos para realização de imuno-histoquímica, em três reações não houve representação de neoplasia.

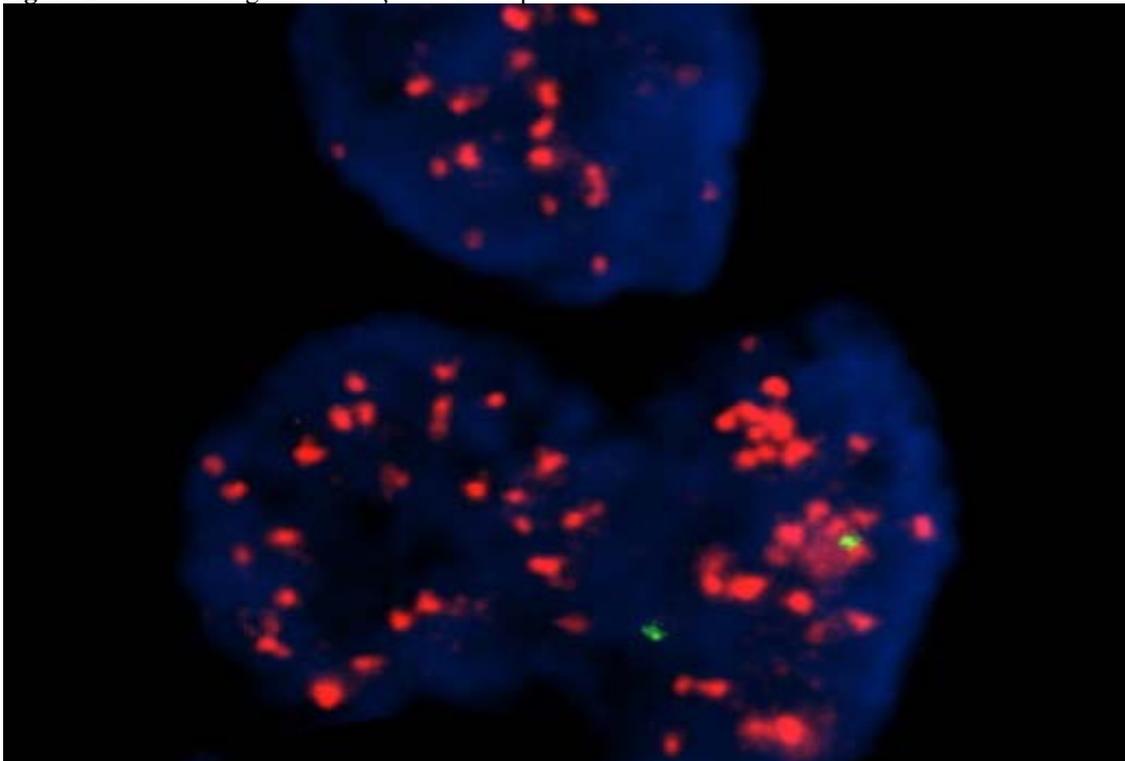
Figura 22 - Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para N-MYC no carcinoma acinar usual prostático.

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica para N-MYC, aumento 400x, ausência completa de marcação no adenocarcinoma prostático.

As reações de imuno-histoquímica foram validadas em neuroblastoma metastático amplificado para N-MYC pela técnica de Hibridização “in situ” com Fluoresceína (FISH) (Figura 23) e apresentaram marcação adequada (Figura 24).

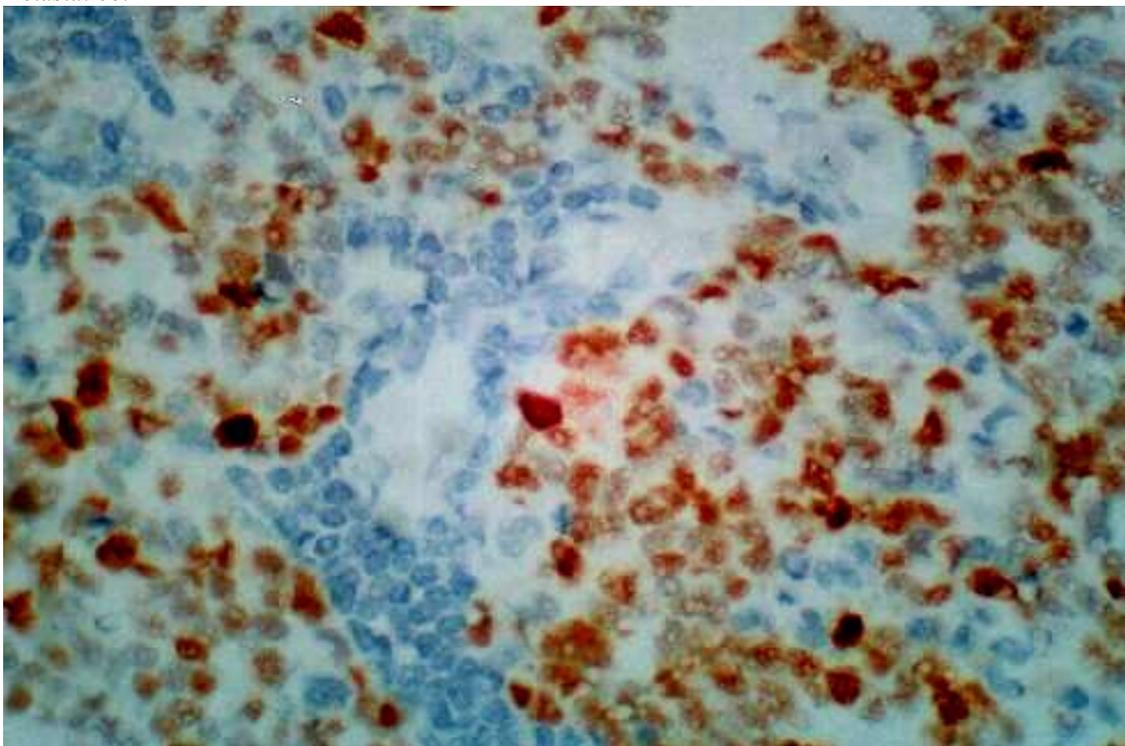
Figura 23 - Fotomicrografia da reação de FISH para N-MYC em neuroblastoma metastático.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Neuroblastoma, aumento 1000x, na célula à esquerda observam-se duas marcações em verde, representando a marcação do centrômero do cromossomo 2, em vermelho observam-se múltiplas cópias do N-MYC, utilizado para validar a reação imuno-histoquímica do N-MYC

Figura 24 - Fotomicrografia de reação de imuno-histoquímica para N-MYC em neuroblastoma metastático.

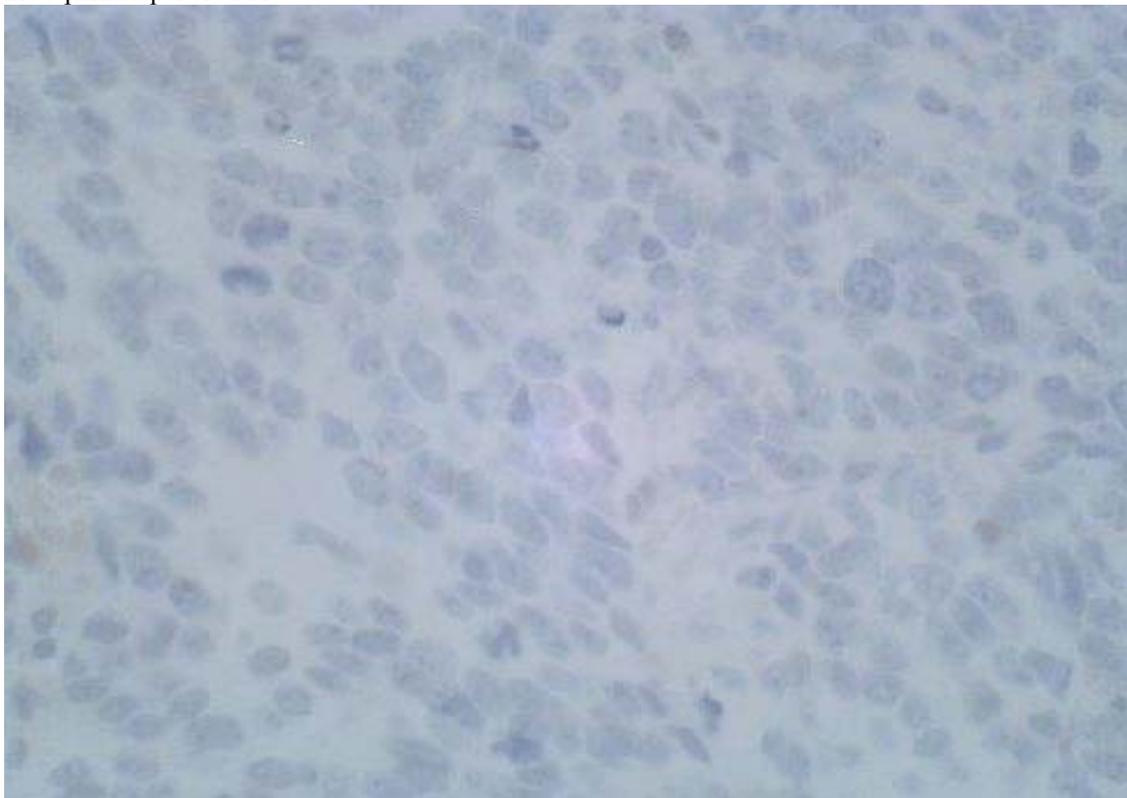


Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica para N-MYC, aumento de 400x, positividade nuclear em células de neuroblastoma metastático amplificado.

Foram realizadas reações de imuno-histoquímica para teste em carcinoma neuroendócrino de pequenas células prostático, proveniente de ressecção transuretral, as quais resultaram negativas (Figura 25).

Figura 25 - Fotomicrografia de carcinoma neuroendócrino de pequenas células com marcação imuno-histoquímica para N-MYC.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica, 400x, ausência de marcação para N-MYC em neoplasia prostática, composta por pequenas células, positivas para marcadores neuroendócrinos, obtida de material de ressecção transuretral.

4.2.4 Aurora Quinase A

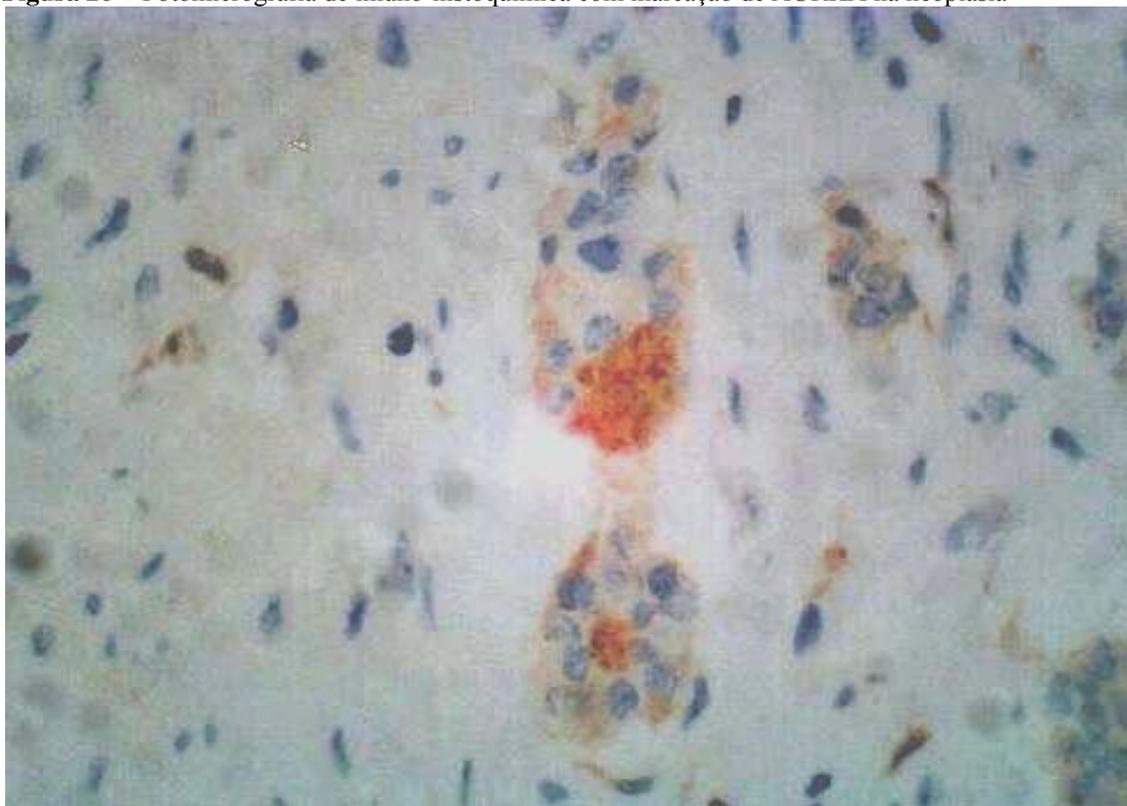
Dois casos (2/69 – 2,9%) demonstraram positividade moderada para AURKA no citoplasma do epitélio neoplásico (Tabela 07, Figura 26), 97,1% dos casos (66/68) não tiveram marcação ou se observaram raras células representando menos de 1% da neoplasia. Em 46,3% dos casos houve marcação do epitélio não neoplásico (Figura 27) e em 98,5% dos casos observou-se controle interno em células inflamatórias (Figura 28). Em um caso não houve representação de neoplasia nas reações de imuno-histoquímica, bem como, não houve representação de epitélio benigno em dois casos.

Tabela 07 - Resumo das reações imuno-histoquímicas para AURKA

AURKA Inflamação	
Total	69
Negativo	1 (1,45%)
Positivo	68 (98,55%)
AURKA Epitélio Benigno	
Total	67
Negativo	36 (53,7%)
Positivo	31 (46,3%%)
AURKA Maligno	
Total	68
Negativo	66 (97,1%)
Positivo	2 (2,9%)

Fonte: Próprio autor.

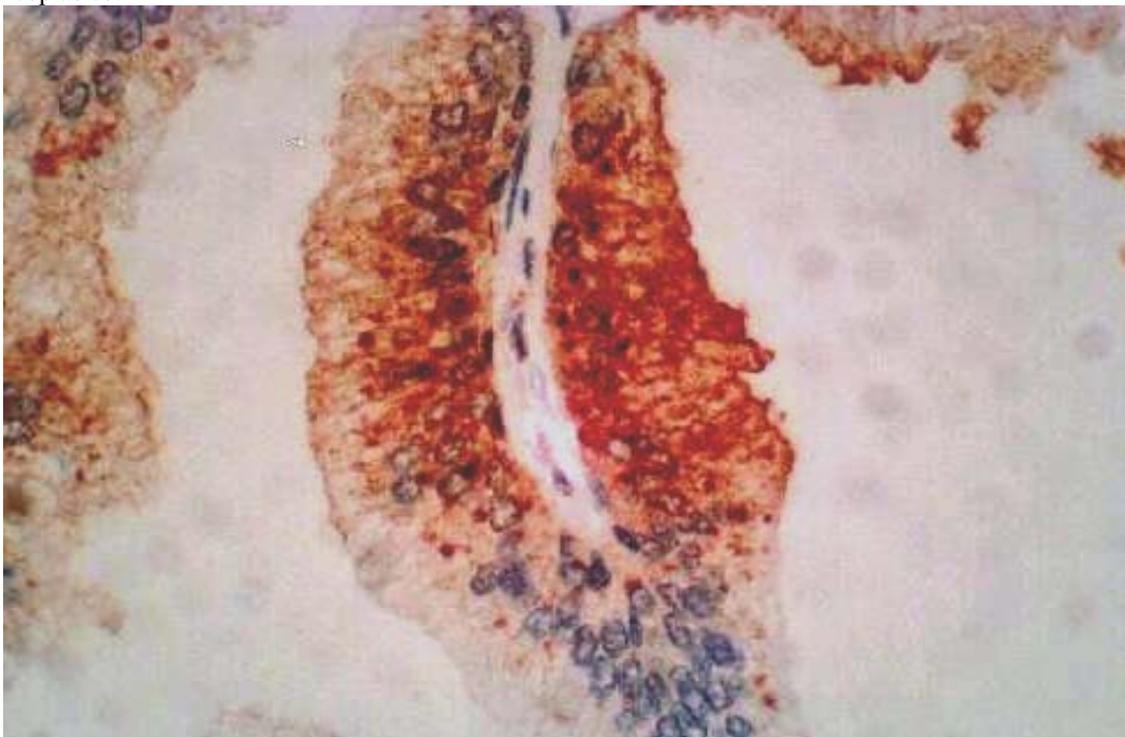
Legenda: Foram obtidos 69 blocos para realização de imuno-histoquímica, em duas reações não houve representação do epitélio benigno e em uma reação não houve representação da neoplasia. Porcentagem exposta sobre número de casos válidos.

Figura 26 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica com marcação de AURKA na neoplasia

Fonte: Próprio autor.

Legenda. Imuno-histoquímica, aumento 400x, marcação da AURKA em células neoplásicas.

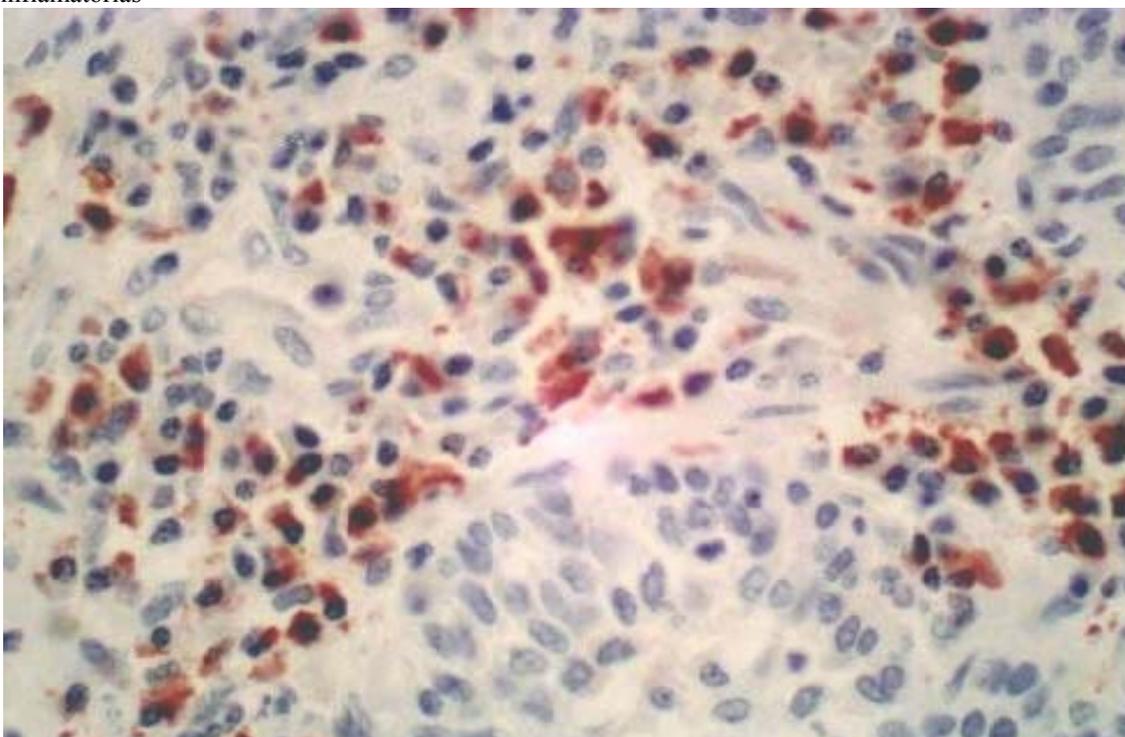
Figura 27 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica com marcação para AURKA no epitélio não neoplásico.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica, 400x, marcação citoplasmática, por vezes com reforço em dots perinucleares (ponto mais escuros na marcação).

Figura 28 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica com marcação para AURKA em células inflamatórias



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica AURKA, aumento 400x, marcação citoplasmática em células inflamatórias no estroma prostático.

A positividade para AURKA na neoplasia não se associou a nenhum fator de prognóstico avaliado (Tabela 08).

Tabela 08 - Parâmetros de avaliação clínico-patológicos verificados em pacientes com câncer de próstata conforme a marcação para AURKA na neoplasia: estratificação em negativo e positivo, baseado nos resultados de 68 reações, nível de significância avaliado pelo Teste exato de Fisher

Parâmetro	AURKA negativo	AURKA positivo	Significância (Valor p)	RC (IC95%)
Idade				
< 65	26 (39,4%)	1 (50,0%)	1,0	0,650 (0,039-10,855)
≥ 65	40 (60,6%)	1 (50,0%)		
PSA				
< 10	42 (64,6%)	1 (50,0%)	1,0	1,826 (0,109-30,576)
≥ 10	23 (35,4%)	1 (50,0%)		
Gleason				
6	39 (59,1%)	1 (50,0%)	1,0	1,444 (0,087-24,110)
≥ 7	27 (40,9%)	1 (50,0%)		
EEP				
Ausente	51 (77,3%)	1 (50,0%)	0,418	3,400 (0,200-57,670)
Presente	15 (22,7%)	1 (50,0%)		
IVS				
Ausente	59 (89,4%)	2 (100,0%)	1,0	0,967 (0,924-1,013)
Presente	7 (10,6%)	0 (0,0%)		
Estadiamento				
pT2	50 (75,8%)	1 (50,0%)	0,440	3,125 (0,185-52,870)
pT3	16 (24,2%)	1 (50,0%)		
MC				
Livres	42 (63,6%)	1 (50,0%)	1,0	1,750 (0,105-29,266)
Comprometidas	24 (36,4%)	1 (50,0%)		

Fonte: Próprio autor

Legenda: Idade em anos à cirurgia; PSA – valor do Antígeno Prostático Específico pré-operatório em ng/ml; EEP – Extensão Extraprostática; IVS – Invasão de Vesícula Seminal; MC – Margens Cirúrgicas; RC (IC 95%) – Razão de chances e intervalo de confiança de 95%; Exposto porcentagem de colunas.

4.2.5 CD44s

Houve positividade para o CD44s ao menos focal na neoplasia em 49,2% dos casos, sendo que quando considerados em escores, a positividade encontrada foi em 12,3% dos casos (Tabela 09, Figura 29). O epitélio não neoplásico mostrou-se positivo para CD44s em 27 pacientes (39,7%) (Figura 30) e houve marcação de células inflamatórias em 42% dos casos (Figura 31). A marcação observada no epitélio não neoplásico foi circunferencial em células basais e de forma basolateral nas células luminiais, sendo que a expressão na neoplasia foi ou completa ao redor das células ou incompleta e focal. Não houve representação de epitélio benigno em uma reação e não houve representação de neoplasia em quatro reações.

