

**ESTUDO DOS FATORES PROGNÓSTICOS,
ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO E MUTAÇÃO DO ÉXON
9 DO GENE *BRCA2* EM PACIENTES COM
ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO NÃO
METASTÁTICOS**

ADRIANO TESTON

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Antonio Cassio Assis Pellizzon

Co-Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Teston, Adriano

Estudo dos fatores prognósticos, estratificação de risco e mutação do éxon 9 do gene BRCA2 em pacientes com adenocarcinoma prostático não metastáticos / Adriano Teston – São Paulo, 2012.

59p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Antonio Cassio Assis Pellizzon

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA PRÓSTATA. 2. RECIDIVA. 3. PROGNÓSTICO. 4. GENES BRCA2. 5. MUTAÇÃO. 6. ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais Vera e Antônio pelo exemplo, empenho e dedicação incondicionais.

Aos meus irmãos Letícia e Marcelo pelo convívio.

À minha namorada Caroline pelo apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

BIANCA CRISTINA GARCIA LISBOA

Dra. DIRCE MARIA CARRARO

Dra LOUISE DE BROT

Dr. ANTONIO CASSIO ASSIS PELLIZZON

Dr. FRANCISCO PAULO DA FONSECA

ELOISA R. OLIVIERI

PROF. Dr. FERNANDO AUGUSTO SOARES

RESIDENTES DO DEPARTAMENTO DE RADIOTERAPIA DO HOSPITAL

A.C. CAMARGO

Todos contribuíram muito para a realização desse trabalho.

RESUMO

Teston A. **Estudo dos fatores prognósticos, estratificação de risco e mutação do éxon 9 do gene *BRCA2* em pacientes com adenocarcinoma prostático não metastáticos.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer de próstata (CaP) é o mais prevalente entre os homens, sendo o segundo em mortalidade. O grande desafio é selecionar quais pacientes com tumor localizado que estão em risco de progressão. Isso justifica a busca por fatores prognósticos para melhor estratificar os pacientes em grupos de risco. Recentemente, mutação no éxon 9 do gene *BRCA2* de pacientes com CaP demonstrou ter impacto negativo na sobrevida. **Objetivos:** Estimar a prevalência da mutação no éxon 9 do gene *BRCA2*, nos tumores de pacientes com adenocarcinoma prostático não metastáticos submetidos à prostatectomia radical. Avaliar fatores prognósticos, estratificação de risco e influências destes na recorrência e sobrevida. Estimar o impacto prognóstico das mutações. **Materiais e Métodos:** Os dados clínicos e patológicos de 329 pacientes submetidos à prostatectomia radical foram levantados de forma retrospectiva, e estratificados em grupo de risco intermediário e alto baseados nos valores do PSA, no Escore de Gleason (EG) e no Estádio tumoral (T). Para avaliação da mutação, DNA de 263 tumores foi purificado e utilizado para a amplificação do éxon 9 por PCR (reação da cadeia de polimerase). Após a PCR, foi realizado o sequenciamento direto para avaliação da presença de mutação. **Resultados:** Altos valores de PSA ($p < 0,001$), porcentagem dos fragmentos biopsiados positivos ($p < 0,01$), EG da biópsia ($p = 0,018$) e estratificação do risco baseado nos fatores pré-tratamento ($p < 0,001$) foram associados com menor sobrevida livre de recidiva bioquímica (SLRB). Além disso, pT, EG da peça cirúrgica, margens, estratificação de risco usando o pT e o EG da peça associaram-se significativamente à sobrevida global (SG)

e à SLRB. Nenhum dos fatores pré-tratamento avaliados associaram-se à SG. Adicionalmente, não foram encontradas mutações no éxon 9 do *BCRA2* na casuística desse estudo. **Conclusões:** Os dados obtidos indicam que mutação do éxon 9 do *BRCA2* provavelmente não tem relevância no CaP esporádico na população brasileira.

SUMMARY

Teston A. [Study of prognostic factors, risk stratification and mutation in exon 9 of *BRCA2* gene in patients with non metastatic prostatic adenocarcinoma]. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Prostate cancer (PCa) is the most common among men and the second one in mortality. The big challenge is to select patients with localized tumor who are at risk of progression. This justifies the search for prognostic factors to better stratify patients into risk groups. The mutation in exon 9 of *BRCA2* gene of patients with PCa has recently shown negative impact on survival. **Purposes:** Estimating the prevalence of mutation in exon 9 of *BRCA2* gene in tumors of patients with non metastatic PCa who underwent radical prostatectomy. Assessing prognostic factors, risk stratification and influences thereof on recurrence and survival. Estimating the prognostic impact of mutations. **Materials and Methods:** Clinical and pathologic data from 329 patients who underwent radical prostatectomy was retrospectively raised and stratified into group of risk based on the PSA values, on the Gleason Score (GS) and on staging of tumor (T). To assess the mutation, the DNA of 263 tumors was purified and used to amplify exon 9 through PCR (polymerase chain reaction). After the PCR, direct sequencing was performed to assess the presence of mutation. **Results:** High PSA values ($p < 0.001$), percentage of positive biopsy fragments ($p < 0.01$), biopsy GS ($p = 0.018$) and risk stratification based on pretreatment factors ($p < 0.001$) were associated with lower biochemical relapse-free survival (BRFS). Moreover, pT, GS of the surgical specimen, margins, risk stratification using the pT and GS of the specimen were significantly associated with OS and BRFS. None of the pretreatment factors assessed was associated with overall survival (OS). Additionally, mutations in exon 9 of *BRCA2* were not found in the cases of this study. **Conclusions:** The data

obtained indicate that mutation in exon 9 of *BRCA2* is probably not relevant in sporadic PCa of Brazilian population.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna da próstata).....	2
Figura 2	Gráfico demonstrando a sobrevida câncer específica nos pacientes portadores da mutação no <i>BRCA2</i> em relação aos controles.....	13
Figura 3	Exemplo de um fragmento do éxon 9 sequenciado, em maior amento um pequeno fragmento.....	22
Figura 4	Curva de Kaplan Meier para a SLRB segundo o risco pré-tratamento.....	32
Figura 5	Curva de Kaplan Meier para a SG segundo o risco pré-tratamento.....	32
Figura 6	Curva de Kaplan Meier da SG segundo o risco pós-tratamento.....	37
Figura 7	Curva de Kaplan Meier da SG segundo o estágio patológico.....	37
Figura 8	Curva de Kaplan-Meier para a Sobrevida Global.....	39
Figura 9	Curva de Kaplan-Meier para a Sobrevida Livre de Recidiva Bioquímica.....	39
Figura 10	Curva de Kaplan-Meier para a Sobrevida Livre de Recidiva Clínica.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das variáveis pré-tratamento.....	29
Tabela 2	Estadiamento clínico tumoral e associações.....	30
Tabela 3	Porcentagem dos fragmentos biopsiados positivos e associações.....	31
Tabela 4	Distribuição das variáveis patológicas da peça cirúrgica.....	35
Tabela 5	Análise das variáveis em relação à porcentagem de SG, SLRB e SLRC em cinco anos.....	36

LISTAS DE ABREVIATURAS

ABI	<i>Applied Biosystems</i>
CaP	Câncer de próstata
cN	Estádio clínico linfonodal
cT	Estádio clínico tumoral
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EAP	Exame anátomo patológico da peça cirúrgica
EC	Extravasamento capsular
EG	Escore de Gleason
ERG	<i>Ets Related Gene</i>
ERSPC	<i>European randomized study of screening for prostate cancer</i>
EUA	Estados Unidos da América
IVL	Invasão vaso-linfática
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPN	Invasão perineural
MoCa	Mortalidade câncer específica
PCA3	<i>Prostate cancer antigen 3</i>
PCPT	<i>Prostate cancer treatment program</i>
PCR	Reação de cadeia de polimerase
PLCO	<i>Prostate, lung colorectal and ovarian cancer screening trial</i>
pN	Estádio patológico linfonodal
PR	Prostatectomia radical
PSA	Antígeno prostático específico
PSApré	Antígeno prostático específico pré tratamento
pT	Estádio patológico tumoral
RB	Recidiva bioquímica
RC	Recidiva clínica
REDUCE	<i>Reduction by dutasteride of prostate cancer events</i>
RR	Risco relativo

SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SEER	<i>Surveillance, epidemiology, and end results</i>
SG	Sobrevida global
SLRB	Sobrevida livre de recidiva bioquímica
SLRC	Sobrevida livre de recidiva clínica
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease, serine 2</i>
TNM	Tumor linfonodo metástase
TR	Toque retal