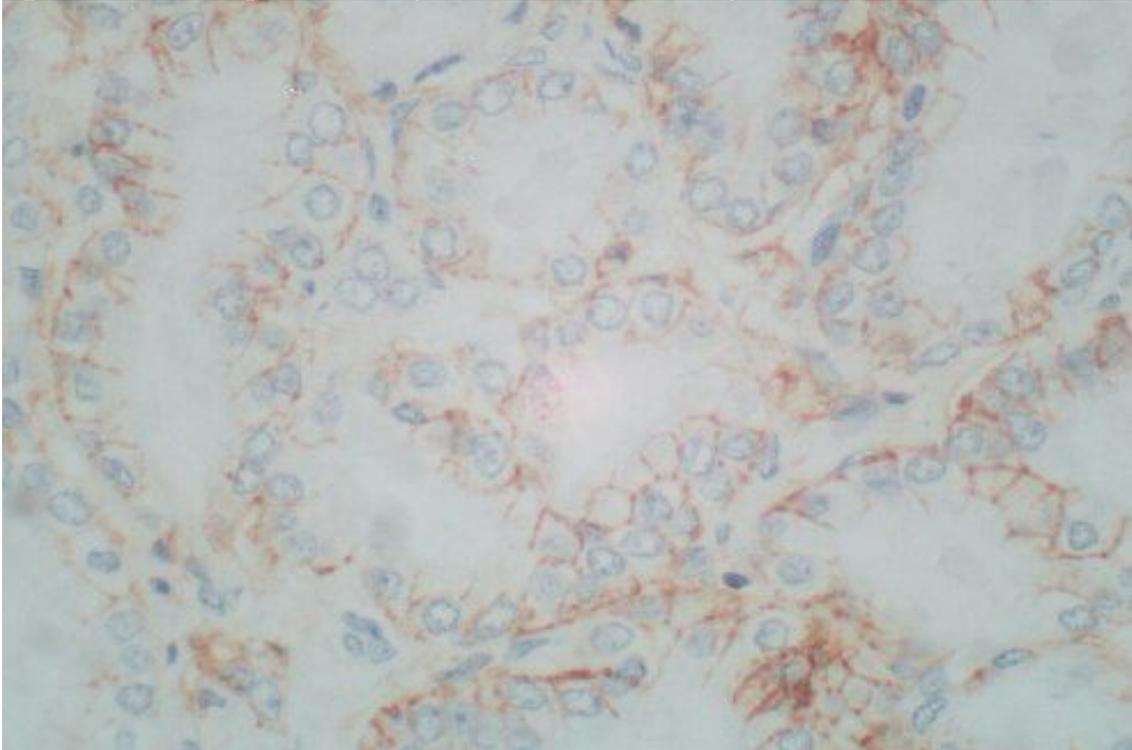
Tabela 09 - Resumo das reações de imuno-histoquímica para o CD44s, plotado conforme ausência total de positividade e positividade ao menos focal e marcação conforme escores negativo (0-3) e positivo (4-6)

CD44s Inflamação	
Total	69
Negativo total	27 (39,1%)
Positivo ao menos focal (1-6)	42 (60,9%)
Negativo (0-3)	40 (58,0%)
Positivo (4-6)	29 (42,0%)
CD44s Benigno	
Total	68
Negativo total	24 (35,3%)
Positivo ao menos focal (1-6)	44 (64,7%)
Negativo (0-3)	41 (60,3%)
Positivo (4-6)	27 (39,7%)
CD44s Maligno	
Total	65
Negativo total	33 (50,8%)
Positivo ao menos focal (1-6)	32 (49,2%)
Negativo (0-3)	57 (87,7%)
Positivo (4-6)	8 (12,3%)

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Foram obtidos 69 blocos para realização de imuno-histoquímica, em uma reação não houve representação do epitélio benigno e quatro reações não houve representação da neoplasia. Porcentagem exposta sobre número de casos válidos.

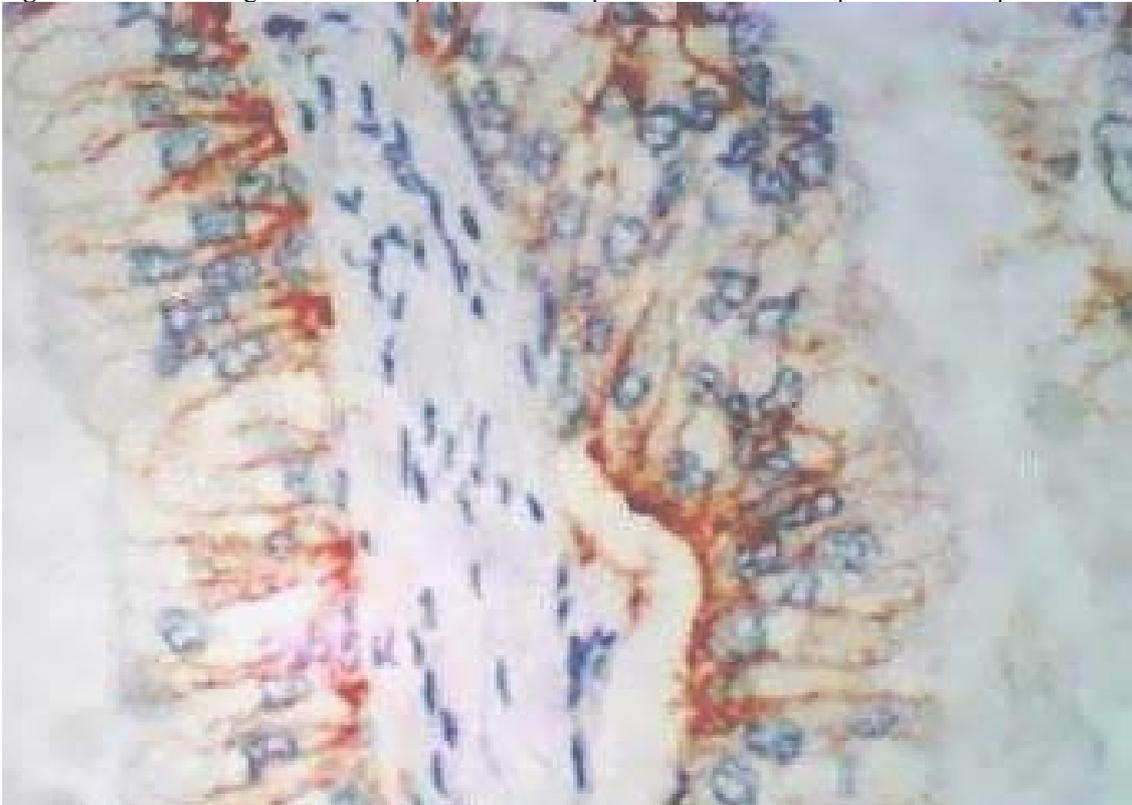
Figura 29 - Fotomicrografia da marcação do CD44s em células neoplásicas.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica com marcação para CD44s, aumento 400x, marcação basolateral em células neoplásicas, intensidade de marcação intermediária (2) em mais de 75% das células (3).

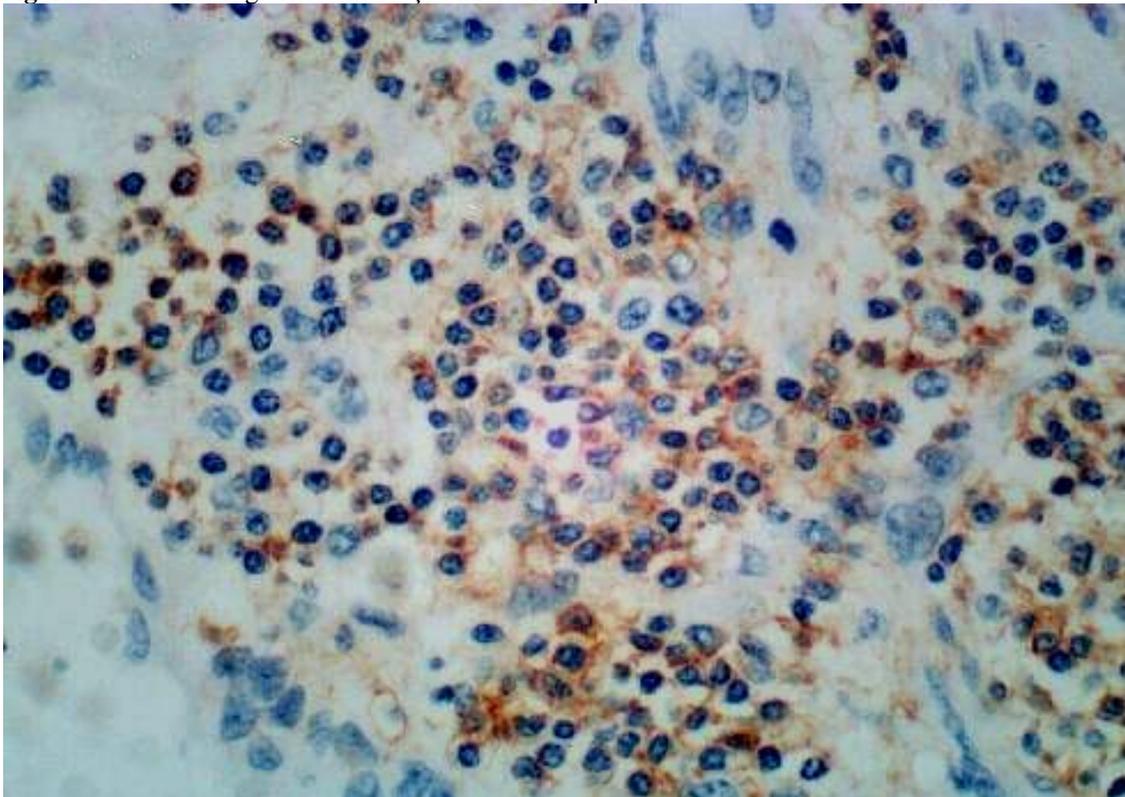
Figura 30 - Fotomicrografia da marcação imuno-histoquímica do CD44s no epitélio não neoplásico



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica para CD44s, aumento 400x, marcação basolateral em células luminiais e circunferencial em células basais, intensidade forte (3) em mais de 75% das células (3).

Figura 31 - Fotomicrografia da marcação imuno-histoquímica do CD44s em células inflamatórias.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Imuno-histoquímica, para CD44s, aumento de 400x, marcação de membrana e citoplasmática foi observada em células inflamatórias estromais.

A positividade para CD44s no adenocarcinoma se associou com o PSA pré-operatório quando analisado de forma contínua, observando-se mediana de 8,42 (3,06-94,3) nos casos negativos para CD44s e mediana de 5,43 (4,16-16,35) nos casos positivos, com valor de $p=0,029$ pelo teste de Mann-Whitney.

O escore de marcação do CD44s se correlaciona com o escore do padrão de Gleason, quando analisado pela correlação de Spearman ($R_o=-0,204$; $p=0,042$; Tabela 10), sendo que quanto maior o escore de Gleason menor a positividade para CD44s. Quando analisado de forma categórica e agrupada, perdeu-se a associação entre a expressão do CD44 e o nível sérico de PSA pré-operatório e o escore de Gleason (Tabela 11).

A presença ou a ausência de imunexpressão para o CD44s não se associou com extensão extraprostática, invasão de vesículas seminais, estadiamento e margens cirúrgicas (Tabela 11).

Tabela 10 - Correlação entre o padrão de Gleason conforme positividade para CD44s estratificado em escores negativo (0-3) e positivo (4-6)

	Gleason 3	Gleason 4	Gleason 5
CD44s			
Negativo	57 (87,7%)	30 (96,7%)	5 (100%)
Positivo	8 (12,3%)	1 (3,2%)	0 (0%)

Fonte: Próprio autor

Legenda: Houve representação de neoplasia em 65 reações realizadas para CD44s, todas as reações demonstraram representação de Gleason padrão 3; 31 reações demonstraram Gleason padrão 4 e 5 reações demonstraram Gleason padrão 5. Oito casos foram positivos para CD44s, a totalidade de positividade foi observada em Gleason padrão 3, um caso de padrão 4 foi positivo e nenhum dos casos Gleason padrão 5 apresentou positividade.

Tabela 11 - Parâmetros de avaliação clínico-patológicos verificados em pacientes com câncer de próstata conforme a marcação para CD44s na neoplasia, estratificação em negativo (0-3) e positivo (4-6), baseado nos resultados de 65 reações, nível de significância avaliado pelo Teste exato de Fisher

Fator	CD44s negativo	CD44s positivo	Significância (Valor p)	RC (IC 95%)
Idade				
< 65	24 (42,1%)	3 (37,5%)	1,0	1,212 (0,264-5,569)
≥ 65	33 (57,9%)	5 (62,5%)		
PSA				
< 10	35 (61,4%)	7 (87,5%)	0,242	0,227 (0,026-1,975)
≥ 10	22 (38,6%)	1 (12,5%)		
Gleason				
6	31 (54,4%)	6 (75,0%)	0,449	0,397 (0,074-2,139)
≥ 7	26 (45,6%)	2 (25,0%)		
EEP				
Ausente	43 (75,4%)	7 (87,5%)	0,669	0,439 (0,050-3,883)
Presente	14/ (24,6%)	1 (12,5%)		
IVS				
Ausente	50 (87,7%)	8 (100,0%)	0,583	0,862 (0,778-0,956)
Presente	7 (12,3%)	0 (0,0%)		
Estadiamento				
pT2	42 (73,7%)	7 (87,5%)	0,668	0,400 (0,045-3,527)
pT3	15 (26,3%)	1 (2,5%)		
MC				
Livres	34 (59,6%)	6 (75,0%)	0,471	0,493 (0,091-2,659)
Comprometida	23 (40,4%)	2 (25,0%)		

Fonte: Próprio autor

Legenda: Idade em anos à cirurgia; PSA – valor do Antígeno Prostático Específico pré-operatório em ng/ml; EEP – Extensão Extraprostática; IVS – Invasão de Vesícula Seminal; MC – Margens Cirúrgicas; RC (IC 95%) – Razão de chances e intervalo de confiança de 95%; Exposto porcentagem de colunas.

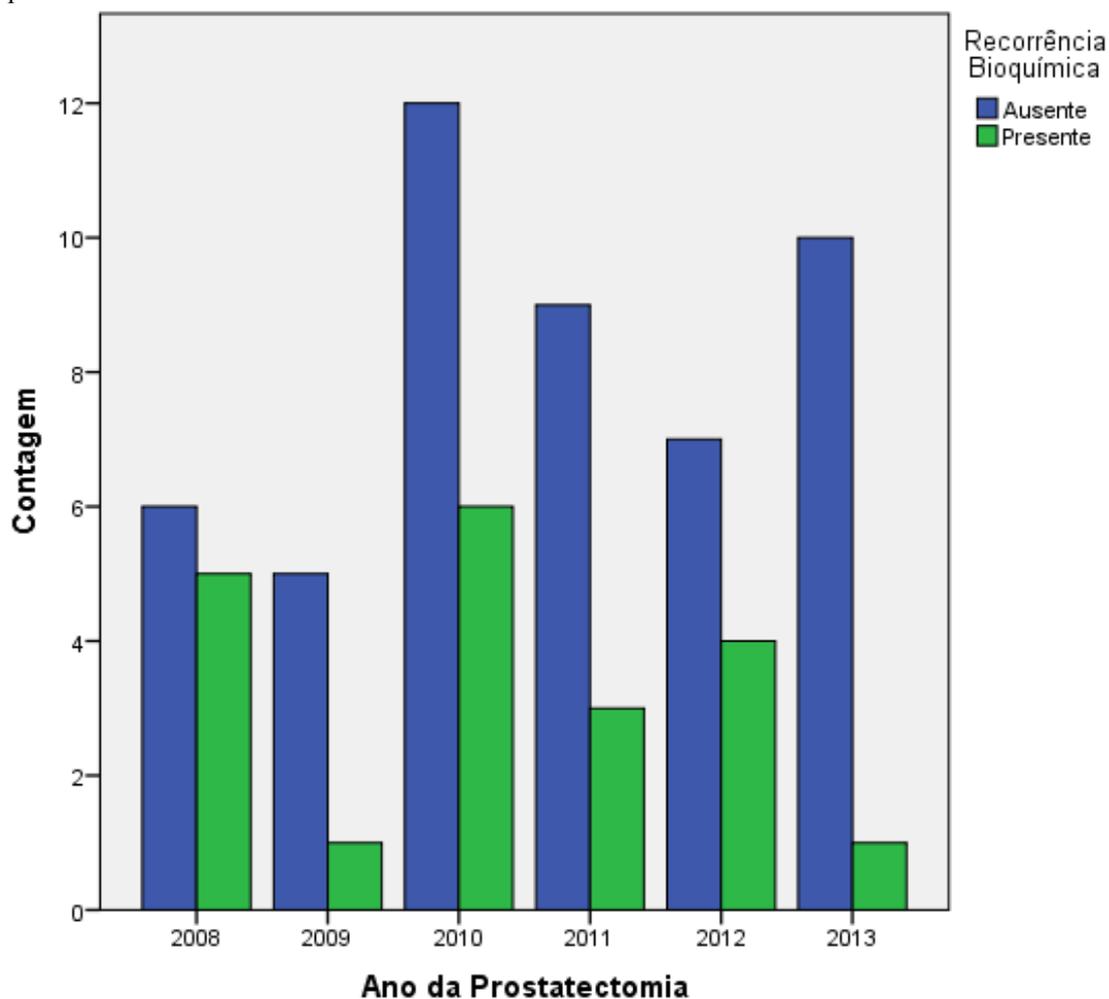
4.3 Recorrência Bioquímica

Dos 74 pacientes submetidos a prostatectomia no período de 2008 a 2013 obteve-se seguimento clínico de 69 (93,2%), estes foram acompanhados por um período mediano de 41 (2-89) meses. Dois pacientes foram a óbito, um deles no pós-operatório

imediate e outro após seguimento clínico sem ter apresentado recorrência bioquímica, sendo consideradas causas de óbito não relacionadas à neoplasia. Nenhum dos pacientes incluídos foi submetido a hormonioterapia pré-operatória ou pós-operatória até o momento da recorrência; um paciente fora submetido a radioterapia neoadjuvante. Houve recorrência bioquímica em 20 dos 69 pacientes (27,0%). O tempo mediano para recorrência foi de 36 (2-89) meses. Os pacientes que não apresentaram recorrência foram acompanhados por um período de 43,43 (DP 22,45) meses e os pacientes que apresentaram recorrência bioquímica foram acompanhados por um período de 51,75 (DP 23,13) meses, não havendo diferença estatística entre o tempo de seguimento dos grupos ($p=0,180$; Teste T).

Entre os pacientes que apresentaram recorrência bioquímica; 7,2% (5/69) foram submetidos à prostatectomia em 2008; 1,4% (1/69) em 2009; 8,7% (6/69) em 2010; 4,3% (3/69) em 2011; 5,7% (4/69) em 2012 e 1,4% (1/69) em 2013. Quanto a porcentagem de recorrência por ano, 45,5% dos pacientes operados em 2008 apresentou recorrência, 16,7% dos pacientes operados em 2009 apresentou recorrência, 33,3% dos pacientes operados em 2010, 25% dos pacientes operados em 2011, 36,4% dos pacientes operados em 2012 e 9,1% dos pacientes operados em 2013 (Gráfico 01).

Gráfico 01 - Comparação entre o número de pacientes com e sem recorrência bioquímica conforme ano da prostatectomia



Fonte: Próprio autor.

Não houve associação com significância estatística para a positividade da cromogranina e a recorrência pelo teste exato de Fisher ($p=1,0$) (Tabela 12) e pela regressão de Cox (Tabela 13), bem como não se observa diferença na curva de sobrevivência de Kaplan-Meier quando comparado pelo teste de Log Rank (Gráfico 02), resultados semelhantes foram observados para as reações do C-MYC (Gráfico 3), da AURKA (Gráfico 4) e do CD44s (Gráfico 5).