ÍNDICE

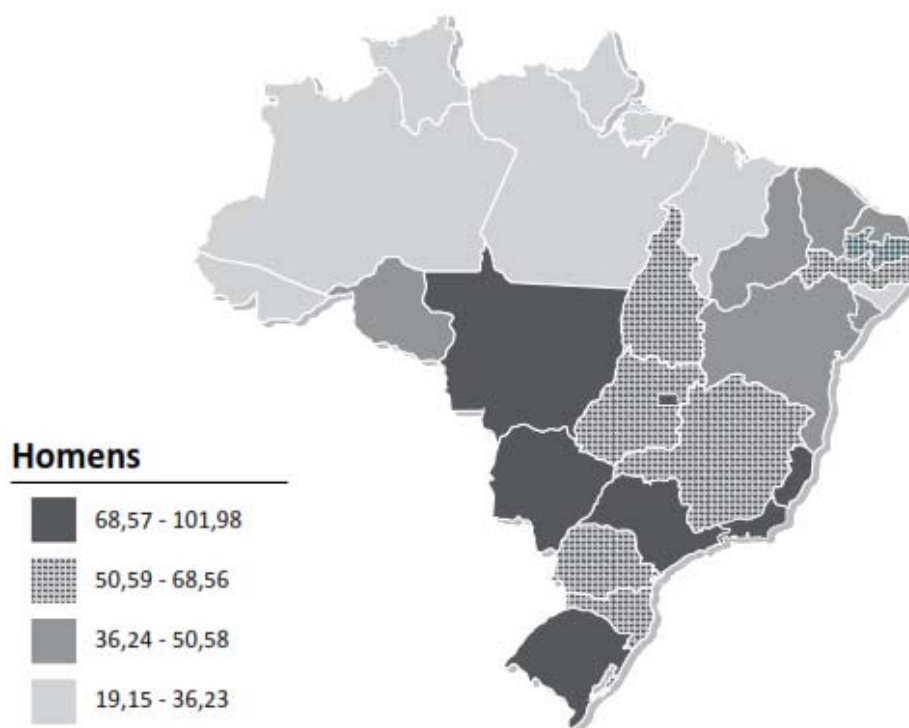
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Fatores Prognósticos Utilizados na Prática Clínica.	3
1.2	Marcadores Moleculares de Prognóstico e de Susceptibilidade.....	8
2	JUSTIFICATIVA	16
3	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo Geral.....	17
3.2	Objetivos Específicos	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1	Casuística.....	18
4.2	Critérios de Inclusão	18
4.3	Critérios de Exclusão.....	19
4.4	Cálculo do Tamanho da Amostra	19
4.5	Avaliação da mutação no Gene <i>BRCA2</i>	20
4.5.1	Extração do DNA.....	20
4.5.2	Sequenciamento direto.....	21
4.5.3	Análise do sequenciamento obtido.....	21
4.6	Variáveis.....	23
4.7	Análise Estatística	25
5	RESULTADOS	27
5.1	Características dos Pacientes	27
5.1.1	Dados Clínicos Pré-Tratamento	27
5.1.2	Dados do Exame Anatomopatológico da Peça Cirúrgica	32
5.2	Desfechos Clínicos.....	38
5.3	Resultados do Sequenciamento.....	40

6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÕES	47
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer de próstata (CaP) é o mais prevalente entre os homens, excluindo os tumores de pele não melanoma. A sua incidência varia de acordo com a população estudada, sendo mais frequente nos países desenvolvidos (Ministério da Saúde 2011). De uma forma geral, com o aumento da expectativa de vida, e com a maior difusão dos programas de rastreamento, tem-se aumentado o número de casos diagnosticados do carcinoma prostático, principalmente em estádios precoces. Uma meta-análise avaliou o impacto do rastreamento em 387.286 pacientes, e concluiu que ele está associado ao aumento de 46% na probabilidade de diagnóstico, além de aumento de 95% das chances de diagnóstico no estágio I (DJULBEGOVIC et al. 2010).

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para incidência de câncer, no ano de 2012, foram previstos 60.180 casos novos, correspondendo a um risco estimado de 62 casos novos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores cutâneos, o CaP é o mais frequente em todas as regiões brasileiras, com risco estimado maior na região Sudeste (77/100.000), seguidos da Centro-Oeste com o segundo maior risco (74/100.000) e da região Sul com o terceiro (68/100.000) (Ministério da Saúde 2011). Em termos de mortalidade, o CaP ocupa nacionalmente a segunda posição.