Tabela 12 - Análise da recorrência bioquímica conforme fatores de prognóstico dos pacientes submetidos a seguimento clínico baseada na razão de chances e análise estatística pelo teste exato de Fisher

	Recorrência Bioquímica		RC (IC95%)	Significância (Valor de p)
	Ausente	Presente		
Cromogranina				
Negativo	34 (79,1%)	15 (78,9%)	1,007 (0,268-	1,0
Positivo	9 (20,9%)	4 (21,1%)	3,791)	
C-MYC				
Negativo	34 (79,1%)	12 (63,2%)	2,204 (0,672-	0,218
Positivo	9 (20,9%)	7 (36,8%)	7,221)	
AURKA				
Negativo	44 (97,8%)	18 (94,7%)	2,444 (0,145-	0,509
Positivo	1 (2,2%)	1 (5,3%)	41,238)	
CD44s				
Negativo	22 (52,4%)	10 (52,6%)	0,990 (0,334-	1,0
Positivo	20 (47,6%)	9 (47,4%)	2,930)	
Idade				
< 65	18 (36,7%)	11 (55,0%)	0,475	0,188
≥ 65	31 (63,3%)	09 (45,0%)	(0,165–1,365)	
PSA				
< 10	36 (75,0%)	09 (45%)	3,667	0,025
≥ 10	12 (25,0%)	11 (55,0%)	(1,224–10,980)	
Gleason				
6	35 (71,4%)	5 (25%)	7,500	0,001
≥ 7	14 (28,6%)	15 (75,0%)	(2,289–24,575)	
EEP				
Ausente	40 (81,6%)	13 (65,0%)	2,393	0,207
Presente	9 (18,4%)	7 (35,0%)	(0,743–7,705)	
IVS				
Ausente	46 (93,9%)	15 (75,0%)	5,111	0,040
Presente	3 (6,1%)	5 (25%)	(1,090–23,971)	
Estadiamento				
pT2	40 (81,6%)	12 (60,0%)	2,963	0,072
pT3	9 (18,4%)	8 (40,0%)	(0,938–9,360)	
MC				
Livres	33 (67,3%)	10 (50,0%)	2,063 (0,714-	0,273
Comprometidas	16 (32,7%)	10 (50,0%)	5,956)	

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Idade em anos à cirurgia; PSA – nível sérico pré-operatório de Antígeno Prostático Específico (ng/ml); IVS – Invasão de Vesícula Seminal; EEP – Extensão Extraprostática; MC – Margens Cirúrgicas RC (IC95%) – Razão de Chances e intervalo de confiança de 95%

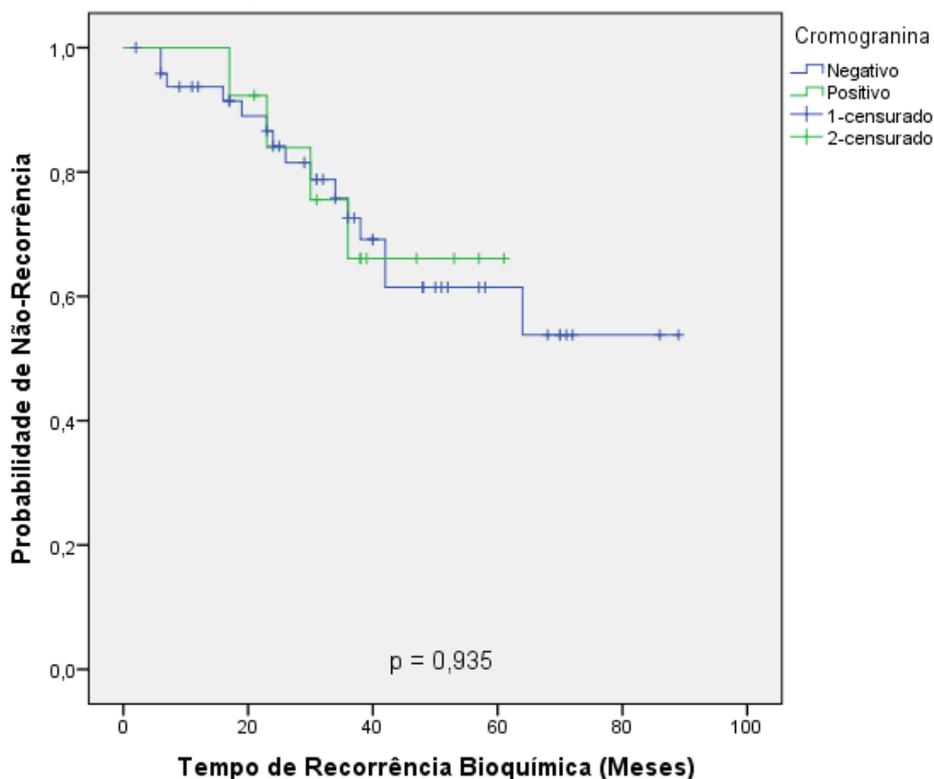
Tabela 13 - Análise de risco conforme fatores de prognóstico para recorrência bioquímica de pacientes submetidos a seguimento clínico após prostatectomia pelo método de regressão de Cox univariada

Variável	Hazard Ratio (IC95%)	Intervalo de Confiança (95%)	Significância (Valor de p)
Cromogranina	1,047	0,344-3,185	0,936
C-MYC	1,878	0,739-4,774	0,186
AURKA	2,326	0,306-17,661	0,414
CD44s	1,100	0,446-2,710	0,836
Idade	0,516	0,213-1,247	0,142
PSA	0,322	0,132-0,782	0,012
Gleason	4,907	1,779-13,53	0,002
IVS	0,605	0,364-1,008	0,054
EEP	0,685	0,429-1,095	0,114
Estadiamento	0,643	0,406-1,017	0,059
MC	0,757	0,488-1,175	0,214

Fonte: Próprio autor

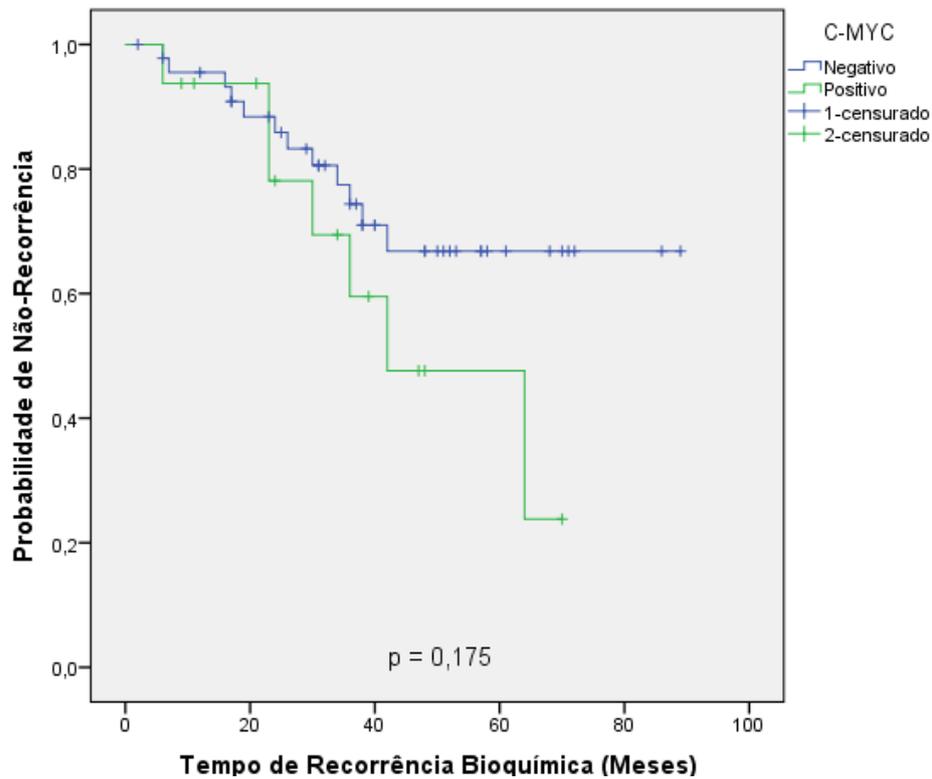
Legenda: Idade em anos à cirurgia; PSA – nível sérico pré-operatório de Antígeno Prostático Específico (ng/ml); IVS – Invasão de Vesícula Seminal; EEP – Extensão Extraprostática; MC – Margens Cirúrgicas.

Gráfico 02 - Probabilidade de recorrência bioquímica conforme marcação imuno-histoquímica para cromogranina na neoplasia: negativo (0 e 1+), negativo (2+ e 3+) curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank



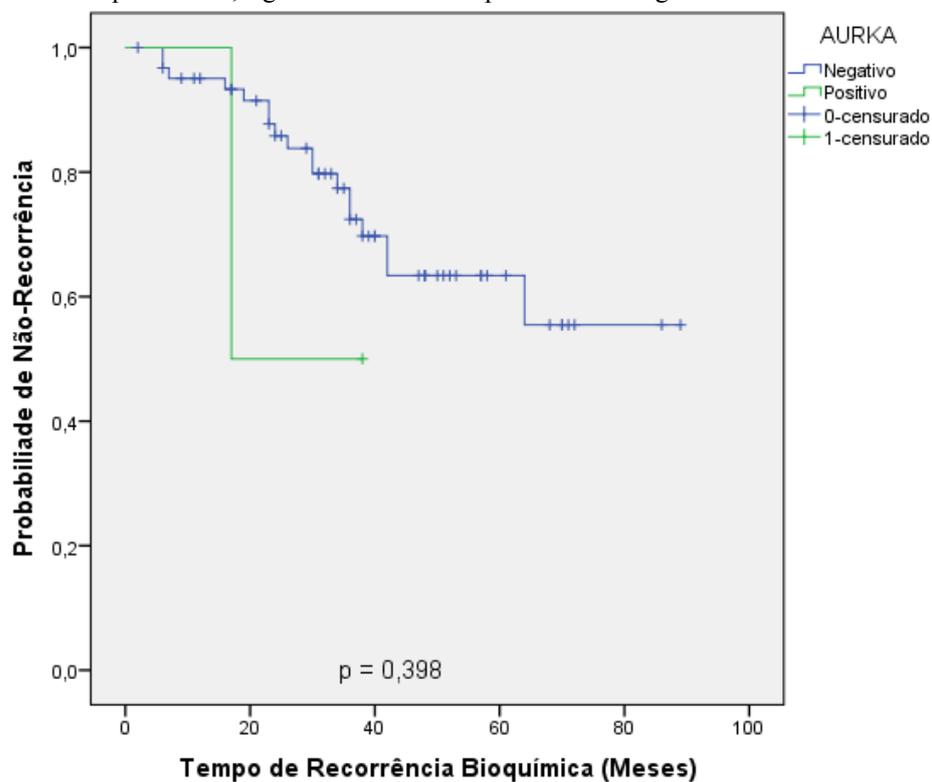
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 03 - Probabilidade de recorrência bioquímica conforme positividade C-MYC na neoplasia, curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank



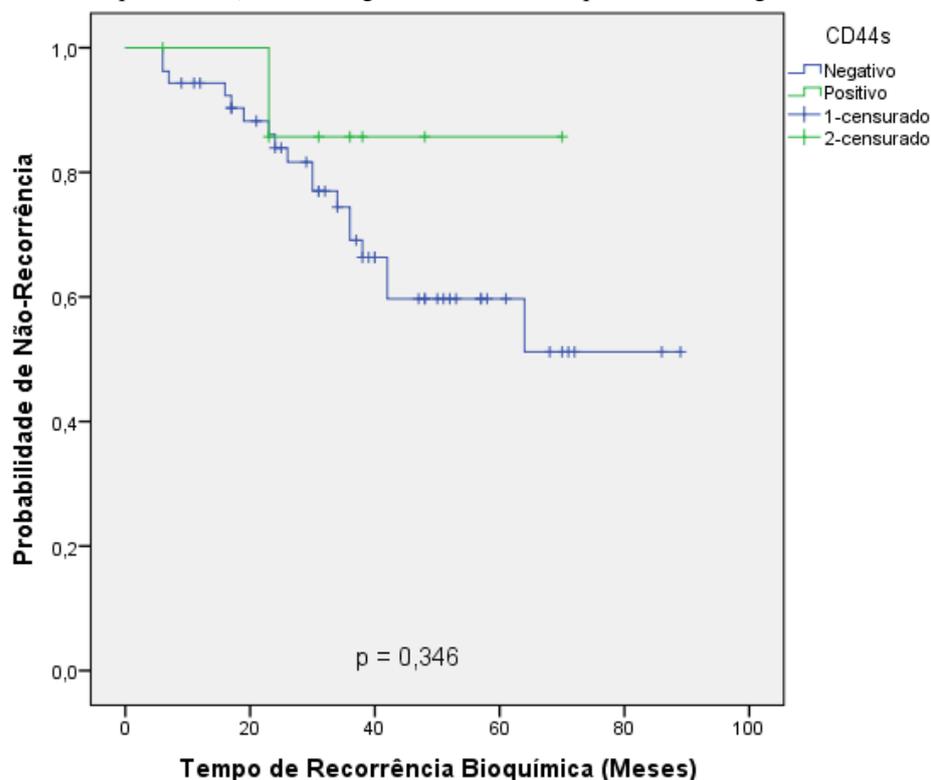
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 04 - Probabilidade de recorrência bioquímica conforme positividade AURKA na neoplasia, curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank



Fonte: Próprio autor.

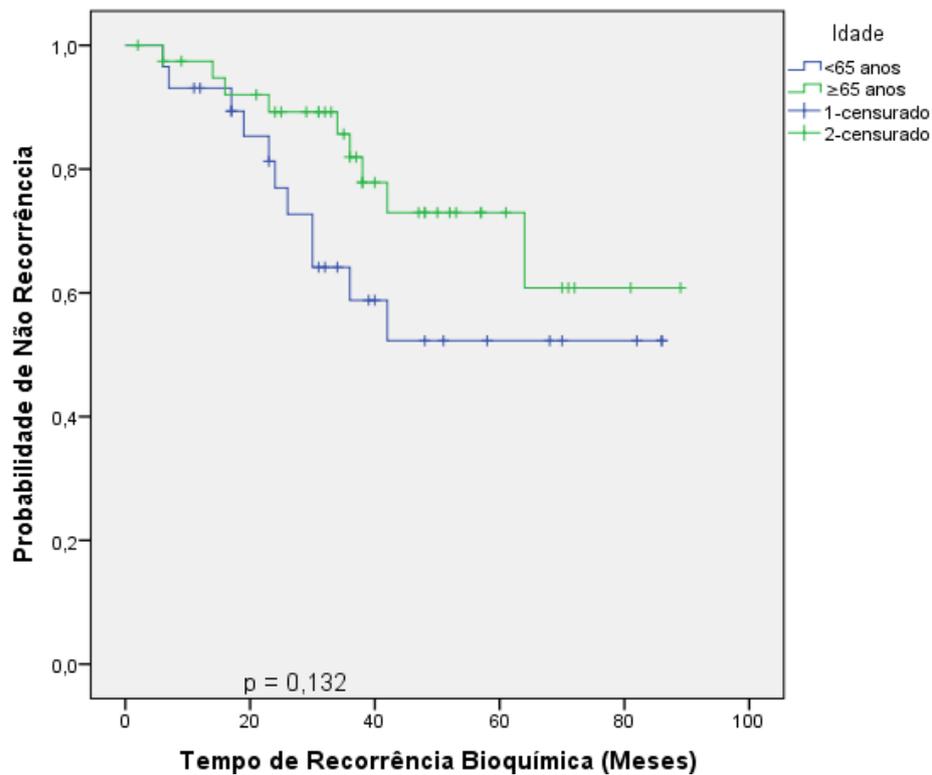
Gráfico 05 - Probabilidade de recorrência bioquímica conforme positividade para CD44s na neoplasia, Curva de Kaplan-Meier, nível de significância avaliada pelo teste de Log Rank



Fonte: Próprio autor.

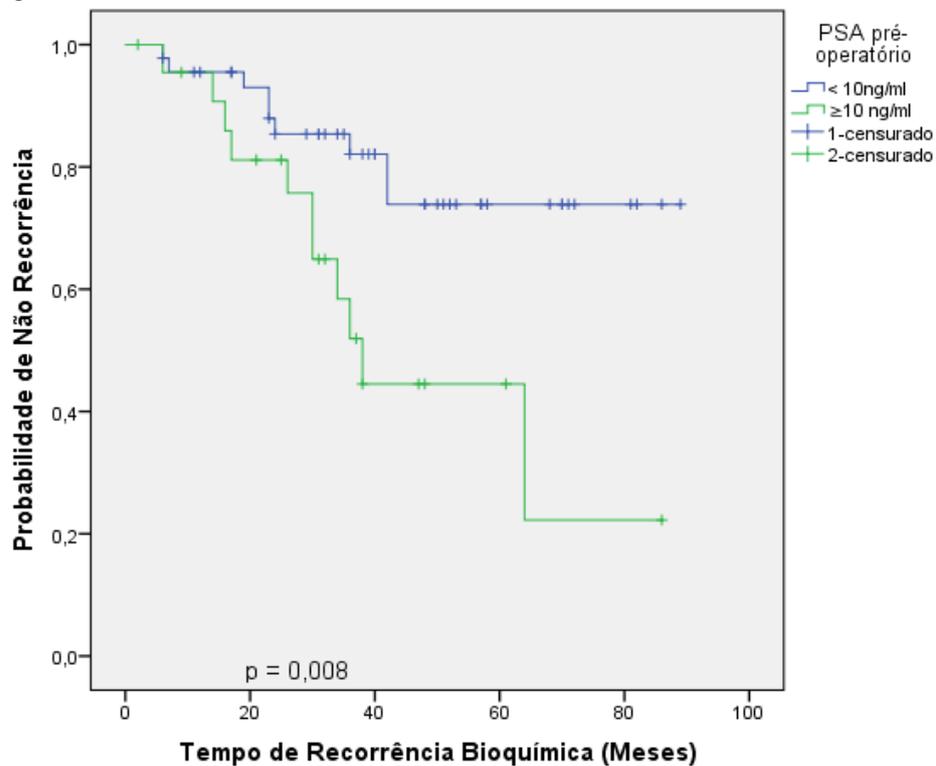
Em todas as metodologias de análise utilizadas o nível sérico de PSA pré-operatório e o Escore de Gleason estiveram relacionados com a recorrência bioquímica (Tabela 12, Tabela 13, Gráfico 07 e Gráfico 08), enquanto que a invasão da vesícula seminal esteve associada com a recorrência pelo teste exato de Fisher e pela curva de Kaplan-Meier com teste de Log Rank (Gráfico 10), ficando com significância periférica na regressão Cox ($p=0,054$). O estadiamento patológico em pT2 e pT3 se associou com a recorrência na curva de Kaplan-Meier (Gráfico 11), ficando também com significância periférica na regressão de Cox ($p=0,059$). Idade (Gráfico 06), extensão extraprostática (Gráfico 09) e o estatos das margens cirúrgicas (Gráfico 12) não apresentaram significância estatística em relação à recorrência bioquímica.

Gráfico 06 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função da idade agrupada em < 65 anos e \geq 65 anos, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank



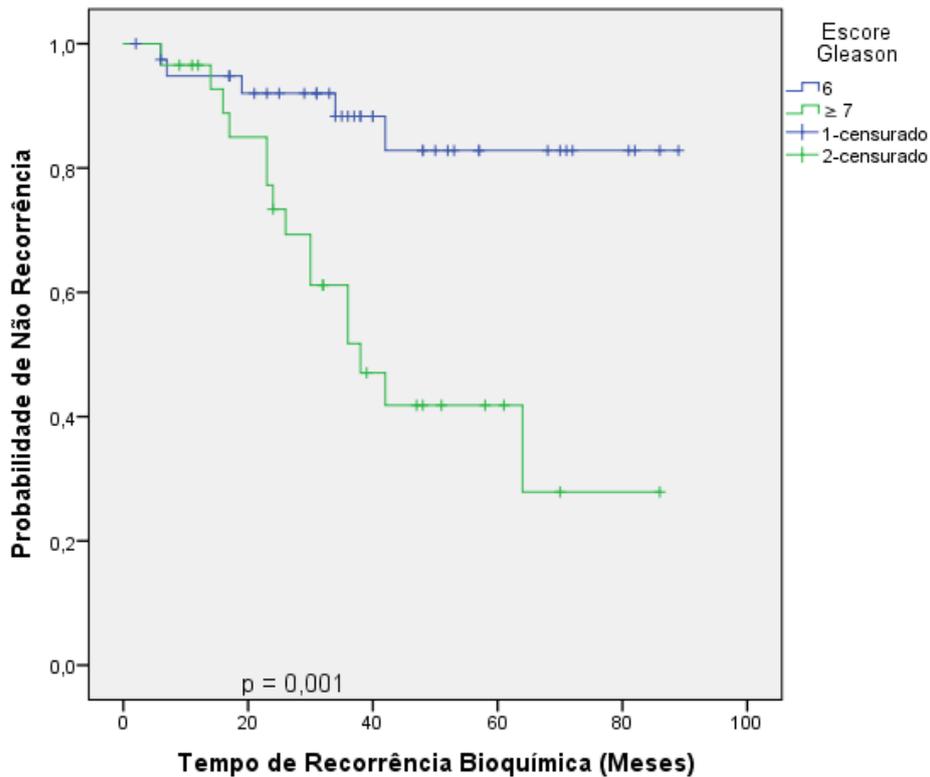
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 07 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função do PSA sérico pré-operatório categorizado em < 10 ng/ml e \geq 10 ng/ml, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank.



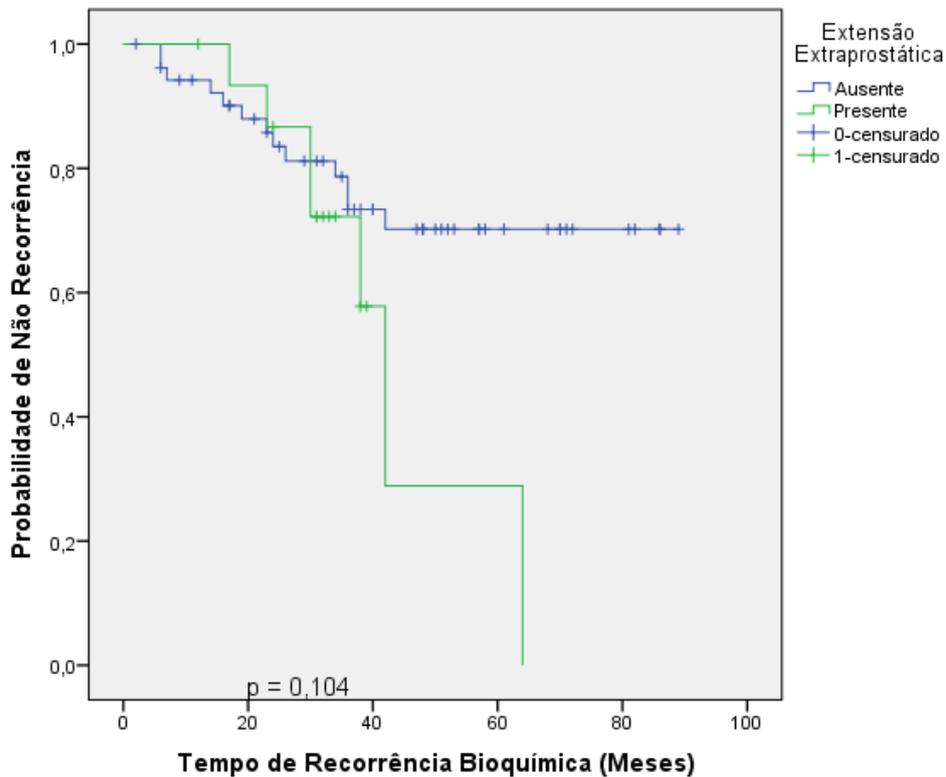
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 08 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função do escore de Gleason, agrupado em escore 6 e ≥ 7 , Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank



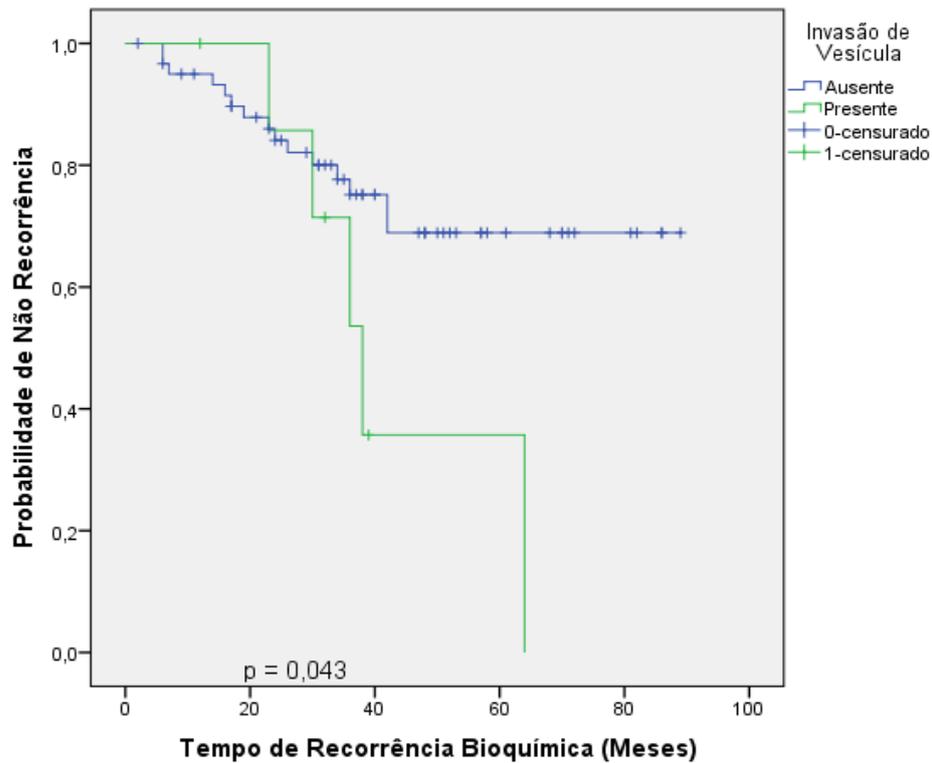
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 09 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função da Extensão Extraprostática, presente ou ausente, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank



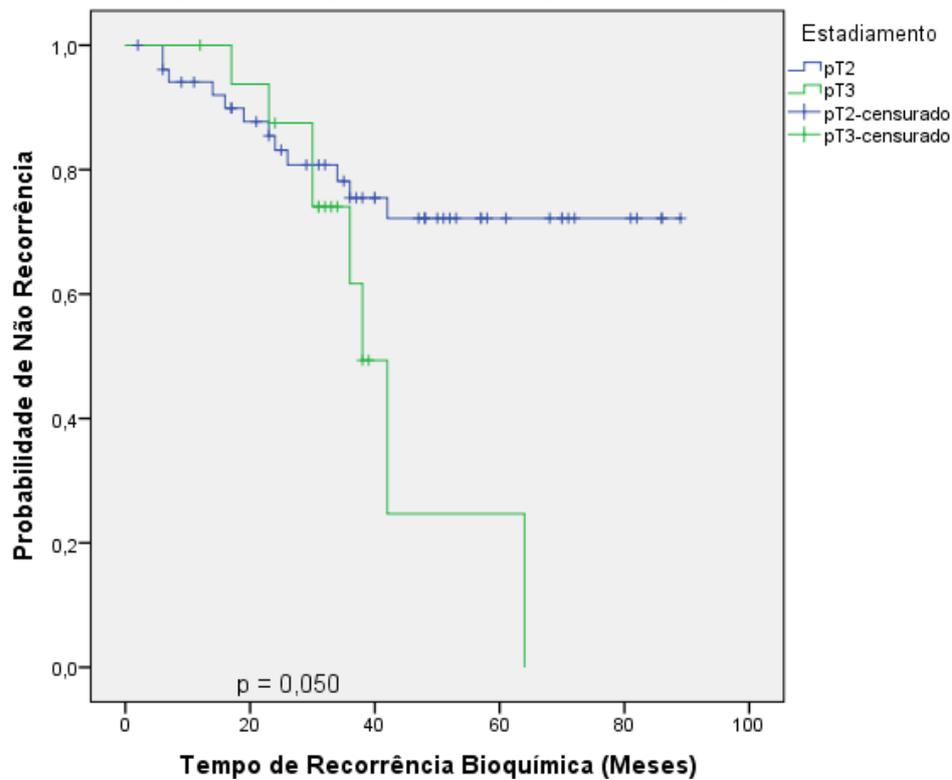
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 10- Probabilidade de recorrência bioquímica em função da Infiltração da Vesícula Seminal presente ou ausente, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank



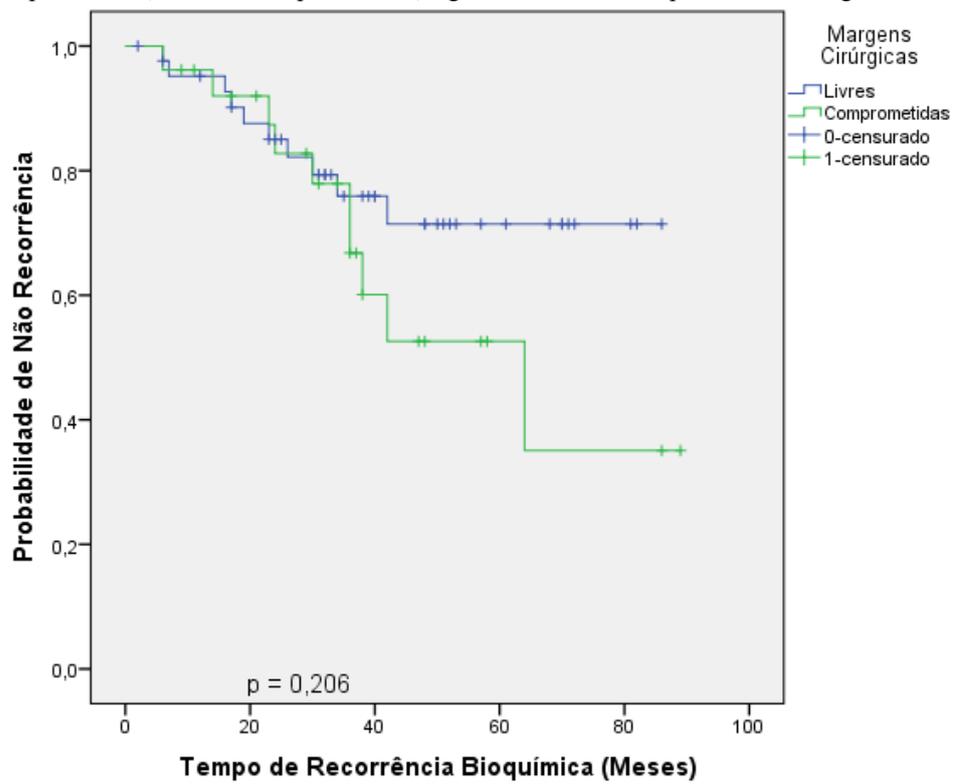
Fonte: Próprio autor.

Gráfico 11 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função do Estadiamento, agrupado em pT2 e pT3, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank



Fonte: Próprio autor.

Gráfico 12 - Probabilidade de recorrência bioquímica em função das Margens Cirúrgicas, livres ou comprometidas, Curva de Kaplan-Meier, significância avaliada pelo teste de Log Rank



Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo buscou-se avaliar se a presença de diferenciação neuroendócrina e fatores indutores de diferenciação neuroendócrina e de células tronco poderia estar associada com evolução dos pacientes submetidos a prostatectomia radical por câncer de próstata.

As características histopatológicas e clínico-laboratoriais avaliadas em relação à idade, ao nível sérico de PSA pré-operatório, ao escore de Gleason, à extensão extraprostática, ao estadiamento e às margens cirúrgicas, foram semelhantes às observadas em outras séries descritas, muitas envolvendo mais de uma centena de pacientes.^{38; 221; 222; 223;121; 122; 224; 225; 226} Houve discreta diferença em relação à infiltração da vesícula seminal, pois se relatam taxas de 3,3 a 7,6%,^{37; 226; 227} tendo sido observado, na população em estudo, valor levemente maior de 10,8%.

Todos os tumores avaliados corresponderam a adenocarcinomas acinares. Nenhum dos casos da presente série apresentou diferenciação neuroendócrina na morfologia, seja de baixo, seja de alto grau. Tendo havido positividade para cromogranina na neoplasia em 21% das amostras, estas foram classificadas como adenocarcinoma usual com diferenciação neuroendócrina.^{26; 36; 37}

Conforme a classificação do “The Prostate Cancer Foundation” de 2013²⁶ adenocarcinomas acinares usuais com células neuroendócrinas são constituídos por adenocarcinomas, de outra forma típicos, com focos ou áreas de células com marcação neuroendócrina entre as células de diferenciação epitelial e apresentam significado clínico desconhecido, não havendo recomendação para pesquisa de rotina. Os tumores carcinoides prostáticos incluiriam tumores neuroendócrinos bem diferenciados ocorrendo na próstata, sem correlação com adenocarcinoma acinar usual, os quais frequentemente não cursam com elevação do PSA, sendo extremamente raros e presentes em pacientes jovens, podendo estar associados à síndromes de neoplasia neuroendócrina múltipla. Carcinomas neuroendócrinos de pequenas células, correspondem a carcinomas com morfologia nuclear típica, ausência de nucléolo, presença de emoldamento nuclear com fragilidade, artefato de esmagamento, alta relação núcleo/citoplasma, bordas celulares indistintas, alta taxa mitótica e frequentes corpos apoptóticos; têm um curso clínico agressivo com frequentes metástases viscerais, sendo tratado com quimioterapia. Carcinomas neuroendócrinos de alto grau mistos com adenocarcinoma acinar usual representariam carcinomas com padrão bifásico em uma

mistura de componentes neuroendócrino de alto grau (pequenas ou grandes células) e adenocarcinomas típicos, a maioria dos pacientes apresenta-se com doença metastática hormônio-insensível, são tratados com quimioterapia e terapia de deprivação hormonal. Carcinomas neuroendócrinos de grandes células são vistos como carcinomas com grandes ninhos celulares formando paliçada periférica, frequente necrose geográfica, nucléolo proeminente, cromatina vesiculosa, células aumentadas de volume com citoplasma amplo, alta taxa mitótica, sendo excepcionalmente raro na sua forma pura, na sua maioria representam progressão de adenocarcinoma acinar após terapia de deprivação hormonal, têm curso clínico bastante agressivo.

Dessa forma, parece não haver dúvidas de que os carcinomas neuroendócrinos de alto grau são agressivos e com prognóstico reservado, merecendo tratamentos diferenciados, porém a importância da diferenciação neuroendócrina de baixo grau em carcinomas acinares ainda continua a ser definida, bem como se ela representa uma lesão precursora de carcinomas neuroendócrinos de alto grau. Especula-se, ainda, que a inibição do compartimento neuroendócrino diminuiria os fatores de crescimento e poderia prevenir a progressão da doença,²²⁸ sendo que terapias alvo contra células neuroendócrinas associadas à terapia endócrina poderiam ter um potencial curativo nos pacientes.²¹⁵

Todavia, há muitos argumentos contra a importância da diferenciação neuroendócrina de baixo grau em adenocarcinomas usuais como fator prognóstico. Em revisão sistemática de relatos de casos de pacientes que evoluíram para carcinomas neuroendócrinos de alto grau, não houve associação com diferenciação neuroendócrina na prostatectomia prévia.²²⁹

Para Bostwick et al, 2014,⁸ a maioria dos estudos não encontrou relação entre adenocarcinomas usuais com diferenciação neuroendócrina e evolução desfavorável, argumentando que, os que encontraram relação foram baseados em análises estatísticas univariadas, resultados que não se reproduziram quando se utilizam análises multivariadas. Argumentando-se também que, a associação com diferenciação neuroendócrina é vista em 10 a 100% dos adenocarcinomas prostáticos,²³⁰ sendo que virtualmente todos os casos de adenocarcinoma apresentam diferenciação neuroendócrina ao menos focal, a depender do número de amostras submetidas a imuno-histoquímica e das técnicas realizadas.⁸

Na amostra estudada, houve associação entre a diferenciação neuroendócrina e carcinomas mais agressivos em relação a infiltração de vesículas

seminais e estadiamento, porém não se observou associação com a recorrência bioquímica. Associação da diferenciação neuroendócrina com a presença de fatores de pior evolução sem associação com recorrência bioquímica também já foi descrita em estudos prévios.^{231; 232} A recorrência bioquímica pode ser detectada muitos anos antes da recorrência clínica.¹⁴⁸ Uma série de fatores pode influenciar na recorrência e nem todos os homens que apresentam recorrência bioquímica terão progressão da doença. Na série de Pound et al, 1999,²³³ 15% dos pacientes submetidos a prostatectomia desenvolveram recorrência bioquímica em 15 anos, 34% dos pacientes que desenvolveram recorrência evoluíram com metástases em um período de 8 anos e 43% dos pacientes que desenvolveram metástases foram a óbito pelo câncer de próstata após um tempo médio de 5 anos. Assim, a análise da recorrência bioquímica como desfecho em relação à evolução da doença é passível de críticas por não apresentar relação linear com mortalidade. Porém, tem sido amplamente utilizada em estudos com curto período de seguimento, pois, aproximadamente 90% das recorrências bioquímicas ocorrem até 5 anos após a cirurgia.²³⁴

Seguindo a linha de raciocínio proposta para este estudo, na qual a diferenciação neuroendócrina nas fases iniciais do adenocarcinoma prostático representaria predisposição para evolução à adenocarcinomas neuroendócrinos de alto grau, como consequência da terapia de deprivação hormonal, a recorrência bioquímica representaria estágio intermediário de evolução, uma vez que, de forma geral inicia-se a deprivação hormonal nos pacientes com câncer localizado quando ocorre recidiva. Maior tempo de seguimento seria necessário para avaliar a recorrência clínica da doença. De acordo com essa suposição, alguns autores relatam que após 10 anos de seguimento as curvas de sobrevivência começam a se afastar de forma significativa conforme a positividade da cromogranina.^{235; 236} Os pacientes avaliados nesse estudo tiveram seguimento mediano de 3,4 anos.

Em relação aos resultados observados para o C-MYC deve-se considerar a positividade global encontrada na neoplasia inferior a observada em outros estudos, a associação com neoplasia mais agressivas e a ausência de associação com recorrência bioquímica. O trabalho de Jenkins et al, 1997,²³⁷ constitui um dos primeiros trabalhos, analisando a associação entre o câncer de próstata e C-MYC, no qual ao se avaliar em prostatectomias, as correlações com ganho do cromossomo 8, localização do C-MYC, observou-se que a amplificação do locus 8q24 pelo método de FISH se associou com a

expressão imuno-histoquímica da proteína C-MYC, pelo clone 9E11. no tecido não neoplásico, no carcinoma primário e no carcinoma metastático para linfonodos. Relatando a existência de cópias extras do locus 8q24 em 44% dos focos de carcinoma e 92% das metástases em linfonodos. Amplificação isolada do 8q24 foi observada em 21% das metástases e 8% dos carcinomas. Positividade focal para o marcador imuno-histoquímico foi vista no epitélio benigno, positividade difusa foi vista em 82% dos cânceres, correlacionando-se com o ganho de cromossomos 8 e com a amplificação do 8q24. Sato et al, 1999,²³⁸ demonstraram pior evolução clínica dos pacientes com alterações do cromossomo 8 e do locus 8q24. Budenforf et al, 1999,²³⁹ observaram amplificação do C-MYC em 10,6% dos carcinomas prostáticos metastáticos, em 4,3% dos carcinomas com recorrência local, porém, sem alterações nos carcinomas primários.

Epstein et al, 2005,¹¹² observaram que amplificação do 8q24 se associou com a superexpressão imuno-histoquímica do C-MYC nuclear, porém apenas a amplificação e não a superexpressão esteve associada com agressividade tumoral, sendo que aproximadamente 25% dos casos tiveram superexpressão imuno-histoquímica sem correlação com amplificação gênica.

Ribeiro et al, 2007,²⁴⁰ demonstraram que a amplificação da região 8q24 está associada com fatores de pior prognóstico em biópsias.

Gurel et al, 2008,²⁴¹ relatam que a expressão do mRNA do C-MYC eleva-se no câncer de próstata em relação ao epitélio normal e é menor na hiperplasia prostática benigna, observando-se que o aumento no mRNA não apresentava correlação direta com expressão proteica e ganho de função. Ao estudar a expressão imuno-histoquímica nuclear do clone Y69 do C-MYC no epitélio normal, no epitélio atrófico, no PIN e no carcinoma de próstata primário e metastático, observou que na maioria dos casos o epitélio normal não expressava C-MYC e quando expressa, esta é de baixa intensidade e principalmente de localização basal. Células endoteliais expressaram C-MYC de forma variável e células estromais são negativas. A mediana de expressão nas áreas atróficas é semelhante a do epitélio normal, porém com expressão predominante em células luminais. No carcinoma, a maioria das células foi positiva forte para C-MYC, sendo que independentemente do escore de Gleason as áreas neoplásicas expressam mais C-MYC que as células normais. A comparação entre diferentes escores de Gleason não foi linear, pois as áreas de Gleason 4 tiveram menor expressão que as de Gleason 3 e áreas de Gleason 5 tiveram expressão semelhante às de Gleason 3. A expressão nas metástases em linfonodos e ossos de pacientes não tratados foi semelhante ao carcinoma

primário e maior que o epitélio normal. Em relação à amplificação do 8q24 (8q24.12-24.13), por FISH, observou-se que esteve correlacionada com o escore de Gleason, quanto mais alto o escore de Gleason maior o encontro de amplificação do 8q24, porém não houve correlação com a expressão imuno-histoquímica.²⁴¹

Hawksworth et al, 2010,²⁴² relataram que a expressão do mRNA do C-MYC nos carcinomas é maior que no epitélio benigno, não se correlacionando com raça, estadiamento, escore de Gleason e estatus das margens cirúrgicas, porém correlacionando-se com recorrência bioquímica. A expressão imuno-histoquímica e o aumento na expressão do mRNA não apresentaram forte correlação.

Em resumo, a amplificação do cromossomo 8, a amplificação da região 8q24, o aumento da expressão do mRNA do C-MYC e a superexpressão protéica do C-MYC são bem descritas na literatura para o câncer de próstata, não havendo relação direta entre amplificação e superexpressão e parecendo que apenas a amplificação tem relação com prognóstico. Os achados de Gurel et al, 2008,²⁴¹ também suportam a hipótese de que o C-MYC participa do processo fisiológico normal da próstata, porém a sua superexpressão é um fenômeno bastante comum no carcinoma, sendo um evento crítico, precoce e prevalente na carcinogênese prostática. Propondo-se que a expressão de C-MYC preferencialmente em células luminais, no PIN, na atrofia e no carcinoma poderiam ser uma evidência de desdiferenciação das células terminais para células com diferenciação intermediária ou células-tronco, impedindo a diferenciação terminal.

Quando se comparou a taxa de positividade encontrada para o C-MYC no presente estudo, com os achados publicados por Gurel et al, 2008,²⁴¹ os quais utilizaram o mesmo clone para reação, observou-se que, naquele estudo, houve uma positividade global no epitélio prostático normal de 23% e no carcinoma de 81,6%, diferindo em relação à taxa de positividade encontrada neste estudo que foi de 27,3% na neoplasia e concordante em relação à positividade focal e basal em 25% do epitélio não neoplásico. Achados muito semelhantes foram encontrados, no presente estudo, com a repetição da reação com outro clone de anticorpo (EP121).

Algumas hipóteses podem ser aventadas para justificar a taxa de positividade inferior em relação à imunoexpressão do C-MYC na neoplasia. As amostras de prostatectomias utilizadas não foram processadas imediatamente após a cirurgia e foram fixadas em formol 10% inteiras, podendo haver interferência na positividade para o C-MYC devido a artefatos de fixação. Outro dado é que o tempo e as condições de armazenamento podem interferir na antigenicidade do material.²⁴³

Porém, analisando de forma indireta, 98,5% das amostras mostraram marcação ao menos focal para cromogranina.

A parte a consideração acima, pode-se supor que a população em estudo apresenta menores taxas de expressão de C-MYC na patogênese neoplásica, sendo necessário melhor caracterização desse achado, possivelmente com a pesquisa da expressão do mRNA do C-MYC por PCR e/ou pela pesquisa da amplificação gênica do 8q24 por FISH.

Por outro lado, neste estudo, houve associação entre a expressão do C-MYC com escores de Gleason mais altos e com a infiltração da vesícula seminal, porém não houve associação com a recorrência bioquímica.

Não se observou expressão imuno-histoquímica para o N-MYC, clone NMC II 100, nas prostatectomias estudadas. Não é possível comparação desse achado com estudos prévios, pois os existentes são baseados em biologia molecular. Bubendorf et al, 1999,²³⁹ não encontraram amplificação do N-MYC em 164 tumores prostáticos primários, recorrentes e metastáticos, através da técnica de FISH. Ao contrário de Mosquera, JM, et al, 2013¹⁶¹ que demonstraram amplificação do N-MYC em 70% dos carcinomas primários prostáticos que evoluíram para carcinomas neuroendócrinos, em 69% dos carcinomas neuroendócrinos tratados, em 83% das metástases de carcinomas neuroendócrinos e em 5% de carcinomas não selecionados.

A ausência de imunoexpressão para o N-MYC clone NCM II 100, na próstata, mesmo com a validação da reação da técnica em neuroblastoma metastático amplificado, requer mais estudos. A possibilidade de problemas na fixação, como a referida para o C-MYC também deve ser considerada, porém esta foi reduzida ao se fazer a reação em carcinoma neuroendócrino prostático de alto grau, proveniente de ressecção transuretral, composta por fragmentos pequenos e de fácil fixação, realizada em formol 10% tamponado; mostrando-se também totalmente negativa. Com base nas técnicas utilizadas não é possível inferir se a proteína presente na neoplasia prostática é diferente da proteína expressa pelo neuroblastoma, justificando a negatividade, ou se não há expressão do N-MYC nos casos avaliados, devido ao fato de não haver superexpressão e/ou amplificação.

A Aurora Quinase A (AURKA) foi positiva na imuno-histoquímica em 98,5% dos casos nas células inflamatórias e em 46,3% no epitélio benigno. Quanto à

marcação no epitélio prostático não neoplásico, houve marcação citoplasmática intensa em pequeno número de células. Buschhorn et al, 2005,²⁴⁴ descreve positividade de 29% dos casos no epitélio benigno, utilizando-se clone diferente com marcação em dot perinuclear. Ao contrário de Beltran et al, 2011,¹⁵⁷ que não encontraram imunoe expressão de AURKA no epitélio não neoplásico utilizando-se o mesmo clone, de marcação citoplasmática.

Dois casos avaliados apresentaram marcação para AURKA na neoplasia (2,8%). Beltran et al, 2011¹⁵⁷ relatam uma porcentagem de imunoe expressão da AURKA em 12% dos adenocarcinomas usuais e em 76% dos carcinomas neuroendócrinos, com expressão fraca e focal nos adenocarcinomas usuais e forte e difusa nos carcinomas neuroendócrinos. Ainda segundo Beltran et al, 2011,¹⁵⁷ a amplificação e a superexpressão do N-MYC e da AURKA são eventos frequentes em carcinomas neuroendócrinos da próstata e presentes em 5% dos pacientes com adenocarcinoma usual, acreditando que estes pacientes podem estar sob risco para desenvolvimento de formas mais agressivas de carcinoma e que poderiam se beneficiar de tratamentos mais intensivos.