Fonte: Ministério da Saúde (2011)

Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna da próstata)

A mortalidade câncer específica é relativamente baixa quando se compara com outras neoplasias. Dados de séries históricas demonstram taxas de mortalidade que não ultrapassam 7% em 20 anos (ALBERTSEN et al. 1995), em casos iniciais de tumores de baixo grau (escore de Gleason entre 2 a 4) tratados de maneira expectante. No entanto, para tumores de alto grau (escore de Gleason 8 a 10) manejados dessa forma, a perda estimada na expectativa de vida é de oito anos.

Dessa forma, o maior desafio da prática diária é identificar quais pacientes com tumor localizado estão em risco de progressão tumoral, reduzindo a qualidade e expectativa de vida (JONIAU e VAN POPPEL 2008).

1.1 FATORES PROGNÓSTICOS UTILIZADOS NA PRÁTICA CLÍNICA

Para identificar os tumores biologicamente agressivos e potencialmente fatais, são utilizados fatores prognósticos clínicos e patológicos. A partir deles classificam-se os pacientes em grupos risco de recidiva ao tratamento. Os fatores mais comumente usados com esse objetivo são: o estadiamento clínico tumoral (cT) do TNM, o escore de Gleason (EG) e o nível sérico do antígeno prostático específico pré tratamento (PSApré).

A chance de cura do CaP está diretamente relacionada à extensão anatômica da neoplasia. A probabilidade de erradicar a doença reduz gradativamente com a invasão das vesículas seminais, com a infiltração da cápsula e dos tecidos periprostáticos, bem como, com a sua disseminação aos linfonodos regionais. Na era do PSA, devido a menor frequência do diagnóstico em estádios localmente avançados (cT3 e cT4) e com linfonodos positivos (cN1), o estadiamento clínico tumoral tem sido questionado como fator preditor de recidiva bioquímica e sobrevida. Nesse sentido, REESE et al. (2010) demonstraram que o estadiamento clínico não é mais capaz de

estratificar os pacientes, não sendo um fator prognóstico relevante nos estádios iniciais. A conclusão dos autores baseou-se no estudo de 4.899 homens submetidos à prostatectomia radical (PR), 51,9% desses classificados como cT1 e 48,1% como cT2. Em análise univariada, apenas a subclassificação cT2b (tumor unilateral envolvendo mais de 50% de um lobo) correlacionou-se com extensão anatômica no espécime cirúrgico. Não houve correlação do cT com recidiva bioquímica nem com sobrevida. Na análise multivariada, não houve associação com os achados patológicos nem com recidiva bioquímica.

O adenocarcinoma representa mais de 95% das neoplasias malignas prostáticas. Biologicamente, ele comporta-se num *continuum* de tumor indolente (baixo grau) aos mais agressivos (mais alto grau) e potencialmente fatais, existindo cerca de 40 sistemas de graduação histológica descritos para o mesmo (HUMPHREY 2004). O escore de Gleason é o mais aceito e difundido mundialmente, correlacionando-se de maneira significativa com mortalidade câncer específica (MoCa), mortalidade geral e estadiamento clínico (MELLINGER et al. 1967; GLEASON e MELLINGER 1974; GLEASON 1992). Baseado exclusivamente em critérios histológicos arquiteturais, em lâminas coradas com hematoxilina eozina (H&E), o tumor é graduado atribuindo notas de 1 a 5. A nota 1 representa o grau mais diferenciado, a nota 5, o menos diferenciado. O escore é resultado da soma de dois valores: o gleason primário (padrão mais frequentemente encontrado) e o gleason secundário (segundo mais encontrado). Dessa forma, o escore final varia de 2 a 10, sendo este último o mais agressivo e