No momento a literatura científica tende a associar a elevação da AURKA com prognóstico pobre dos tumores¹⁹¹ e por suas ações no ciclo celular e seu potencial oncogênico a AURKA têm se tornado um alvo popular em terapêuticas, seja especificamente contra a forma A, seja com drogas pan-Aurora quinase.¹⁹¹ Carcinomas neuroendócrinos prostáticos apresentam sensibilidade, “*in vivo*” e “*in vitro*”, à inibição da Aurora quinase pelo PHA-739358 (Nerviano Medical Science, Milan, Italy), demonstrando completa supressão de marcadores neuroendócrinos e regressão da superexpressão do N-MYC.¹⁶¹ Os inibidores da Aurora quinase que entraram em teste pré-clínicos MK-0457 e MK-5108 (Merck), AZD1152 (Astra Zeneca), At9283 (Astex Therapeutics), PF-03814735 (Pfizer), AS703569 (EMD Serono), PHA-739358 (Nerviano), MLN8054 e MLN8237 (Millenium), obtiveram resultados modestos no controle do carcinoma prostático avançado.¹⁹¹

Tendo-se obtido positividade para dois casos a análise estatística e as correlações foram realizadas pró-forma, pois estas tornam-se prejudicadas pelo tamanho amostral, não tendo havido associação com nenhum fator de prognóstico, bem como um dos pacientes positivos apresentou recorrência bioquímica e o outro não apresentou recorrência bioquímica.

CD44s foi observado ao menos focalmente em 60,9% dos casos no processo inflamatório, 64,7% no epitélio benigno e em 49,2% dos casos na neoplasia. Considerando-se a positividade na imuno-histoquímica por escores, ou seja, positividade com no mínimo moderada intensidade e/ou extensão; mais que focal, 42% dos casos tiveram marcação nas células inflamatórias, 39,7% dos casos tiveram marcação em células benignas e 12,7% dos casos tiveram marcação na neoplasia. A marcação foi circunferencial em células basais e basolateral nas células luminais, inequivocamente com morfologia de células terminalmente diferenciadas, semelhante ao previamente descrito por Wang et al, 2015²⁰⁴ e De Marzo et al, 1998.²⁴⁵ CD44s é quase sempre expresso por glândulas benignas e pela maioria dos tumores.^{246; 247} De Marzo et al, 1998,²⁴⁵ observaram marcação em 70 a 100% das células luminais e positividade uniforme nas células basais no epitélio não neoplásico, marcação em coleções de linfócitos e positividade na neoplasia em 80% dos casos. Kallakury et al, 1998,²⁴⁸ observaram taxa de positividade de 47% na neoplasia. Como se acredita que aproximadamente 0,1% das células tumorais expressam fenótipo de células-tronco,²⁴⁹ pode-se questionar se o CD44s é um bom marcador para células-tronco na imuno-histoquímica? Como pode um marcador tão difusamente expresso ser implicado na identificação de células tronco?

Células-tronco têm sido isoladas e identificadas em diferentes métodos, como a citometria de fluxo,²⁵⁰ utilizando-se principalmente os marcadores de superfície CD44, CD133, CD24, CD40 e $\alpha 2\beta 1$ integrina, em geral, de forma combinada e não isolada.^{249; 250} Além disso, Garraway, I.P., 2012,²⁵¹ aponta para dificuldades técnicas observadas na comprovação da existência de células-tronco prostáticas e ao limitado número de estudos sobre o tema, sugerindo que evidências concretas da existência de células-tronco neoplásicas prostáticas ainda são escassas.

Nesse estudo utilizou-se a marcação para a forma core ou standard do CD44 (CD44s), trabalhos prévios utilizaram marcadores pan-CD44 para a identificação de células-tronco, os quais reconhecem CD44s e moléculas CD44v (variantes),¹⁶⁰ ficando em aberto o potencial de marcação das variantes do CD44.

Outra aparente incongruência observada na literatura e no presente trabalho é a seguinte: teoriza-se que células-tronco presentes na porção basal do epitélio sejam capazes de se autorrenovarem e se diferenciarem em células terminais.^{19; 20} Células-tronco cancerígenas seriam uma população específica de raras células transformadas apresentando crescimento em série ilimitado e que ao contrário das células-tronco não

cancerígenas poderiam apresentar instabilidade genética e heterogeneidade, permitindo a formação e crescimento tumoral, o que em última instância poderia levar à resistência à quimioterapia e recorrência tumoral.^{22; 24; 160; 252} Entretanto, já foi descrito que epitélio prostático normal expressa mais CD44 que o neoplásico. Carcinomas prostáticos que expressam CD44 são menos agressivos e carcinomas com perda da expressão de CD44 tendem a ter características mais agressivas.^{245; 246; 247; 248; 253; 254; 255} Nesse estudo a expressão de CD44s se associa com menores taxas de PSA pré-operatório e menores escores de Gleason quando não categorizados ou agrupados.

Uma forma de avaliar a perda da expressão do CD44 do normal para o neoplásico e do neoplásico de baixo grau para o neoplásico de alto grau é considerando-o como uma molécula de adesão. Moléculas relacionadas com a adesão celular (α e β cateninas, E-caderina e integrinas) apresentam expressão reduzida quando comparado o normal com o tumoral e o tumoral desdiferenciado com o tumoral diferenciado.^{256; 257}

E por fim, neste estudo CD44s não se correlacionou com a recorrência bioquímica. Brewster et al, 1999,²⁵⁸ analisaram a expressão do CD44 e sua associação com recorrência bioquímica em 76 pacientes, com seguimento médio de 38 meses e concluiu não haver associação entre a perda da expressão do CD44 e recorrência bioquímica. Ao contrário de Kallakury et al, 1998²⁴⁸ o qual encontraram correlação entre a expressão do CD44s e recorrência bioquímica, diferentemente desse estudo, considerou como ponto de corte para a recorrência 0,4 ng/ml e não 0,2 ng/ml. Vis et al, 2000,²⁵⁹ demonstraram associação entre a perda da expressão de CD44s e recorrência clínica em estudo com seguimento médio de 112 meses.

Escore de Gleason maior que 6, PSA pré-operatório maior que 10ng/ml, infiltração de vesículas seminais e estadiamento pT3 estiveram associados com maior risco de recorrência bioquímica pelo menos em um dos testes estatísticos, tal como na maioria dos outros trabalhos.^{37; 43}

A idade não influenciou a recorrência bioquímica, pacientes com menos de 65 anos tiveram risco para apresentar recorrência bioquímica levemente maior que pacientes acima de 65 anos, porém esse achado não teve significância estatística. A relação entre idade e recorrência bioquímica tem sido alvo de discussão e a maioria dos artigos revisados não demonstra associação direta.^{214; 260; 261; 262} Xu et al, 2009,²⁶³ encontraram relação com idade ao estratificar os pacientes conforme o Gleason e concluiu que a idade tem uma relação complexa com a recorrência bioquímica.²⁶³

O estatus das margens cirúrgicas e a extensão extraprostática, não se correlacionaram com a recorrência bioquímica em nenhuma das formas de análise utilizadas, apesar de que a partir de aproximadamente 30-40 meses passaram a apresentar distanciamento entre as curvas de risco de Kaplan-Meier. Outros fatores que devem ser levados em consideração, além do tempo de seguimento, quanto à ausência de significância em relação às margens cirúrgicas, são a realização de radioterapia adjuvante em pacientes que as possuem comprometidas e a proporção de tecido prostático submetido a processamento histológico.

Considerações finais:

Este estudo objetivou correlacionar a evolução clínico-laboratorial de pacientes submetidos à prostatectomia radical com possíveis novos fatores de prognóstico imunohistoquímicos relacionados à indução da diferenciação neuroendócrina e células-tronco em pacientes operados no Hospital Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, no período de 2008 a 2013 e que foram submetidos a acompanhamento clínico ambulatorial até junho de 2016.

Avaliou-se a proporção daqueles que apresentaram recorrência bioquímica, bem como as características clínico-patológicas e a positividade em reações de imunohistoquímica para cromogranina (diferenciação neuroendócrina), Aurora quinase A (AURKA), N-MYC, C-MYC e CD44s, em material parafinado.

De 74 pacientes submetidos à cirurgia, obteve-se acompanhamento de 69, com tempo mediano de seguimento de 41 meses (2-89 meses). Observou-se que 27,0% dos pacientes apresentaram recorrência bioquímica, não tendo sido observada associação significativa com a diferenciação neuroendócrina, bem como com a expressão de C-MYC e CD44s.

Em apenas dois pacientes houve positividade para AURKA na neoplasia, não tendo sido observado diferença na evolução desses.

Não houve positividade de marcação imunohistoquímica para N-MYC.

Nível sérico de PSA pré-operatório, escore de Gleason, invasão de vesícula seminal e estadiamento se associaram com recorrência bioquímica, pelo menos em um dos métodos de análise; enquanto que a extensão extraprostática e o estatus das margens cirúrgicas não apresentaram significância estatística em relação à recorrência.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, a detecção imuno-histoquímica da diferenciação neuroendócrina, vista em adenocarcinomas acinares se associou com carcinomas mais agressivos em relação a invasão de vesículas seminais e estadiamento, porém sem associação com recorrência bioquímica.

A expressão do C-MYC se associou a escores de Gleason mais altos e infiltração da vesícula seminal, da mesma forma, sem associação com a recorrência bioquímica.

Não houve expressão imuno-histoquímica de N-MYC.

Raros casos de adenocarcinoma acinar usual expressaram AURKA, sem associação com prognóstico.

CD44s foi mais expresso no epitélio normal que no neoplásico, e no epitélio normal marcou células de aspecto morfológico terminalmente diferenciado (células luminiais). A expressão de CD44s na neoplasia se associou a tumores com menores valores de PSA pré-operatório e escores de Gleason, porém sem associação com recorrência bioquímica.

REFERÊNCIAS

- 1 MCNEAL, J. E. Prostate. In: **Histology for Pathologists**. 3ed. Lippincott Williams e Wilkins, 2007.
- 2 TIMMS, B. G.; MOHS, T. J.; DIDIO, L. J. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. **J Urol**, v. 151, n. 5, p. 1427-32, 1994.
- 3 TIMMS, B. G. et al. Instructive induction of prostate growth and differentiation by a defined urogenital sinus mesenchyme. **Microsc Res Tech**, v. 30, n. 4, p. 319-32, 1995.
- 4 MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Dev Biol**, v. 253, n. 2, p. 165-74, 2003.
- 5 HAYWARD, S. W. et al. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. **Acta Anat (Basel)**, v. 155, n. 2, p. 81-93, 1996.
- 6 WONG, Y. C.; WANG, X. H.; LING, M. T. Prostate development and carcinogenesis. **Int Rev Cytol**, v. 227, p. 65-130, 2003.
- 7 CUNHA, G. R.; LUNG, B. The possible influence of temporal factors in androgenic responsiveness of urogenital tissue recombinants from wild-type and androgen-insensitive (Tfm) mice. **J Exp Zool**, v. 205, n. 2, p. 181-93, 1978.
- 8 BOSTWICK, D. G.; CHENG, L. **Urologic Surgical Pathology**. 3ed. Philadelphia, Elsevier, 2014. p. 352-516.
- 9 ZHUANG, T. N. et al. Growth and development during early manhood as determinants of prostate size in later life. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 11, p. 6055-63, 2005.
- 10 MATSUDA, T.; FUJIME, M.; SUDA, K. Relationship between the prostatic tissue components and natural history of benign prostatic hyperplasia. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 28, n. 3, p. 121-4, 2006.
- 11 LEISSNER, K. H.; TISELL, L. E. The weight of the human prostate. **Scand J Urol Nephrol**, v. 13, n. 2, p. 137-42, 1979.
- 12 SELMAN, S. H. The McNeal Prostate: A Review. **Urology**, v. 78, n. 6, p. 1224-1228, 2011. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429511021376> > Acesso em: 22 abr. 2015.
- 13 MC NEAL, J. E. Origin and development of carcinoma in the prostate. **Cancer**, v. 23, n. 1, p. 24-34, 1969.
- 14 MC NEAL, J. E. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. **Invest Urol**, v. 15, n. 4, p. 340-5, 1978.

- 15 ZHAO, H. et al. Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. **J Cell Physiol**, v. 210, n. 1, p. 111-21, 2007.
- 16 VAN DER HEUL-NIEUWENHUIJSEN, L. et al. Gene expression profiling of the human prostate zones. **BJU Int**, v. 98, n. 4, p. 886-97, 2006.
- 17 COLOMBO, P. et al. Molecular disorders in transitional vs. peripheral zone prostate adenocarcinoma. **Int J Cancer**, v. 94, n. 3, p. 383-9, 2001.
- 18 SUN, Y.; NIU, J.; HUANG, J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. **Am J Transl R**, v. 1, n. 2, p. 148-162, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2776313/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2776313/pdf/ajtr0001-0148.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2015.
- 19 FOSTER, C. S. et al. Prostatic stem cells. **J Pathol**, v. 197, n. 4, p. 551-65, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115870>>. Acesso em: 22 abr. 2015.
- 20 COLLINS, A. T. et al. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 21, p. 3865-72, 2001.
- 21 WANG, Y. et al. Cell differentiation lineage in the prostate. **Differentiation**, v. 68, n. 4-5, p. 270-9, 2001.
- 22 HILL, R. P.; PERRIS, R. "Destemming" cancer stem cells. **J Natl Cancer Inst**, v. 99, n. 1460-2105, p. 1435-40, 2007. Disponível em <<http://jnci.oxfordjournals.org/content/99/19/1435.long>>. Acesso em 13 out. 2016.
- 23 CLARKE, M. F. et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. **Cancer Res.**, v. 66, n. 1538-7445, p. 9339-44, 2006. Disponível em <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/19/9339>>. Acesso em: 13 out. 2016.
- 24 REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105-11, 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6859/full/414105a0.html>>. Acesso em 21 out 2015.
- 25 RICHARDSON, G. D. et al. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 16, p. 3539-45, 2004.. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/content/117/16/3539.full.pdf>>. Acesso em : 23 out 2015.

- 26 EPSTEIN, J. I. et al. Proposed morphologic classification of prostate cancer with neuroendocrine differentiation. **Am J Surg Pathol**, v. 38, n. 6, p. 756-67, v2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112087/>> Acesso em 13 out 2016.
- 27 FETISSOF, F. et al. Endocrine cells in the prostate gland, urothelium and Brenner tumors. Immunohistological and ultrastructural studies. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, v. 42, n. 1, p. 53-64, 1983.
- 28 ABRAHAMSSON, P. A. et al. Peptide-hormone- and serotonin-immunoreactive cells in normal and hyperplastic prostate glands. **Pathol Res Pract**, v. 181, n. 6, p. 675-83, 1986.
- 29 DI SANT'AGNESE, P. A.; DE MESY JENSEN, K. L. Somatostatin and/or somatostatin-like immunoreactive endocrine-paracrine cells in the human prostate gland. **Arch Pathol Lab Med**, v. 108, n. 9, p. 693-6, 1984.
- 30 XING, N. et al. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. **Prostate**, v. 48, n. 1, p. 7-15, 2001. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.1076/abstract> >. Acesso em : 22 abr. 2015.
- 31 DEFTOS, L. J. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. **Endocr Rev**, v. 12, n. 2, p. 181-7, 1991. Disponível em: < http://press.endocrine.org/doi/10.1210/edrv-12-2-181?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&>. Acesso em: 22 abr. 2015.
- 32 YU, D. S. et al. The expression of neuropeptides in hyperplastic and malignant prostate tissue and its possible clinical implications. **J Urol**, v. 166, n. 3, p. 871-5, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11490236> >. Acesso em 22 abr 2015.
- 33 MAITLAND, N. J.; COLLINS, A. T. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 17, p. 2862-70, 2008.
- 34 DI SANT'AGNESE, P. A. Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. **Cancer**, v. 70, n. S1, p. 254-268, 1992. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(19920701\)70:1+<254::AID-CNCR2820701312>3.0.CO;2-E/http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/1097-0142\(19920701\)70:1%2B<254::AID-CNCR2820701312>3.0.CO;2-E/asset/2820701312_ftp.pdf?v=1&t=i8rbu2dp&s=b6fe50733c0bf7b012b082409a0f28abbc68c114](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(19920701)70:1+<254::AID-CNCR2820701312>3.0.CO;2-E/http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/1097-0142(19920701)70:1%2B<254::AID-CNCR2820701312>3.0.CO;2-E/asset/2820701312_ftp.pdf?v=1&t=i8rbu2dp&s=b6fe50733c0bf7b012b082409a0f28abbc68c114) >. Acesso em: 22 abr. 2015.
- 35 SUN, Y.; NIU, J.; HUANG, J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. **Am J Transl Res**, v. 1, n. 2, p. 148-62, 2009.

- 36 EPSTEIN, J. I. et al. Adenocarcinoma acinar. In: **WHO Phatology and Genetics of Tumours of the Urinary Sistem and Male Genital Organs**. Lyon: IARC Press, 2004.
- 37 HUMPREY, P. A. et al. Adenocarcinoma Acinar. In: **WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs**. 4ed. Lyon: IARC, 2016.
- 38 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Incidência de Câncer no Brasil. 2014**. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp> >. Acesso em: 17 abr. 2015.
- 39 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Incidência do Câncer no Brasil Estimativa 2016**. Rio de Janeiro, Fox Print, 2016. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> >. Acesso em: 04 set. 2016.
- 40 SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA Cancer J Clin.**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21254> >. Acesso em: 02 jul. 2016.
- 41 SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21332/full>> Acesso em: 12 nov. 2016.
- 42 HIRST, A. E., JR.; BERGMAN, R. T. Carcinoma of the prostate in men 80 or more years old. **Cancer**, v. 7, n. 1, p. 136-41, 1954.
- 43 EPSTEIN, J. I.; CUBILLA, A. L.; HUMPREY, P. A. **Tumors of the Prostate Gland, Seminal Vesicles, Penis, and Scrotum**. Washington, DC: American Registry of Pathology, 2011.
- 44 NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Surveillance Epidemiology, and End Results Program Stat Facts Sheets: Prostate Cancer**. Turning Cancer Data into Discovery, 2014. Disponível em: < <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html> >. Acesso em: 18 mar. 2015.
- 45 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Atlas on Line de Mortalidade**. 2015. Disponível em: < <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo04/consultar.xhtml#panelResultado> >. Acesso em: 20 nov. 2015.
- 46 QIAN, J.; JENKINS, R. B.; BOSTWICK, D. G. Determination of gene and chromosome dosage in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 20, n. 5, p. 373-80, 1998.
- 47 SCHEBLE, V. J. et al. ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. **Mod Pathol**, v. 23, n. 8, p. 1061-7, 2010.

- 48 BUSSEMAKERS, M. J. et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. **Cancer Res**, v. 59, n. 23, p. 5975-9, 1999.
- 49 LOEB, S.; PARTIN, A. W. Review of the Literature: PCA3 for Prostate Cancer Risk Assessment and Prognostication. **Ver Urol**, v. 13, n. 4, p. e191-e195, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3253723/> >. Acesso em: 22 abr. 2015.
- 50 HEIDENREICH, A. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. **Eur Urol**, v. 59, n. 1, p. 61-71, 2011.
- 51 WALSH, P. C.; DEWEESE, T. L.; EISENBERGER, M. A. Clinical practice. Localized prostate cancer. **N Engl J Med**, v. 357, n. 26, p. 2696-705, 27 2007.
- 52 BILL-AXELSON, A. et al. Radical prostatectomy versus watchful waiting in localized prostate cancer: the Scandinavian prostate cancer group-4 randomized trial. **J Natl Cancer Inst**, v. 100, n. 16, p. 1144-54, 2008.
- 53 BILL-AXELSON, A. et al. Radical Prostatectomy or Watchful Waiting in Early Prostate Cancer. **N Engl J Med**, v. 370, n. 10, p. 932-942, 2014. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1311593> >. Acesso em: 22 nov. 2015.
- 54 HEGARTY, J. et al. Radical prostatectomy (RP) versus watchful waiting (WW) for the treatment of localized prostate cancer: a review of the evidence. **Health**, 2008.
- 55 WILT, T. J. et al. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. **N Engl J Med**, v. 367, n. 3, p. 203-13, 2012.
- 56 COMPLOJ, E.; PYCHA, A. Experience with radical perineal prostatectomy in the treatment of localized prostate cancer. **Ther Adv Urol**, Sage UK: London, England, v. 4, n. 3, p. 125-131, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361748/> >. Acesso em: 24 abr. 2016.
- 57 HARTKE, D. M.; RESNICK, M. I. **Radical perineal prostatectomy**. 9ed. Philadelphia, Pa, Saunders Elsevier, 2007.
- 58 RASSWEILER, J. et al. Laparoscopic and Robotic Assisted Radical Prostatectomy – Critical Analysis of the Results. **Eur Urol**, v. 49, n. 4, p. 612-624, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0302283805008754> >. Acesso em 22 abr 2016.
- 59 WEBSTER, T. M. et al. Robotic assisted laparoscopic radical prostatectomy versus retropubic radical prostatectomy: a prospective assessment of

- postoperative pain. **J Urol**, v. 174, n. 3, p. 912-914, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022534701684453> >. Acesso em : 21 abr. 2016.
- 60 DASGUPTA, P.; KIRBY, R. S. The current status of robot-assisted radical prostatectomy. **Asian J Androl**, v. 11, n. 1, p. 90-3, 2009.
- 61 UTOMO, N. B.; MOCHTAR, C. A.; UMBAS, R. Primary hormonal treatment in localized and locally advanced prostate cancer: effectiveness and survival predictive factors. **Acta Med Indones**, v. 44, n. 1, p. 10-5, 2012.
- 62 BONILLO GARCIA, M. A.; GIMENO ARGENTE, V.; JIMENEZ CRUZ, J. F. [Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) for the treatment of localised prostate cancer]. **Actas Urol Esp**, v. 31, n. 6, p. 627-32, 2007.
- 63 DJAVAN, B. et al. Transperineal radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) of the prostate. **Tech Urol**, v. 4, n. 2, p. 103-9, 1998.
- 64 SHARIAT, S. F. et al. Pilot study of radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) for the treatment of radio-recurrent prostate cancer. **Prostate**, v. 65, n. 3, p. 260-7, 2005.
- 65 SHELLEY, M. et al. Cryotherapy for localised prostate cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. Cd005010, 2007.
- 66 UCHIDA, T. et al. Treatment of localized prostate cancer using high-intensity focused ultrasound. **BJU Int**, v. 97, n. 1, p. 56-61, 2006.
- 67 NAZIM, S. M.; ABBAS, F. Role of Surgery in locally advanced prostate cancer. **Pak J M Sci**, Pakistan, v. 31, n. 3, p. 710-716, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4485300/> >. Acesso em : 21 abr 2016.
- 68 VAN POPPEL, H. Locally advanced and high risk prostate cancer: The best indication for initial radical prostatectomy? **Asian Journal of Urology**, v. 1, n. 1, p. 40-45, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214388215000259> >. Acesso em: 22 abr. 2016.
- 69 BOLLA, M. et al. Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial. **Lancet**, v. 360, n. 9327, p. 103-108, 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673602094084> >. Acesso em: 21 abr. 2016.
- 70 WIDMARK, A. et al. Endocrine treatment, with or without radiotherapy, in locally advanced prostate cancer (SPCG-7/SFUO-3): an open randomised phase III trial. **Lancet**, v. 373, n. 9660, p. 301-308, 2009. Disponível em: <

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673608618152> >. Acesso em: 21 abr. 2016.
- 71 BOLLA , M. et al. Improved Survival in Patients with Locally Advanced Prostate Cancer Treated with Radiotherapy and Goserelin. **N Engl J M**, v. 337, n. 5, p. 295-300, 1997. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199707313370502> >. Acesso em: 21 abr 2016.
- 72 HEIDENREICH, A. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. **Eur Urol**, v. 65, n. 2, p. 467-79, 2014.
- 73 DENMEADE, S. R.; ISAACS, J. T. A history of prostate cancer treatment. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 389-396, 2002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc801> >. Acesso em: 20 jan. 2016.
- 74 FARMAN, F. Androgen therapy in prostatic disease. **J Am Med Assoc**, v. 134, n. 4, p. 348-351, 1947. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1947.02880210026006/http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=293773> >. Acesso em: 21 abr. 2016.
- 75 HUGGINS, C. Endocrine-induced regression of cancers. **Cancer Res**, v. 27, n. 11, p. 1925-30, 1967.
- 76 DENMEADE, S. R.; LIN, X. S.; ISAACS, J. T. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. **Prostate**, v. 28, n. 4, p. 251-65, 1996. Disponível em: < [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(199604\)28:4<251::AID-PROS6>3.0.CO;2-G/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0045(199604)28:4<251::AID-PROS6>3.0.CO;2-G/abstract) >. Acesso em: 21 abr. 2015.
- 77 PRUNERI, G. et al. Chromogranin A and B and secretogranin II in prostatic adenocarcinomas: neuroendocrine expression in patients untreated and treated with androgen deprivation therapy. **Prostate**, v. 34, n. 2, p. 113-20, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9465942> >. Acesso em: 21 abr 2015.
- 78 SEIDENFELD, J. et al. Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **Ann Intern Med**, v. 132, n. 7, p. 566-77, 2000.
- 79 GEORGE, D. J. Metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer Management. **The Gold Journal of Urology**, 2013. Disponível em: < http://www.webedcafe.com/extern/program_media/goldjournal.net/2013/prostate_cancer/figure.php?speaker=george&figure=3 >. Acesso em: 19 mar. 2015.
- 80 FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 1, p. 34-45, 2001. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35094009> >. Acesso em: 20 jun. 2015.

- 81 CHER, M. L. et al. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. **Cancer Res**, v. 56, n. 13, p. 3091-102, 1996. Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/56/13/3091.full.pdf> >. Acesso em: 21 abr 2015.
- 82 MARCELLI, M. et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. **Cancer Res**, v. 60, n. 4, p. 944-9, 2000. Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/4/944.full.pdf> >. Acesso em: 20 abr. 2015.
- 83 KOIVISTO, P. et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. **Cancer Res**, v. 57, n. 2, p. 314-9, 1997. Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/57/2/314.full.pdf> >. Acesso em: 20 abr. 2015.
- 84 CHANG, S. S. Treatment Options for Hormone-Refractory Prostate Cancer. **Rev Urol**, v. 9, n. Suppl 2, p. S13-S18, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1887817/> >. Acesso em: 20 abr. 2015.
- 85 KISH, J. A.; BUKKAPATNAM, R.; PALAZZO, F. The treatment challenge of hormone-refractory prostate cancer. **Cancer Control**, v. 8, n. 6, p. 487-95, 2001.
- 86 PICUS, J.; SCHULTZ, M. Docetaxel (Taxotere) as monotherapy in the treatment of hormone-refractory prostate cancer: preliminary results. **Semin oncol**, v. 26, n. 5 Suppl 17, p. 14-18, 1999. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/10604263> >. Acesso em: 20 abr. 2015.
- 87 KNOX, J. J.; MOORE, M. J. Treatment of hormone refractory prostate cancer. **Seminars in urologic oncology**, v. 19, n. 3, p. 202-211, 2001. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/11561988> >. Acesso em: 21 abr. 2016.
- 88 FOURNIER, G. Treatment of hormone-refractory prostate carcinoma. **Eur Urol**, v. 30 Suppl 1, p. 32-37, 1996. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/8977988> >. Acesso em: 20 abr. 2016.
- 89 TANNOCK, I. F. et al. Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. **N Engl J Med**, v. 351, n. 15, p. 1502-1512, 2004. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa040720> >. Acesso em: 20 abr. 2016.
- 90 BERTHOLD, D. R. et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 2, p. 242-5, 2008.

- 91 GARMEY, E. G. et al. Second-line chemotherapy for advanced hormone-refractory prostate cancer. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 6, n. 2, p. 118-22, 127-32, 2008.
- 92 CRAIN, D. S.; AMLING, C. L.; KANE, C. J. Palliative Transurethral Prostate Resection for Bladder Outlet Obstruction in Patients With Locally Advanced Prostate Cancer. **J Urol**, v. 171, n. 2, Part 1, p. 668-671, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022534705625530> >. Acesso em: 20 abr. 2016.
- 93 SCHWEIZER, M. T.; DRAKE, C. G. Immunotherapy for prostate cancer: recent developments and future challenges. **Cancer Metastasis Rev**, v. 33, n. 2-3, p. 641-55, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24477411> >. Acesso em: 04 jun. 2015.
- 94 BOTREL, T. E. et al. Immunotherapy with Sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic castration-refractory prostate cancer (mCRPC): a systematic review and meta-analysis. **Int Braz J Urol**, v. 38, n. 6, p. 717-27, 2012.
- 95 SMALL, E. J. et al. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 19, p. 3089-94, 2006.
- 96 HUBER, F. et al. Comprehensive validation of published immunohistochemical prognostic biomarkers of prostate cancer -what has gone wrong? A blueprint for the way forward in biomarker studies. **Br J Cancer**, v. 112, n. 1, p. 140-8, 2015.
- 97 MOONS, K. G. M. et al. Prognosis and prognostic research: what, why, and how? **BMJ**, v. 338, 2009. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/338/bmj.b375>> Acesso em: 20 set 2015.
- 98 GRIGNON, D. J.; HAMMOND, E. H. College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. Report of the Prostate Cancer Working Group. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 119, n. 12, p. 1122-6, 1995.
- 99 BOSTWICK, D. G. et al. Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 124, n. 7, p. 995-1000, 2000.
- 100 JUNIOR, N. G. D.; LINHARES, M.; CRIPPA, A. **Interpretação clínica do PSA in: Câncer de Próstata**. 1.ed. São Paulo: Livraria Santos, 2013.
- 101 LILJA, H. et al. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. **J Clin Invest**, v. 80, n. 2, p. 281-285, 1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC442235/> >. Acesso em : 21 abr. 2015.

- 102 PAPSIDERO, L. D. et al. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. **Cancer Res**, v. 40, n. 7, p. 2428-32, 1980.
- 103 PORTER, M. P.; STANFORD, J. L.; LANGE, P. H. The Distribution of Serum Prostate-Specific Antigen Levels Among American Men: Implications for Prostate Cancer Prevalence and Screening. **Prostate**, v. 66, n. 10, p. 1044-1051, 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pros.20417> >. Acesso em: 21 abr. 2015.
- 104 ANTENOR, J. A. et al. Relationship between initial prostate specific antigen level and subsequent prostate cancer detection in a longitudinal screening study. **J Urol**, v. 172, n. 1, p. 90-3, 2004.
- 105 HERNANDEZ, J.; THOMPSON, I. M. Prostate-specific antigen: a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. **Cancer**, v. 101, n. 5, p. 894-904, 2004.
- 106 LILJA, H.; ULMERT, D.; VICKERS, A. J. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 4, p. 268-78, 2008.
- 107 LOEB, S.; CATALONA, W. J. Prostate-specific antigen in clinical practice. **Cancer Lett**, v. 249, n. 1, p. 30-9, 2007.
- 108 BRATT, O.; LILJA, H. Serum markers in prostate cancer detection. **Curr Opin Urol**, v. 25, n. 1, p. 59-64, 2015.
- 109 FREEDLAND, S. J. et al. The prostatic specific antigen era is alive and well: prostatic specific antigen and biochemical progression following radical prostatectomy. **J Urol**, v. 174, n. 4 Pt 1, p. 1276-81; discussion 1281; author reply 1281, 2005.
- 110 GROSSFELD, G. D. et al. Predicting recurrence after radical prostatectomy for patients with high risk prostate cancer. **J Urol**, v. 169, n. 1, p. 157-63, 2003.
- 111 GLEASON, D. F. Classification of prostatic carcinomas. **Cancer Chemother Rep**, v. 50, n. 3, p. 125-8, 1966.
- 112 EPSTEIN, J. I. et al. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 29, n. 9, p. 1228-42, 2005.
- 113 ICZKOWSKI, K. A. et al. Digital quantification of five high-grade prostate cancer patterns, including the cribriform pattern, and their association with adverse outcome. **Am J Clin Pathol**, v. 136, n. 1, p. 98-107, 2011.
- 114 LOTAN, T. L.; EPSTEIN, J. I. Gleason grading of prostatic adenocarcinoma with glomeruloid features on needle biopsy. **Hum Pathol**, v. 40, n. 4, p. 471-7, 2009.

- 115 CASELLA, R. et al. Focal neuroendocrine differentiation lacks prognostic significance in prostate core needle biopsies. **J Urol**, v. 160, n. 2, p. 406-10, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679888> >. Acesso em: 14 jan. 2015.
- 116 KRIJNEN, J. L. et al. The prognostic value of neuroendocrine differentiation in adenocarcinoma of the prostate in relation to progression of disease after endocrine therapy. **J Urol**, v. 158, n. 1, p. 171-4, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9186347> >. Acesso em: 15 mar. 2015.
- 117 The TNM classification of prostate cancer: a discussion of the 1992 classification: the british association of urological surgeons TMN subcommittee. **BJU Int**, v. 76, n. 3, p. 279-285, 1995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410X.1995.tb07701.x> >. Acesso em: 15 jun. 2015.
- 118 **AJCC Cancer Staging Manual**. 7ed. New York, 2010. ISBN 978-0-387-88440-0.
- 119 MIKEL HUBANKS, J. et al. The presence of extracapsular extension is associated with an increased risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy for patients with seminal vesicle invasion and negative lymph nodes. **Urol Oncol**, v. 32, n. 1, p. 26.e1-7, 2014.
- 120 TAN, P. H. et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 5: surgical margins. **Mod Pathol**, v. 24, n. 1, p. 48-57, 2011.
- 121 STEPHENSON, A. J. et al. Do margins matter? The influence of positive surgical margins on prostate cancer-specific mortality. **Eur Urol**, v. 65, n. 4, p. 675-80, 2014.
- 122 CHALFIN, H. J. et al. Impact of surgical margin status on prostate-cancer-specific mortality. **BJU Int**, v. 110, n. 11, p. 1684-9, 2012.
- 123 YOUNG, A. et al. Correlation of Urine TMPRSS2:ERG and PCA3 to ERG+ and Total Prostate Cancer Burden. **Am J Clin Pathol**, v. 138, n. 5, p. 685-696, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3597433/> >. Acesso em: 21 abr 2015.
- 124 SPENCER, E. S. et al. Prognostic value of ERG oncoprotein in prostate cancer recurrence and cause-specific mortality. **Prostate**, v. 73, n. 9, p. 905-12, 2013.
- 125 KELLY, G. M. et al. ERG oncoprotein expression in prostate carcinoma patients of different ethnicities. **Mol Clin Oncol**, v. 3, n. 1, p. 23-30, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4251096/> >. Acesso em : 14 jan. 2016.

- 126 SOWALSKY, A. G. et al. Clonal progression of prostate cancers from Gleason grade 3 to grade 4. **Cancer Res**, v. 73, n. 3, p. 1050-1055, 2013.
- 127 CRAWFORD, E. D. et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases. **J Urol**, v. 188, n. 5, p. 1726-31, 2012.
- 128 WHITMAN, E. J. et al. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. **J Urol**, v. 180, n. 5, p. 1975-8; discussion 1978-9, 2008.
- 129 AUPRICH, M. et al. Critical assessment of preoperative urinary prostate cancer antigen 3 on the accuracy of prostate cancer staging. **Eur Urol**, v. 59, n. 1, p. 96-105, 2011.
- 130 HESSELS, D. et al. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. **Prostate**, v. 70, n. 1, p. 10-6, 2010.
- 131 VLAEMINCK-GUILLEM, V. et al. Urinary PCA3 score predicts prostate cancer multifocality. **J Urol**, v. 185, n. 4, p. 1234-9, 2011.
- 132 PLOUSSARD, G. et al. Prostate cancer antigen 3 score accurately predicts tumour volume and might help in selecting prostate cancer patients for active surveillance. **Eur Urol**, v. 59, n. 3, p. 422-9, 2011.
- 133 TOSOIAN, J. J. et al. Accuracy of PCA3 measurement in predicting short-term biopsy progression in an active surveillance program. **J Urol**, v. 183, n. 2, p. 534-8, 2010.
- 134 WEI, W. et al. High PCA3 scores in urine correlate with poor-prognosis factors in prostate cancer patients. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 9, p. 16606-12, 2015.
- 135 MEROLA, R. et al. PCA3 in prostate cancer and tumor aggressiveness detection on 407 high-risk patients: a National Cancer Institute experience. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 34, n. 1, p. 1, 2015. Disponível em: <<http://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-015-0127-8>> Acesso em: 20 abr. 2016.
- 136 HOCKENBERY, D. M. et al. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 16, p. 6961-5, 1991.
- 137 CONCATO, J. et al. Molecular markers and death from prostate cancer. **Ann Intern Med**, v. 150, n. 9, p. 595-603, 2009.
- 138 KHOR, L. Y. et al. Bcl-2 and Bax expression predict prostate cancer outcome in men treated with androgen deprivation and radiotherapy on radiation therapy oncology group protocol 92-02. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 12, p. 3585-90, 2007.

- 139 PETRESCU, A. et al. Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate carcinoma. **Rom J Morphol Embryol**, v. 47, n. 2, p. 143-6, 2006.
- 140 MOUL, J. W. et al. Protein expression of p53, bcl-2, and KI-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. **Surgery**, v. 120, n. 2, p. 159-66; discussion 166-7, 1996.
- 141 MARKERT, E. K. et al. Molecular classification of prostate cancer using curated expression signatures. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 52, p. 21276-81, 2011.
- 142 BYRNE, R. L. et al. The expression of waf-1, p53 and bcl-2 in prostatic adenocarcinoma. **Br J Urol**, v. 79, n. 2, p. 190-5, 1997.
- 143 KUDAHETTI, S. C. et al. Immunohistochemistry for p16, but not Rb or p21, is an independent predictor of prognosis in conservatively treated, clinically localised prostate cancer. **Pathology**, v. 42, n. 6, p. 519-523, 2010.
- 144 TSIHLIAS, J. et al. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. **Cancer Res**, v. 58, n. 3, p. 542-548, 1998.
- 145 ANANTHANARAYANAN, V. et al. Subcellular localization of p27 and prostate cancer recurrence: automated digital microscopy analysis of tissue microarrays. **Hum Pathol**, v. 42, n. 6, p. 873-881, 2011.
- 146 LI, K. et al. Role of co-expression of c-Myc, EZH2 and p27 in prognosis of prostate cancer patients after surgery. **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n. 1, p. 82-87, 2013.
- 147 EPSTEIN, J. I. et al. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the prostate: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. **Am J Surg Pathol**, v. 38, n. 8, p. e6-e19, 2014.
- 148 AMLING, C. L. Biochemical Recurrence after Localized Treatment. **Urol Clin N Am**, v. 33, n. 2, p. 147-159, 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ucl.2005.12.002> >. Acesso em: 23 abr. 2015.
- 149 UCHIO, E. M. et al. Impact of biochemical recurrence in prostate cancer among us veterans. **Arch Intern Med**, v. 170, n. 15, p. 1390-1395, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/archinternmed.2010.262> >. Acesso em: 20 jan. 2016.
- 150 COOKSON, M. S. et al. Variation in the definition of biochemical recurrence in patients treated for localized prostate cancer: the American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel

- report and recommendations for a standard in the reporting of surgical outcomes. **J Urol.**, v. 177, n. 2, p. 540-5, 2007.
- 151 AZZOPARDI, J. G.; EVANS, D. J. Argentaffin cells in prostatic carcinoma: Differentiation from lipofuscin and melanin in prostatic epithelium. **J Pathol**, v. 104, n. 4, p. 247-251, 1971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/path.1711040406> >. Acesso em: 20 set. 2015.
- 152 BONKHOFF, H.; STEIN, U.; REMBERGER, K. Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. **Virchows Arch A**, v. 423, n. 4, p. 291-4, 1993.
- 153 NELSON, E. C. et al. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v. 10, n. 1, p. 6-14, 2007.
- 154 WEAVER, M. G.; ABDUL-KARIM, F. W.; SRIGLEY, J. R. Paneth cell-like change and small cell carcinoma of the prostate. Two divergent forms of prostatic neuroendocrine differentiation. **Am J Surg Pathol**, v. 16, n. 10, p. 1013-6, 1992.
- 155 BONKHOFF, H.; STEIN, U.; REMBERGER, K. Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. **Hum Pathol**, v. 26, n. 2, p. 167-170, 1995. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0046817795900330> >. Acesso em: 21 abr. 2015.
- 156 HELPAP, B.; KOLLERMANN, J. Undifferentiated carcinoma of the prostate with small cell features: immunohistochemical subtyping and reflections on histogenesis. **Virchows Arch A**, v. 434, n. 5, p. 385-91, 1999.
- 157 BELTRAN, H. et al. Molecular Characterization of Neuroendocrine Prostate Cancer and Identification of New Drug Targets. **Cancer Discov**, v. 1, n. 6, p. 487-495, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3290518/http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/1/6/487.full.pdf> >. Acesso em: 21 abr. 2015.
- 158 SCHRON, D. S.; GIPSON, T.; MENDELSON, G. The histogenesis of small cell carcinoma of the prostate. An immunohistochemical study. **Cancer**, v. 53, n. 11, p. 2478-80, 1984.
- 159 STEIN, M. E. et al. Small cell (neuroendocrine) carcinoma of the prostate: etiology, diagnosis, prognosis, and therapeutic implications--a retrospective study of 30 patients from the rare cancer network. **Am J Med Sci**, v. 336, n. 6, p. 478-88, 2008.
- 160 ZOLLER, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 4, p. 254-67, 2011..
- 161 MOSQUERA, J. M. et al. Concurrent AURKA and MYCN gene amplifications are harbingers of lethal treatment-related neuroendocrine prostate cancer.

- Neoplasia**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23358695/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3556934/pdf/neo1501_0001.pdf >. Acesso em: 14 mar. 2015.
- 162 XIE, S. et al. Regulation of interleukin-6-mediated PI3K activation and neuroendocrine differentiation by androgen signaling in prostate cancer LNCaP cells. **Prostate**, v. 60, n. 1, p. 61-7, 2004. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.20048/abstract> >. Acesso em: 01 mai. 2015.
- 163 LEE, C. M.; REDDY, E. P. The v-myc oncogene. **Oncogene**, v. 18, n. 19, p. 2997-3003, 1999.
- 164 VENNSTROM, B. et al. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. **J Virol**, v. 42, n. 3, p. 773-779, 1982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC256910/> >. Acesso em: 14 dez 2015.
- 165 VARMUS, H. E. The molecular genetics of cellular oncogenes. **Annu Rev Genet**, v. 18, p. 553-612, 1984.
- 166 ARMELIN, H. A. et al. Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. **Nature**, v. 310, n. 5979, p. 655-60, Aug 23-29 1984.
- 167 KELLY, K. et al. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. **Cell**, v. 35, n. 3 Pt 2, p. 603-10, 1983.
- 168 MORROW, M. A. et al. Interleukin-7 induces N-myc and c-myc expression in normal precursor B lymphocytes. **Genes Dev**, v. 6, n. 1, p. 61-70, 1992.
- 169 SATO, N. et al. Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling. **EMBO J**, v. 12, n. 11, p. 4181-9, 1993.
- 170 SHIBUYA, H. et al. IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: Demonstration of a novel role for c-myc. **Cell**, v. 70, n. 1, p. 57-67, 1992. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749290533I> >. Acesso em: 20 fev. 2015.
- 171 PIETENPOL, J. A. et al. Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 10, p. 3758-62, 1990.
- 172 RAMANA, C. V. et al. Regulation of c-myc expression by IFN- γ through Stat1-dependent and -independent pathways. **EMBO J**, Oxford, UK, v. 19, n. 2, p. 263-272, 2000. Disponível em: <

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC305560/> >. Acesso em: 14 fev. 2015.
- 173 SORRENTINO, V. et al. Potentiation of growth factor activity by exogenous c-myc expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 21, p. 8167-8171, 1986. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386888/> >. Acesso em: 14 fev. 2016.
- 174 IRITANI, B. M.; EISENMAN, R. N. c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13180-5, 1999.
- 175 KARN, J. et al. Regulation of cell cycle duration by c-myc levels. **Oncogene**, v. 4, n. 6, p. 773-87, 1989.
- 176 GRANDORI, C. et al. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 16, p. 653-99, 2000. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.cellbio.16.1.653> >. Acesso em: 16 set. 2015.
- 177 KNOEPFLER, P. S. Myc goes global: new tricks for an old oncogene. **Cancer Res**, v. 67, n. 11, p. 5061-3, 2007.
- 178 COLE, M. D. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. **Annu Rev Genet**, v. 20, p. 361-84, 1986.
- 179 NESBIT, C. E. et al. Differential apoptotic behaviors of c-myc, N-myc, and L-myc oncoproteins. **Cell Growth Differ**, v. 9, n. 9, p. 731-41, 1998. Disponível em: < <http://cgd.aacrjournals.org/cgi/reprint/9/9/731.pdf> >. Acesso em: 14 set. 2015.
- 180 NESBIT, C. E.; TERSAK, J. M.; PROCHOWNIK, E. V. MYC oncogenes and human neoplastic disease. **Oncogene**, v. 18, n. 19, p. 3004-16, 1999.
- 181 TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, 2006. Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0092867406009767/1-s2.0-S0092867406009767-main.pdf?_tid=b2c4ed90-0230-11e5-a908-00000aab0f27&acdnat=1432484568_d134a9ef4cd64069c1fa11086936914b >. Acesso em: 14 set. 2015.
- 182 TAUB, R. et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 24, p. 7837-41, 1982.
- 183 SCHWAB, M. et al. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. **Nature**, v. 308, n. 5956, p. 288-91, 1984.