indiferenciado. No entanto, avaliando-se pela imuno-histoquímica, por exemplo, é mais provável que um EG = 2 (1 + 1) seja na verdade uma adenose do que uma neoplasia maligna propriamente dita. Os tumores de baixo grau (EG = 2 a 4) são raramente vistos em biópsias, uma vez que são localizados com mais frequência na zona transicional da próstata. Além disso, séries históricas demonstram que pacientes com tumores de baixo grau manejados de forma expectante apresentam sobrevida ajustada pela idade semelhante à da população sem a neoplasia (ALBERTSEN et al. 1995). Por isso, os consensos da Sociedade Internacional de Patologia têm paulatinamente recomendando o desuso dos graus 1 a 2. Baseado nessas recomendações, hoje em dia, raramente encontra-se nas biópsias um EG total de 2 a 4 (EPSTEIN 2010). Mesmo com o refinamento desse sistema, ele mantém certo grau de subjetividade, podendo haver variações entre diferentes patologistas. KUROIWA et al. (2010) estudaram esse fato entre patologistas de 50 centros japoneses, após reavaliação de espécimes cirúrgicos por uro-patologistas de centro especializado. Num total de 2.015 casos, houve concordância exata entre o patologista central e o patologista dos demais centros em 54,8%, graduação subestimada ocorreu em 25,9% e hiperestimada em 19,2%. Os escores de 8 a 10 foram os que demonstraram maior taxa de discordância, em relação aos demais. Além disso, séries atuais apontam porcentagens de discordância consideráveis no EG estimado através de biópsia, quando comparado com a peça cirúrgica. ISARIYAWONGSE et al. (2008) numa série de 2.963 pacientes, detectaram diferença em 55,8% dos casos. A biópsia subestimou o valor do EG em

41,2% em relação à peça cirúrgica. Homens com idade maior que 60 anos e PSA maior que 10ng/ml foram fatores associados ao EG subestimado. KULKARNI et al. (2007) avaliaram que, em 175 pacientes submetidos à PR, o EG foi subestimado na biópsia em 60 casos (34%) e encontraram que o PSA_{pré} é fator preditor para essa discrepância.

O nível sérico do PSA pré-tratamento está relacionado ao estágio patológico, ao risco de metástase sistêmica, sendo também um preditor do risco de recidiva bioquímica, e de sobrevida (ROACH et al. 2003). A probabilidade de haver doença invadindo os tecidos periprostáticos aumenta quanto mais altos forem os níveis de PSA_{pré}. PARTIN et al. (1993) demonstraram que pacientes com níveis de PSA_{pré} < 10 ng/ml apresentam chances de 20 a 30% de apresentarem doença extra prostática. Nos casos com o PSA_{pré} > 10 ng/ml esse risco aumenta para 50% e em pacientes com PSA_{pré} > 50 ng/ml as chances sobem para 75%. ROACH et al. (2000) através de uma metanálise verificaram que PSA_{pré} > 20 ng/ml está associado a maior risco de metástase sistêmica. SHIPLEY et al. (1999) analisaram o risco de recidiva à radioterapia de 1.765 pacientes com estágio clínico T1b a T2, estratificando de acordo com o nível do PSA_{pré}. Em cinco anos, a sobrevida livre de recidiva bioquímica foi de 81% para PSA_{pré} < 10 ng/ml, 68% PSA_{pré} entre 10 a 20 ng/ml, 51% PSA_{pré} entre 20 a 30 ng/ml e 31% PSA_{pré} > 30 ng/ml. Apesar de muitas evidências da agressividade biológica relacionada a níveis de PSA muito elevados, a resposta ao tratamento desses pacientes não resultará inexoravelmente num prognóstico reservado. INMAN et al. (2008) analisaram os resultados de 236 pacientes

com PSA_{pré} > 50 ng/ml tratados inicialmente com prostatectomia radical. Noventa e três por cento dos pacientes receberam terapia de deprivação androgênica (59% adjuvante, 34% resgate após recidiva bioquímica) e 38% foram submetidos à radioterapia (17% adjuvante, 21% resgate). A maioria dos pacientes tinha estágio patológico localmente avançado (pT3 a 4 = 83%) e 40% tinham linfonodos pélvicos comprometidos. Estratificaram os pacientes em dois grupos: PSA_{pré} entre 50 a 99 (76%) e PSA_{pré} > 100 ng/ml (24%). A sobrevida livre de metástases em 10 anos nos grupos foi, respectivamente, de 83 e 74%, e a sobrevida câncer específica em 10 anos foi de 90 e 79%. NOGUCHI et al. (2000) descreveram 148 casos de tumores oriundos da zona transicional da próstata. Apesar de que 2/3 dos pacientes apresentavam PSA_{pré} > 10 ng/ml, em 80% dos casos a neoplasia era confinada à próstata e a sobrevida livre de recidiva bioquímica em cinco anos foi de 71,5%. Por outro lado, MEEKS et al. (2009) avaliaram as características de 77 pacientes submetidos a PR tendo PSA_{pré} < 2,5 ng/ml. Em 9% dos pacientes detectou-se extensão tumoral extracapsular, em 8% invasão das vesículas seminais e em 26% dos casos o EG foi maior que sete.