- 184 NAU, M. M. et al. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. **Nature**, v. 318, n. 6041, p. 69-73, 1985.
- 185 BELTRAN, H. The N-myc Oncogene: Maximizing its Targets, Regulation, and Therapeutic Potential. **Mol Cancer Res**, v. 12, n. 6, p. 815-22, 2014.
- 186 SCHWAB, M. MYCN in neuronal tumours. **Cancer Lett**, v. 204, n. 2, p. 179-87, 2004. Disponível em: < [http://www.cancerletters.info/article/S0304-3835\(03\)00454-3/abstract](http://www.cancerletters.info/article/S0304-3835(03)00454-3/abstract) >. Acesso em: 20 set. 2015.
- 187 STRIEDER, V.; LUTZ, W. Regulation of N-myc expression in development and disease. **Cancer Lett**, v. 180, n. 2, p. 107-19, 2002.
- 188 SCHWAB, M. et al. Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 15, p. 4940-4, 1984.
- 189 CHAN, H. S. et al. MYCN protein expression as a predictor of neuroblastoma prognosis. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 10, p. 1699-706, 1997. Disponível em: < <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/3/10/1699.full.pdf> >. Acesso em: 20 de abr. 2015.
- 190 ZHOU, H. et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. **Nat Genet**, v. 20, n. 2, p. 189-93, 1998.
- 191 NIKONOVA, A. S. et al. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 4, p. 661-87, 2013.
- 192 YANG, S. et al. Suppression of Aurora-A oncogenic potential by c-Myc downregulation. **Exp Mol Med**, v. 42, n. 11, p. 759-67, 2010.
- 193 OTTO, T. et al. Stabilization of N-Myc Is a Critical Function of Aurora A in Human Neuroblastoma. **Cancer Cell**, v. 15, n. 1, p. 67-78, 2009. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.005/http://ac.els-cdn.com/S153561080800408X/1-s2.0-S153561080800408X-main.pdf?_tid=1f259bf8-017b-11e5-a27e-00000aab0f01&acdnat=1432406582_dd5fb2dcfa42f9a031d97e7bdb3004b6 >. Acesso em: 23 mai. 2015.
- 194 DEN HOLLANDER, J. et al. Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. **Blood**, v. 116, n. 9, p. 1498-505, 2010.
- 195 YANG, H. et al. Aurora-A kinase regulates telomerase activity through c-Myc in human ovarian and breast epithelial cells. **Cancer Res**, v. 64, n. 2, p. 463-7, Jan 15 2004.

- 196 LESLEY, J.; HYMAN, R.; KINCADE, P. W. CD44 and its interaction with extracellular matrix. **Adv Immunol**, v. 54, p. 271-335, 1993.
- 197 BOURRGUIGNON, L. Y. et al. Involvement of CD44 and its variant isoforms in membrane-cytoskeleton interaction, cell adhesion and tumor metastasis. **J Neurooncol**, v. 26, n. 3, p. 201-8, 1995.
- 198 PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 1, p. 33-45, 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1004> >. Acesso em: 17 mai. 2015.
- 199 ZHU, D.; BOURGUIGNON, L. Y. The ankyrin-binding domain of CD44s is involved in regulating hyaluronic acid-mediated functions and prostate tumor cell transformation. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 39, n. 3, p. 209-22, 1998.
- 200 GALLATIN, W. M.; WEISSMAN, I. L.; BUTCHER, E. C. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. **Nature**, v. 304, n. 5921, p. 30-4, 1983.
- 201 PATRAWALA, L. et al. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. **Oncogene**, v. 25, n. 12, p. 1696-708, 2006.
- 202 MIYAKE, H. et al. Interaction between CD44 and hyaluronic acid regulates human prostate cancer development. **J Urol**, v. 160, n. 4, p. 1562-6, 1998.
- 203 SIMON, R. A. et al. CD44 expression is a feature of prostatic small cell carcinoma and distinguishes it from its mimickers. **Hum Pathol**, v. 40, n. 2, p. 252-8, 2009.
- 204 WANG, C. C. et al. Overlap of CD44 expression between prostatic small cell carcinoma and acinar adenocarcinoma. **Hum Pathol**, v. 46, n. 4, p. 554-7, 2015.
- 205 ICZKOWSKI, K. A.; OMARA-OPYENE, A. L.; SHAH, G. V. The predominant CD44 splice variant in prostate cancer binds fibronectin, and calcitonin stimulates its expression. **Anticancer Res**, v. 26, n. 4b, p. 2863-72, 2006.
- 206 SCREATON, G. R. et al. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 24, p. 12160-4, 1992.
- 207 NAOR, D. et al. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 4, p. 260-7, 2008.
- 208 ARUFFO, A. et al. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1303-13, Jun 29 1990.

- 209 IDZERDA, R. L. et al. Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 12, p. 4659-63, 1989.
- 210 RUIZ, P.; SCHWARZLER, C.; GUNTHER, U. CD44 isoforms during differentiation and development. **Bioessays**, v. 17, n. 1, p. 17-24, 1995.
- 211 HAM, W. S. et al. Pathological effects of prostate cancer correlate with neuroendocrine differentiation and PTEN expression after bicalutamide monotherapy. **J Urol**, v. 182, n. 4, p. 1378-84, 2009.
- 212 BERNEY, D. M. et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 4: seminal vesicles and lymph nodes. **Mod Pathol.**, v. 24, n. 1, p. 39-47, 2011.
- 213 MAGI-GALLUZZI, C. et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 3: extraprostatic extension, lymphovascular invasion and locally advanced disease. **Mod Pathol.**, v. 24, n. 1, p. 26-38, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2010.158> >. Acesso em: 20 set 2015.
- 214 OZKANLI, S. S. et al. Gleason score at the margin can predict biochemical recurrence after radical prostatectomy, in addition to preoperative PSA and surgical margin status. **Turk J Med Sci.**, v. 44, n. 3, p. 397-403, 2014.
- 215 PALAPATTU, G. S. et al. Selective expression of CD44, a putative prostate cancer stem cell marker, in neuroendocrine tumor cells of human prostate cancer. **Prostate**, v. 69, n. 7, p. 787-98, 2009.
- 216 AHLEGREN, G. et al. Neuroendocrine differentiation is not prognostic of failure after radical prostatectomy but correlates with tumor volume. **Urology**, v. 56, n. 6, p. 1011-5, 2000.
- 217 MAY, M. et al. Prognostic significance of proliferation activity and neuroendocrine differentiation to predict treatment failure after radical prostatectomy. **Scand J Urol Nephrol**, v. 41, n. 5, p. 375-81, 2007.
- 218 MARCU, M.; RADU, E.; SAJIN, M. Neuroendocrine differentiation in prostate adenocarcinoma biopsies and its correlation to histological grading. **Curr Health Sci J**, v. 36, n. 1, p. 37-42, 2010.
- 219 FROMONT, G. et al. 8q24 amplification is associated with Myc expression and prostate cancer progression and is an independent predictor of recurrence after radical prostatectomy. **Hum Pathol**, v. 44, n. 8, p. 1617-23, 2013.
- 220 TEI, H. et al. Expression profile of CD44s, CD44v6, and CD44v10 in localized prostate cancer: effect on prognostic outcomes following radical prostatectomy. **Urol Oncol**, v. 32, n. 5, p. 694-700, 2014.

- 221 DANNEMAN, D. et al. Prognostic significance of histopathological features of extraprostatic extension of prostate cancer. **Histopathology**, v. 63, n. 4, p. 580-9, 2013.
- 222 KAPOOR, J. et al. Extraprostatic extension into periprostatic fat is a more important determinant of prostate cancer recurrence than an invasive phenotype. **J Urol**, v. 190, n. 6, p. 2061-6, 2013.
- 223 JEONG, B. C. et al. The relationship between the extent of extraprostatic extension and survival following radical prostatectomy. **Eur Urol**, v. 67, n. 2, p. 342-6, 2015.
- 224 SHAHABI, A. et al. Predictors of time to biochemical recurrence in a radical prostatectomy cohort within the PSA-era. **Can Urol Assoc J.**, v. 10, n. 1-2, p. E17-E22, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4729570/> >. Acesso em: 13 out 2016.
- 225 HAN, M. et al. Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. **Urol Clin North Am**, v. 28, n. 3, p. 555-65, 2001.
- 226 EGGENER, S. E. et al. Predicting 15-year prostate cancer specific mortality after radical prostatectomy. **J Urol**, v. 185, n. 3, p. 869-75, 2011.
- 227 BASTIDE, C. et al. Seminal vesicle invasion: what is the best adjuvant treatment after radical prostatectomy? **BJU Int**, v. 109, n. 4, p. 525-30; discussion 531-2, 2012.
- 228 SAGNAK, L. et al. Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in prostate adenocarcinoma. **Clin Genitourin Cancer**, v. 9, n. 2, p. 73-80, 2011.
- 229 WANG, H. T. et al. Neuroendocrine Prostate Cancer (NEPC) progressing from conventional prostatic adenocarcinoma: factors associated with time to development of NEPC and survival from NEPC diagnosis-a systematic review and pooled analysis. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 30, p. 3383-90, Oct 20 2014. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://jco.ascopubs.org/content/32/30/3383.long> >. Acesso em: 20 abr. 2015.
- 230 ABRAHAMSSON, P. A.; COCKETT, A. T.; DI SANT'AGNESE, P. A. Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma. **Prostate Suppl**, v. 8, p. 37-42, 1998.
- 231 REVELOS, K. et al. Correlation of androgen receptor status, neuroendocrine differentiation and angiogenesis with time-to-biochemical failure after radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer. **Anticancer Res**, v. 27, n. 5b, p. 3651-60, 2007.

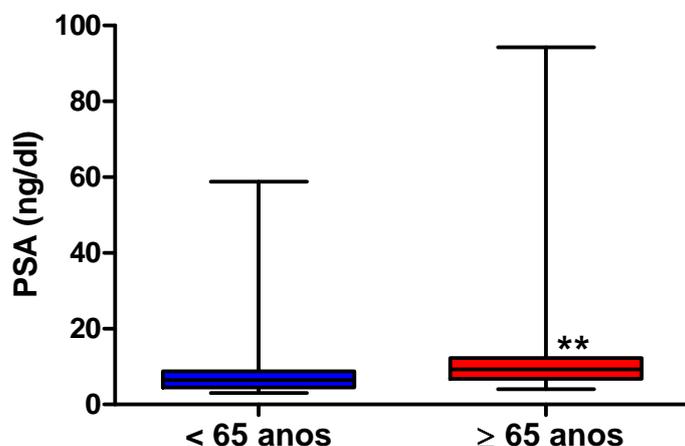
- 232 HEINRICH, E. et al. Neuroendocrine tumor cells in prostate cancer: evaluation of the neurosecretory products serotonin, bombesin, and gastrin - impact on angiogenesis and clinical follow-up. **Prostate**, v. 71, n. 16, p. 1752-8, 2011.
- 233 POUND, C. R. et al. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. **JAMA**, v. 281, n. 17, p. 1591-7, 1999.
- 234 CAIRE, A. A. et al. Delayed prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy: how to identify and what are their clinical outcomes? **Urology**, v. 74, n. 3, p. 643-7, 2009.
- 235 QUEK, M. L. et al. Prognostic significance of neuroendocrine expression in lymph node-positive prostate cancer. **Urology**, v. 67, n. 6, p. 1247-52, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697447> >. Acesso em: 21 abr, 2015.
- 236 THEODORESCU, D. et al. Cathepsin D and chromogranin A as predictors of long term disease specific survival after radical prostatectomy for localized carcinoma of the prostate. **Cancer**, v. 80, n. 11, p. 2109-19, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9392333> >. Acesso em: 21 abr 2015.
- 237 JENKINS, R. B. et al. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Res**, v. 57, n. 3, p. 524-31, 1997.
- 238 SATO, K. et al. Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, n. 18, p. 1574-80, 1999.
- 239 BUBENDORF, L. et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. **Cancer Res**, v. 59, n. 4, p. 803-6, 1999.
- 240 RIBEIRO, F. R. et al. Relative copy number gain of MYC in diagnostic needle biopsies is an independent prognostic factor for prostate cancer patients. **Eur Urol**, v. 52, n. 1, p. 116-25, 2007.
- 241 GUREL, B. et al. Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. **Mod Pathol**, v. 21, n. 9, p. 1156-67, Sep 2008. Disponível em: < <http://www.nature.com/modpathol/journal/v21/n9/pdf/modpathol2008111a.pdf> >. Acesso em: 14 set. 2015.
- 242 HAWKSWORTH, D. et al. Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v. 13, n. 4, p. 311-5, 2010.

- 243 VIS, A. N. et al. Quantitative analysis of the decay of immunoreactivity in stored prostate needle biopsy sections. **Am J Clin Pathol**, v. 113, n. 3, p. 369-73, 2000.
- 244 BUSCHHORN, H. M. et al. Aurora-A over-expression in high-grade PIN lesions and prostate cancer. **Prostate**, v. 64, n. 4, p. 341-6, 2005.
- 245 DE MARZO, A. M. et al. CD44 and CD44v6 downregulation in clinical prostatic carcinoma: relation to Gleason grade and cytoarchitecture. **Prostate**, v. 34, n. 3, p. 162-8, 1998.
- 246 NOORDZIJ, M. A. et al. The prognostic value of CD44 isoforms in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 5, p. 805-15, 1997.
- 247 KALLAKURY, B. V. et al. Decreased levels of CD44 protein and mRNA in prostate carcinoma. Correlation with tumor grade and ploidy. **Cancer**, v. 78, n. 7, p. 1461-9, 1996.
- 248 KALLAKURY, B. V. et al. Correlation of p34cdc2 cyclin-dependent kinase overexpression, CD44s downregulation, and HER-2/neu oncogene amplification with recurrence in prostatic adenocarcinomas. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 4, p. 1302-9, 1998.
- 249 COLLINS, A. T. et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 23, p. 10946-51, 2005.
- 250 CASTELLON, E. A. et al. Molecular signature of cancer stem cells isolated from prostate carcinoma and expression of stem markers in different Gleason grades and metastasis. **Biol Res**, v. 45, n. 3, p. 297-305, 2012.
- 251 GARRAWAY, I. P. Will identification of a prostate cancer stem cell lead to its cure? **Urol Oncol**, v. 30, n. 4, p. 351-2, 2012.
- 252 LOBO, N. A. et al. The biology of cancer stem cells. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 675-99, 2007.
- 253 NAGABHUSHAN, M. et al. Altered expression of CD44 in human prostate cancer during progression. **Am J Clin Pathol**, v. 106, n. 5, p. 647-51, 1996.
- 254 KORSKI, K.; MALICKA-DURCZAK, A.; BREBOROWICZ, J. Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy specimens. **Pol J Pathol**, v. 65, n. 4, p. 291-5, 2014.
- 255 GUNIA, S. et al. Expression of CD44s in incidental prostate cancer is more strongly associated with Gleason scores on subsequent radical prostatectomies than conventional prognostic parameters. **Pathobiology**, v. 76, n. 6, p. 286-92, 2009.

- 256 KALLAKURY, B. V.; SHEEHAN, C. E.; ROSS, J. S. Co-downregulation of cell adhesion proteins alpha- and beta-catenins, p120CTN, E-cadherin, and CD44 in prostatic adenocarcinomas. **Hum Pathol**, v. 32, n. 8, p. 849-55, 2001.
- 257 MURANT, S. J. et al. Co-ordinated changes in expression of cell adhesion molecules in prostate cancer. **Eur J Cancer**, v. 33, n. 2, p. 263-71, 1997.
- 258 BREWSTER, S. F. et al. Preoperative p53, bcl-2, CD44 and E-cadherin immunohistochemistry as predictors of biochemical relapse after radical prostatectomy. **J Urol**, v. 161, n. 4, p. 1238-43, 1999.
- 259 VIS, A. N. et al. Prognostic value of cell cycle proteins p27(kip1) and MIB-1, and the cell adhesion protein CD44s in surgically treated patients with prostate cancer. **J Urol**, v. 164, n. 6, p. 2156-61, 2000.
- 260 YOKOMIZO, A. et al. Percentage of positive biopsy cores, preoperative prostate-specific antigen (PSA) level, pT and Gleason score as predictors of PSA recurrence after radical prostatectomy: a multi-institutional outcome study in Japan. **BJU Int.**, v. 98, n. 3, p. 549-53, 2006.
- 261 KHAN, F. A. et al. PSA recurrence following radical prostatectomy is comparable for all age groups in the UK. **Prostate Cancer Prostatic Dis.**, v. 8, n. 2, p. 158-62, 2005.
- 262 BLUTE, M. L. et al. Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy. **J Urol.**, v. 165, n. 1, p. 119-25, 2001.
- 263 XU, D. D. et al. Effect of Age and Pathologic Gleason Score on PSA Recurrence: Analysis of 2911 Patients Undergoing Radical Prostatectomy. **Urology**, v. 74, n. 3, p. 654-658, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429509001290>>. Acesso em: 08 set. 2015.

APÊNDICE A – CORRELAÇÃO ENTRE FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS

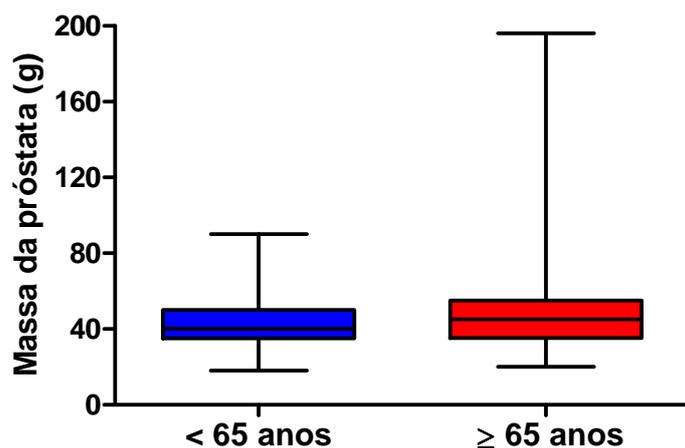
Figura 1 – Dosagem de PSA verificada em pacientes com câncer de próstata estratificados conforme a idade: menor que 65 anos e maior ou igual a 65 anos.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Os dados correspondem à mediana, intervalo interquartil (percentil 25 a percentil 75), valor mínimo e máximo das dosagens realizadas em 30 pacientes com idade inferior a 65 anos e 43 sujeitos com idade superior ou igual a 65 anos. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois estratos. Constatou-se que a mediana do PSA referente aos pacientes com idade superior ou igual a 65 anos foi significativamente maior (** $P = 0,0083$) que a relativa ao estrato etário inferior a 65 anos.

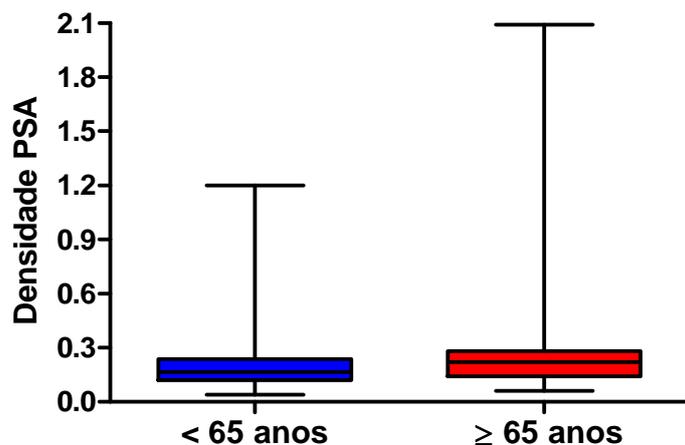
Figura 2 – Massa prostática mensurada em pacientes com câncer de próstata estratificados conforme a idade: menor que 65 anos e maior ou igual a 65 anos.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Os dados correspondem à mediana, intervalo interquartil (percentil 25 a percentil 75), valor mínimo e máximo das medições efetuadas em 30 pacientes com idade inferior a 65 anos e 44 sujeitos com idade superior ou igual a 65 anos. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois estratos. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre as medianas das massas tumorais referentes aos dois estratos etários ($P = 0,2213$).

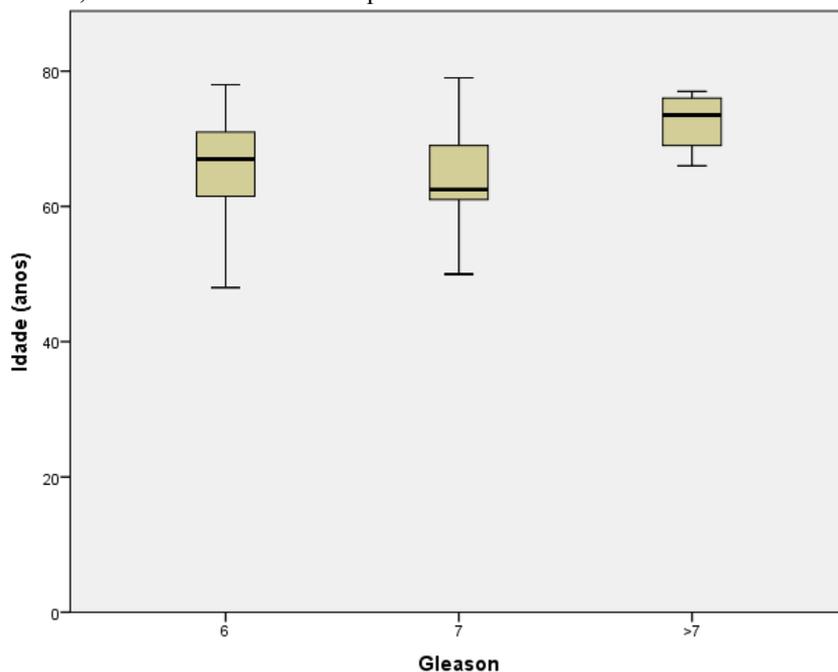
Figura 3 – Densidade de PSA mensurada em pacientes com câncer de próstata estratificados conforme a idade: menor que 65 anos e maior ou igual a 65 anos.



Fonte:Próprio autor.