Além desses, outros fatores clínicos pré-tratamento têm demonstrado importante valor prognóstico. Destacam-se a porcentagem de fragmentos positivos na biópsia e a velocidade de aumento do PSA, ambos sendo fatores independentes para predizer a mortalidade câncer específica. Pacientes do grupo intermediário que possuem a porcentagem de fragmentos positivos em biópsias maior que 50%, apresentam semelhante

recidiva ao grupo de alto risco (30 x 43% de controle bioquímico em cinco anos), enquanto que pacientes com a porcentagem menor que 34% apresentam desfechos semelhantes ao grupo de baixo risco (85 x 91% de controle bioquímico em cinco anos) (D'AMICO et al. 2001). A velocidade de aumento do PSA pré-tratamento $> 2\text{ng/ml/ano}$, aumenta em 12 vezes o risco de morte (D'AMICO et al. 2004, 2005).

Considerando os fatores prognósticos utilizados na prática clínica, estima-se que 80% dos casos de CaP rastreados apresentam risco de progressão, havendo indicação terapêutica. Porém, esses dados entram em contradição com os estudos que demonstraram a alta prevalência de tumores latentes os quais nunca se manifestaram (DELONGCHAMPS et al. 2006). De fato, estima-se que, atualmente, 37 pacientes necessitam ser tratados para evitar uma MoCa (SCHRÖDER et al. 2012). Por isso, uma série de marcadores moleculares com potencial prognóstico são alvos de pesquisas a fim de tornarem mais precisa a estratificação dos pacientes, e para diferenciarem aqueles que realmente necessitam de tratamento.

1.2 MARCADORES MOLECULARES DE PROGNÓSTICO E DE SUSCEPTIBILIDADE

A interação de uma neoplasia com seu microambiente influencia a expressão de diferentes genes, nos variados componentes celulares que formam esse complexo. Por sua vez, os produtos codificados por esses genes controlam muitas das características celulares determinantes do

prognóstico, tais como, proliferação, crescimento, invasão e metástase. A partir do entendimento deste sistema podem-se identificar marcadores com potencial de prever o comportamento de uma determinada neoplasia.

O PCA3 (*prostate cancer gene*) tem sido considerado um promissor marcador molecular. O mRNA não codificante PCA3 tem alta expressão em tecido tumoral e baixa em tecido normal prostático (BUSSEMAKERS et al. 1999). A superexpressão deste mRNA está associada com volume tumoral e escore de Gleason (NAKANISHI et al. 2008), sendo sugerido como um fator prognóstico desfavorável. Outro possível marcador molecular, uma translocação cromossômica a qual resulta numa fusão de dois genes (TMPRSS2 e ERG) tem sido encontrada em aproximadamente 50% dos casos em tumores de próstata (PERNER et al. 2006). Há evidências demonstrando que os casos positivos para esse tipo de fusão possuem características morfológicas e clínicas que as tornariam um subgrupo distinto (KUMAR-SINHA et al. 2008), com maior taxa de recidiva (NAM et al. 2007).

Alterações nas sequências de determinados genes têm sido correlacionadas com a susceptibilidade ao câncer de próstata. Há relatos de modificações nos genes HPC1, HPC2, HPCX, HPC20, CAPB, PCAP (HSING e CHOKKALINGAM 2006) estarem associados à predisposição a este câncer. Além disso, alterações gênicas que inativam a proteína PDE11A (R202C, Y658C, e E840K) foram recentemente associadas à predisposição ao CaP, sendo a frequência destas modificações significativamente maior em pacientes portadores da neoplasia do que em indivíduos saudáveis.

Alterações em outros genes de susceptibilidade estão envolvidas com um maior risco de desenvolvimento de tumores malignos, tais como BRCA1 (GILLANDERS et al. 2004) e BRCA2 (TULINIUS et al. 1992). Estes genes foram inicialmente descrito nas formas familiares de câncer de mama e ovário (agressivo e de idade precoce).