Legenda: Os dados correspondem à mediana, intervalo interquartil (percentil 25 a percentil 75), valor mínimo e máximo das medições efetuadas em 30 pacientes com idade inferior a 65 anos e 43 sujeitos com idade superior ou igual a 65 anos. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois estratos. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre as medianas das densidades de PSA referentes aos dois estratos etários ($P = 0,1559$).

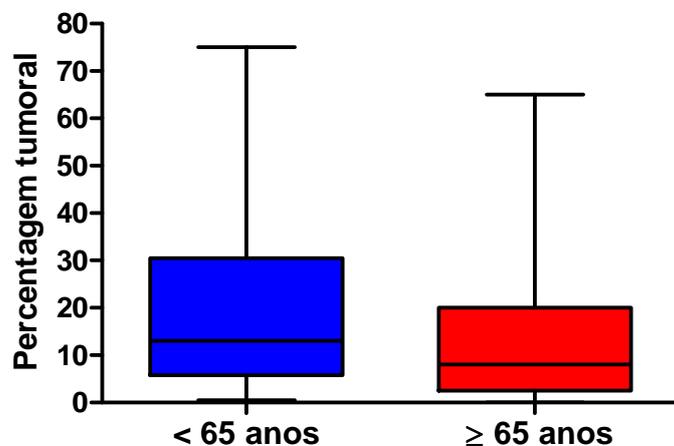
Figura 4 – Escores de Gleason verificados em pacientes com câncer de próstata estratificados conforme Escore 6, Escore 7 e Escore maior que 7.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Os dados correspondem à mediana, intervalo interquartil (percentil 25 a percentil 75), valor mínimo e máximo das medições efetuadas em 43 pacientes com Gleason 6, 27 pacientes com Gleason 7 e 4 pacientes com Gleason maior que 7. O teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes foi usado para comparar os três estratos. Constatou-se que a mediana de idade referente aos pacientes não apresenta diferença significativa em relação os Escores de Gleason ($p=0,111$).

Figura 5 – Percentagem de acometimento da próstata pelo tumor verificada em pacientes com câncer de próstata estratificados conforme a idade: menor que 65 anos e maior ou igual a 65 anos.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Os dados correspondem à mediana, intervalo interquartil (percentil 25 a percentil 75), valor mínimo e máximo das medições efetuadas em 30 pacientes com idade inferior a 65 anos e 44 sujeitos com idade superior ou igual a 65 anos. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois estratos. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre as medianas das percentagens tumorais referentes aos dois estratos etários ($P = 0,2192$).

Tabela 1 – Parâmetros de avaliação tumoral verificados em pacientes com câncer de próstata estratificados conforme a idade: menor que 65 anos e maior ou igual a 65 anos. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois estratos em relação a cada parâmetro.

Parâmetro	< 65 anos		≥ 65 anos		Significância (Teste de Mann-Whitney)
	Mediana (n)	Intervalo interquartil	Mediana (n)	Intervalo interquartil	
PSA	6,48 (30)	4,52 a 8,81	9,28 (43)	6,77 a 12,30	P = 0,0083
Massa tumoral	40,00 (30)	35,00 a 50,00	45,00 (44)	35,25 a 55,00	P = 0,2213
Densidade de PSA	0,17 (30)	0,12 a 0,24	0,22 (43)	0,14 a 0,28	P = 0,1559
Percentagem tumoral	13,00 (30)	5,75 a 30,50	8,00 (44)	2,50 a 20,00	P = 0,2192

Fonte: próprio autor.

Tabela 2 – Correlação entre a idade e os parâmetros de avaliação tumoral de pacientes com câncer de próstata. O coeficiente de correlação de Spearman foi usado para verificar o grau e o sinal da correlação linear entre a idade e os seis parâmetros. Constataram-se correlações fracas (positivas e negativas) ou inexistentes, apenas uma estatisticamente significativa.

Parâmetro	Idade		
	Coeficiente de correlação de Spearman	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor P)
PSA	0,3004	0,0686 a 0,5014	0,0098
Massa tumoral	0,1740	-0,0637 a 0,3929	0,1383
Densidade de PSA	0,1630	-0,0766 a 0,3848	0,1682
Gleason	0,0014	-0,2338 a 0,2364	0,9906
Porcentagem tumoral	-0,1214	-0,3466 a 0,1170	0,3029

Fonte: Próprio autor.

Tabela 3 – Associação entre a idade e o estadiamento do tumor em pacientes com câncer de próstata. Dados analisados pelo teste de exato de Fisher, que não evidenciou associação entre as categorias da idade e do estadiamento, ou seja, para as duas categorias do estadiamento, as proporções das duas categorias da faixa etária não foram significativamente diferentes ($P = 0,172$).

Idade	Estadiamento		Total
	pT2	pT3	
< 65 anos	20 (66,7%)	10 (33,3%)	30 (100,00%)
≥ 65 anos	36 (81,8%)	8 (18,2%)	44 (100,00%)
Total	56	18	74

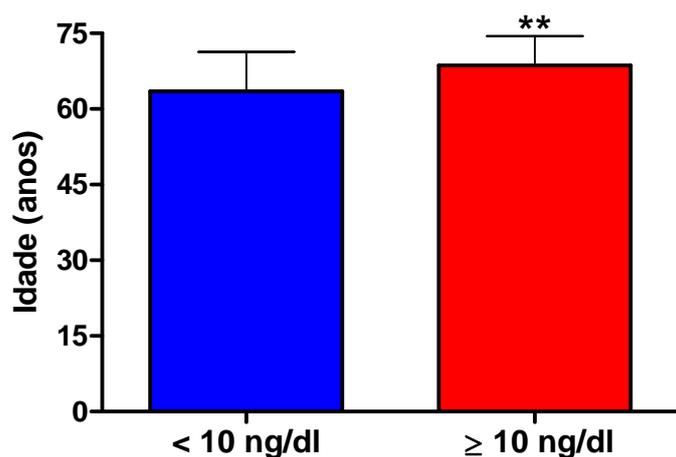
Fonte: Próprio autor.

Tabela 4 – Associação entre a idade e o status das margens cirúrgicas em pacientes com câncer de próstata. Dados analisados pelo teste de exato de Fisher, que não evidenciou associação entre as categorias da idade e do status das margens cirúrgicas, ou seja, para as duas categorias do status das margens cirúrgicas, as proporções das duas categorias da faixa etária não foram significativamente diferentes ($P = 0,8062$).

Idade	Margens cirúrgicas		Total
	Comprometidas	Livres	
< 65 anos	10 (33,33%)	20 (66,67%)	30 (100,00%)
≥ 65 anos	17 (38,64%)	27 (61,36%)	44 (100,00%)
Total	27	47	74

Fonte: Próprio autor.

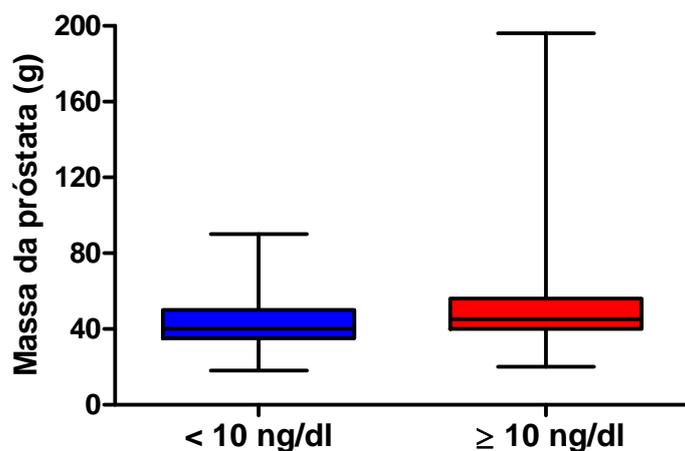
Figura 6 – Idade de pacientes com câncer de próstata estratificados conforme a dosagem de PSA: menor que 10 ng/dl e maior ou igual a 10 ng/dl.



Fonte: Próprio autor.

Os dados correspondem à média e desvio padrão das idades de 45 pacientes com PSA menor que 10 ng/dl e 28 sujeitos com PSA superior ou igual a 10 ng/dl. O teste de t para dados não emparelhados foi usado para comparar os dois estratos. Constatou-se que a idade média referente aos pacientes com PSA superior ou igual a 10 ng/dl foi significativamente maior (** $P = 0,0037$) que a relativa ao estrato de pacientes com PSA inferior a 10 ng/dl.

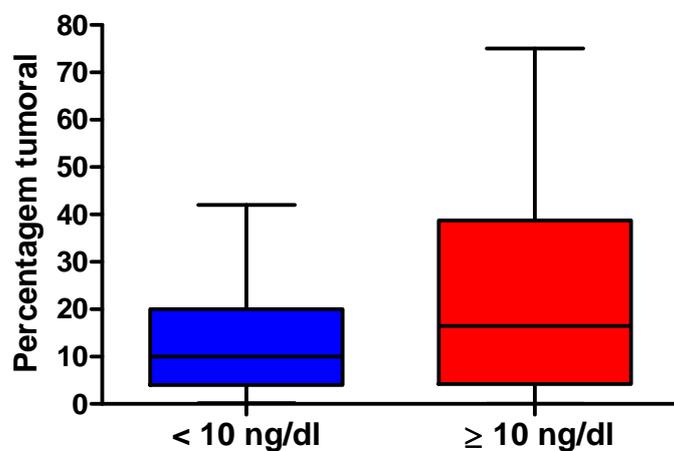
Figura 7 – Massa prostática mensurada em pacientes com câncer de próstata estratificados conforme a dosagem de PSA: menor que 10 ng/dl e maior ou igual a 10 ng/dl.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Os dados correspondem à mediana, intervalo interquartil (percentil 25 a percentil 75), valor mínimo e máximo das medições efetuadas em 45 pacientes com PSA menor que 10 ng/dl e 28 sujeitos com PSA superior ou igual a 10 ng/dl. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois estratos, não sendo constatada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0613$).

Figura 8 – Percentagem de acometimento da próstata pelo tumor verificada em pacientes com câncer de próstata estratificados conforme a dosagem de PSA: menor que 10 ng/dl e maior ou igual a 10 ng/dl.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Os dados correspondem à mediana, intervalo interquartil (percentil 25 a percentil 75), valor mínimo e máximo das medições efetuadas em 45 pacientes com PSA menor que 10 ng/dl e 28 sujeitos com PSA superior ou igual a 10 ng/dl. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois estratos, não sendo constatada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,1660$).

Tabela 5 – Parâmetros de avaliação tumoral verificados em pacientes com câncer de próstata estratificados conforme a dosagem de PSA: menor que 10 ng/dl e maior ou igual a 10 ng/dl. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois estratos em relação a cada parâmetro, exceto para idade, que foi analisada pelo teste *t* para dados não emparelhados.

Parâmetro	< 10 ng/dl (n = 45)		≥ 10 ng/dl (n = 28)		Significância
	Mediana	Intervalo interquartil	Mediana	Intervalo interquartil	
Idade ^a	63,51	7,86	68,68	5,81	P = 0,0037
Massa prostática	40,00	35,00 a 50,00	45,00	40,00 a 56,00	P = 0,0613
Porcentagem tumoral	10,00	4,00 a 20,00	16,50	4,25 a 38,75	P = 0,1660

^aMédia e desvio padrão.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 – Correlação entre a dosagem de PSA e a idade e demais parâmetros de avaliação tumoral de pacientes com câncer de próstata. O coeficiente de correlação de Spearman foi usado para verificar o grau e o sinal da correlação linear as variáveis. Constataram-se correlações fracas e positivas, exceto para a densidade do PSA, cuja correlação com o PSA foi boa, como esperado.

Parâmetro	PSA		
	Coeficiente de correlação de Spearman	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor P)
Idade	0,3004	0,0686 a 0,5014	0,0098
Massa prostática	0,1252	-0,1149 a 0,3514	0,2914
Gleason	0,3457	0,1188 a 0,5383	0,0027
Porcentagem tumoral	0,3084	0,0774 a 0,5080	0,0079

Fonte: Próprio autor.

Tabela 7 – Associação entre o PSA e o estadiamento do tumor em pacientes com câncer de próstata. Dados analisados pelo teste de exato de Fisher, que não evidenciou associação entre as categorias do PSA e do estadiamento, ou seja, para as duas categorias do estadiamento, as proporções dos dois estratos do PSA não foram significativamente diferentes ($P = 0,410$).

PSA	Estadiamento		Total
	pT2	pT3	
< 10 ng/dl	36 (80,0%)	9 (20,0%)	45 (100,00%)
≥ 10 ng/dl	20 (71,4%)	8 (28,6%)	28 (100,00%)
Total	56	17	73

Fonte: Próprio autor.

Tabela 8 – Associação entre o PSA e o status das margens cirúrgicas em pacientes com câncer de próstata. Dados analisados pelo teste de exato de Fisher, que não evidenciou associação entre as categorias do PSA e do status das margens cirúrgicas, ou seja, para as duas categorias do status das margens cirúrgicas, as proporções dos dois estratos do PSA não foram significativamente diferentes ($P = 0,4610$).

PSA	Margens cirúrgicas		Total
	Comprometidas	Livres	
< 10 ng/dl	15 (33,33%)	30 (66,67%)	45 (100,00%)
≥ 10 ng/dl	12 (42,86%)	16 (57,14%)	28 (100,00%)
Total	27	46	73

Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 – Associação entre o PSA e a extensão extraprostática do tumor em pacientes com câncer de próstata. Dados analisados pelo teste de exato de Fisher, que não evidenciou associação entre as categorias do PSA e da extensão extraprostática, ou seja, para as duas categorias da extensão extraprostática, as proporções dos dois estratos do PSA não foram significativamente diferentes ($P = 0,384$).

PSA	Extensão extraprostática		Total
	Sim	Não	
< 10 ng/dl	37 (82,2%)	8 (17,8%)	45 (100,00%)
≥ 10 ng/dl	20 (71,4%)	8 (28,6%)	28 (100,00%)
Total	57	16	73

Fonte: Próprio autor.

Tabela 10 – Associação entre o PSA e a invasão da vesícula seminal em pacientes com câncer de próstata. Dados analisados pelo teste de exato de Fisher, que não evidenciou associação entre as categorias do PSA e da invasão da vesícula seminal, ou seja, para as duas categorias da invasão da vesícula seminal, as proporções dos dois estratos do PSA não foram significativamente diferentes ($P = 1,0000$).

PSA	Invasão da vesícula seminal		Total
	Sim	Não	
< 10 ng/dl	5 (11,11%)	40 (88,89%)	45 (100,00%)
≥ 10 ng/dl	3 (10,71%)	25 (89,29%)	28 (100,00%)
Total	8	65	73

Fonte: Próprio autor.

Tabela 11 – Associação entre o status das margens cirúrgicas e a presença de glândulas benignas nas margens de ressecção em pacientes com câncer de próstata. Dados analisados pelo teste de exato de Fisher, que não evidenciou associação entre as categorias do status das margens cirúrgicas e da presença de glândulas benignas, ou seja, para as duas categorias da presença de glândulas benignas, as proporções das duas categorias do status das margens cirúrgicas não foram significativamente diferentes ($P = 0,3065$).

Margens cirúrgicas	Presença de glândulas benignas		Total
	Sim	Não	
Livres	12 (25,53%)	35 (74,47%)	46 (100,00%)
Comprometidas	10 (37,04%)	17 (62,96%)	27 (100,00%)
Total	22	52	74

Fonte: Próprio autor.

Tabela 12 – Associação entre o tipo de cirurgia e o status das margens cirúrgicas em pacientes com câncer de próstata. Dados analisados pelo teste de exato de Fisher, que não evidenciou associação entre os tipos de cirurgia e as categorias do status das margens cirúrgicas, ou seja, para as duas categorias do status das margens cirúrgicas, as proporções dos dois tipos de cirurgia não foram significativamente diferentes ($P = 1,0000$).

Tipo de cirurgia	Margens cirúrgicas		Total
	Comprometidas	Livres	
PRC	16 (35,56%)	29 (64,44%)	45 (100,00%)
VDL	11 (37,93%)	18 (62,07%)	29 (100,00%)
Total	27	47	74

Fonte: Próprio autor.

Tabela 13– Associação entre o tipo de cirurgia e a presença de glândulas benignas nas margens de ressecção em pacientes com câncer de próstata. Dados analisados pelo teste de exato de Fisher, que não evidenciou associação entre os tipos de cirurgia e as categorias da presença de glândulas benignas nas margens, ou seja, para as duas categorias da presença de glândulas benignas nas margens, as proporções dos dois tipos de cirurgia não foram significativamente diferentes ($P = 1,0000$).

Tipo de cirurgia	Presença de glândulas benignas		Total
	Sim	Não	
PRC	13 (28,89%)	32 (71,11%)	45 (100,00%)
VDL	9 (31,03%)	20 (68,97%)	29 (100,00%)
Total	22	52	74

Fonte: Próprio autor.

**APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TLCE)**

Título da Pesquisa: “MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS EM PROSTATECTOMIAS RADICAIS E CORRELAÇÃO CLÍNICO LABORATORIAL NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DO CÂNCER DE PRÓSTATA”

Nome do Pesquisador Principal: Conceição Aparecida Dornelas

Nome do(s) Pesquisador Participante: João Batista Gadelha de Cerqueira.

1. **Natureza da pesquisa:** o Senhor neste momento é convidado a participar desta pesquisa que tem como finalidade estudar novos marcadores de prognóstico do câncer de próstata, ou seja, estudar uma nova forma de avaliar como a sua doença está sobre controle ou evoluindo para cura, baseado na análise do material que está depositado em um banco de tecidos incluídos em parafina, já disponível no Departamento de Patologia, juntamente com sua avaliação ambulatorial periódica para exames clínicos de controle rotineiros que já acontecem no serviço de urologia, e nos casos de suas visitas anteriores, de pesquisa dos dados computado em seu prontuário. Este estudo pretende investigar no tecido tumoral guardado em parafina, um marcador, que juntamente com outros exames laboratoriais e sua evolução clínica, das idas ao ambulatório para revisões médica, nos prediga e possa aprimorar futuramente um melhor enfrentamento e tratamento da sua doença e de outros pacientes.
2. **Participantes da pesquisa:** Pacientes operados submetidos a prostatectomia radical, retirada total da próstata, por câncer de próstata a partir do ano de 2008.
3. **Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo, o Senhor tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para a Senhor. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do pesquisador do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.
4. **Material utilizado na pesquisa:** Existe neste departamento material biológico conservado em parafina que pertence ao senhor e que é responsabilidade da Universidade Federal do Ceará. Nesse trabalho deverá ser utilizada pequena parte desse material para análise e procedimento histológico, previsto na pesquisa. Desta forma, com sua autorização isso poderá ser realizado, segundo

exigência do Comitê de Ética previsto na Resolução 441 de 12 de maio de 2011 do Conselho Nacional de Saúde.

5. **Sobre as entrevistas:** Haverá entrevista para avaliação do estado de acompanhamento ambulatorial e verificação de reestadiamento pelo médico assistente a cada 6 meses por 5 anos. Isso é necessário para associar os marcadores com a evolução da sua doença.
6. **Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.
7. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o pesquisador e o orientador terão conhecimento dos dados.
8. **Benefícios:** ao participar desta pesquisa a senhor não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a avaliação de novos marcadores para prognóstico câncer de próstata localizado, ou seja uma doença ainda no início, de forma que o conhecimento será construído a partir desta pesquisa, onde pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.

9. **Pagamento:** a Senhor não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa. Declaro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a realização da pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura da Testemunha

Pesquisador Principal _____

Demais pesquisadores _____

Conceição A. Dornelas Tel 33668300 eusoucondor2011@yahoo.com.br

João Batista Gadelha de Cerqueira. Tel 33668063 joaogadelha@bol.com.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER

CANTÍDIO TEL 3366 8589 cephuwc@huwc.ufc.br

DPML - Departamento de Patologia e Medicina Legal - Faculdade de Medicina/UFC -
Fortaleza (CE) - Brasil - Telefones: (+55 85) 3366.8300 / 3366.8301 – Endereço: Rua
Monsenhor Furtado S/N - Rodolfo Teófilo - CEP 60.441-750 - Caixa Postal 3169.

ANEXO A- AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE
FONE: (85) 3366-8589 / 3366.8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 011.03.12

Pesquisadora Responsável: Conceição Aparecida Dornelas

Departamento / Serviço: Patologia e medicina Legal

Título do Projeto: “Marcadores imunohistoquímicos em prostatectomias radicais e correlação clínico laboratorial na avaliação prognóstica do câncer de próstata”.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou o projeto de pesquisa supracitado e, em tendo sido atendidas as pendências, baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 06/06/2013).

Fortaleza, 06 de junho de 2012.


Dra. Maria de Fátima de Souza
Coordenadora do CEP - HUWC

**ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E
MEDICINA LEGAL**



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E
MEDICINA LEGAL
SECRETARIA ADMINISTRATIVA

OFÍCIO Nº 025/2012/DPML

Fortaleza, 07 de março de 2012.

Senhor Diretor,

Estamos encaminhando a V. S^a., Projeto de Pesquisa Intitulado: **MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS EM PROSTATECTOMIAS RADICAIS E CORRELAÇÃO CLÍNICO LABORATORIAL NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DO CÂNCER DA PRÓSTATA**, cadastrado neste Departamento, sob o nº **SC0101.2012** e aprovado na 165^a Reunião Ordinária, em 02/03/2012.

Atenciosamente,

Prof. Paulo Roberto Carvalho de Almeida
Chefe do Departamento de Patologia Medicina Legal

Ilmo Sr.
Prof. José Luciano Bezerra Moreira
Diretor da Faculdade de Medicina/UFC

Rua Monsenhor Furtado S/n – CEP: 60-441 – Fortaleza-CE

Fone: (085)33668300/33668301 – Fax: (085)33668634 – Email/Website: dpml@ufc.br

OF 025-2012 Projeto de Pesquisa

1/1

**ANEXO C – AUTORIZAÇÃO DO SERVIÇO DE UROLOGIA DO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO**

**TERMO DE CIÊNCIA DO
MÉDICO RESPONSÁVEL PELO SETOR
ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA**

Eu, Lucio Fávio Gonzaga Silva, Chefe do Serviço de Urologia, conheço o protocolo de pesquisa intitulado: MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS EM PROSTATECTOMIAS RADICAIS E CORRELAÇÃO CLÍNICO LABORATORIAL NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DO CÂNCER DE PRÓSTATA, desenvolvido pela Professora Conceição Aparecida Dornelas e outros, conheço seus objetivos e a metodologia que será desenvolvida, estando ciente de que o pesquisador não irá interferir no fluxo normal deste Serviço.



Lucio Flavio Gonzaga Silva

Fortaleza, 16 de abril de 2012.