O papel do *BRCA2* no CaP começou a ser estudado a partir da observação de que, nas famílias rastreadas para a mutação, os parentes do sexo masculino apresentavam aumento na incidência de câncer prostático. Antes mesmo da clonagem do *BRCA2*, em 1995, era conhecida uma co-agregação familiar entre essas neoplasias. Já em 1974, THIESSEN reportou aumento do risco de CaP em familiares de pacientes portadores do câncer de mama. Em 1992 ANDERSON e BADZIOCH publicaram que familiares masculinos de primeiro grau de homens afetados pela neoplasia da mama apresentavam risco quatro vezes maior de desenvolverem CaP em relação à população em geral. TULINIUS et al. (1992) estudaram a incidência de câncer em 29.725 familiares de 947 pacientes acometidos pela neoplasia mamária, encontrando um risco relativo para o CaP de 1,5 para todos os parentes, 1,4 para parentes de primeiro, 1,3 para parentes de segundo grau.

Em 1996, JOHANNESDOTTIR et al. encontraram que 2,7% dos casos de CaP na Islândia eram portadores de mutação germinativa no éxon 9 do *BRCA2*. Posteriormente, demais trabalhos demonstraram que a presença de mutações germinativas nesse gene aumenta a suscetibilidade ao CaP (STRUEWING et al 1997; SIGURDSSON et al. 1997; Breast Cancer Linkage Consortium 1999; TULINIUS et al. 2002). O grupo colaborativo

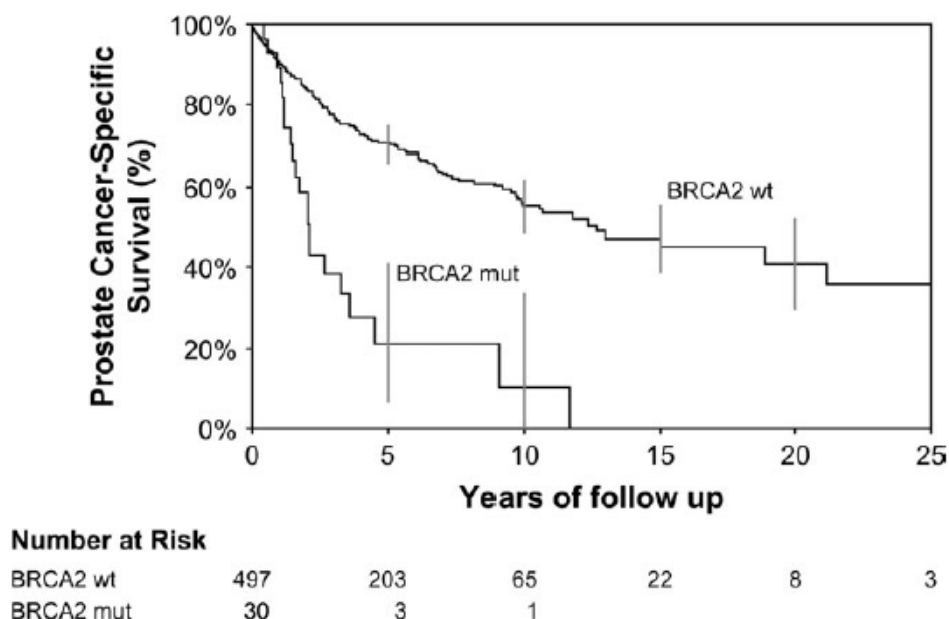
Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC), reunindo 20 centros europeus e norte-americanos, analisou a incidência de câncer em 3.047 indivíduos portadores de mutação, rastreados por serem familiares de pacientes com tumores de mama ou ovário. Usando como referência a taxa de incidência da população estudada, foi demonstrado um risco relativo (RR) para o CaP de 4,65 (IC 95% 3,48 a 6,22). Considerando os indivíduos com idade menor que 65 anos, o RR foi de 7,33 (IC 95% 4,66 a 11,52) (Breast Cancer Linkage Consortium 1999). Já nesse trabalho, foi levantada a hipótese de que os tumores nos indivíduos com o *BCRA2* mutado teriam uma história natural diferente dos demais. Além do aparecimento em idade mais precoce, observaram uma maior proporção de neoplasias detectadas clinicamente em relação à população em geral, onde grande parte é diagnosticada a partir do rastreamento. Esse fato poderia ser oriundo de uma maior agressividade biológica, resultando num crescimento tumoral mais acelerado. TULINIUS et al. (2002) estudaram o éxon 9 de probandos portadores de câncer de mama pertencentes a 887 famílias. Em 90 probandos foi encontrada mutação. Em relação aos controles negativos, nas famílias dos portadores, o RR para o CaP foi de 4,79 (IC 95% 3,27 a 6,32) para parentes de primeiro grau e 2,21 (IC 95% 1,57 a 3,02) para parentes de segundo, não sendo significativo para parentes de terceiro grau (RR 0,92 IC 95% 0,49 a 3,12). EDWARDS et al. (2003) sequenciaram toda a região codificadora do *BCRA2* em pacientes com CaP e idade inferior a 55 anos, sem levar em consideração a história familiar. Foram incluídos 263 casos com idades entre 32 a 55 anos (média de 51 anos). Encontraram mutações germinativas em seis indivíduos,

representando 2,3% da amostra selecionada. Ao comparar com a frequência dessas alterações do *BRCA2* na população inglesa, os autores concluíram que mutação nesse gene pode explicar uma porção significativa do CaP em idade precoce fora do contexto familiar.

Conjuntamente, esses achados levaram a suspeita de que a mutação do *BRCA2* pudesse estar associada, além do aumento da suscetibilidade, a uma piora no prognóstico, tendo em vista que dariam origem a tumores clinicamente relevantes e em idade precoce. Nesse sentido, HUBERT et al. (1999) reportaram um EG acima de 8 em 3 casos de CaP portadores de mutação, em comparação com EG de 6 nos demais casos, além de ter uma média de PSA mais elevada em relação aos não portadores.

No entanto, o conhecimento de que mutação germinativa no *BRCA2* representa um importante fator prognóstico desfavorável foi demonstrado de maneira mais consistente no ano de 2007 em estudo Islandês (TRYGGVADÓTTIR et al. 2007). Tal trabalho estudou a frequência de uma mutação germinativa locada no éxon 9 do gene (999del5) em pacientes portadores de adenocarcinoma prostático que possuíam história familiar para câncer de mama. Em seguida, comparou a evolução dos casos positivos em relação aos controles negativos. Já havia sido demonstrada por outros autores que o efeito dessa alteração é uma prematura interrupção da tradução da proteína, inibindo totalmente sua expressão (MIKAELSDOTTIR et al. 2004). Foram sequenciados 527 pacientes, sendo encontrada a alteração em 30 (5,69%). Ao comparar os grupos, mostrou-se que, nos casos positivos, a média da idade ao diagnóstico foi menor (69 *versus* 74

anos $p = 0,002$), o grau de indiferenciação tumoral maior (84% Gleason ≥ 7 versus 52,7% $p = 0,007$) e a sobrevida global menor (2,1anos IC = 1,4 a 3,6 anos versus 12,4 anos IC = 9,9 a 19,7) (Figura 2).



Fonte: TRYGGVADÓTTIR et al. (2007)

Figura 2 - Gráfico demonstrando a sobrevida câncer específica nos pacientes portadores da mutação no *BRCA2* em relação aos controles.

Em 2008, MITRA et al. estudaram o efeito que mutação germinativa nesse gene pode exercer no fenótipo do CaP. Eles compararam o EG de 20 casos (16 pacientes Ingleses portadores de mutações no *BRCA2*, 4 portadores de mutação no *BRCA1*) e 20 controles, pareados por idade, PSA e estágio clínico. Os casos tiveram significativamente um número maior de EG 8, 9 e 10 em relação aos controles ($p = 0,012$). Essa diferença se manteve ao analisar os 16 pacientes com mutação no *BRCA2* ($p = 0,016$).

EDWARDS et al. (2010) avaliaram a evolução de 21 pacientes portadores de mutação germinativa, comparando com controles. Nos pacientes portadores, a SG mediana foi de 4,8 anos *versus* 8,5 anos dos controles ($p_{\text{Log Rank}} = 0,002$). Em análise multivariada mutação germinativa influenciou independente a SG (HR 7,54 –IC95% 2,11 a 26,98; $p=0,002$).

A pesar do valor prognóstico de mutação germinativa do *BRCA2* não ter sido testado em estudos prospectivos, a magnitude desses achados, em diferentes grupos, com diferentes abordagens, reforçam o indicativo. Porém, estudos dos mecanismos pelos quais a mutação pudesse interferir na história natural do CaP ainda são escassos na literatura.

As funções do gene *BRCA2* ainda não são completamente conhecidas, não obstante muitas delas estarem sendo descobertas. Basicamente, ele atua no reparo do DNA através da recombinação homóloga, no remodelamento da cromatina e na regulação do ciclo celular pelo *checkpoint* (NAROD e FOULKES 2004). Quando ocorre uma dupla quebra ambos *BRCA1* e *BRCA2* interagem com a proteína RAD51 promovendo o correto reparo das fitas. Sabe-se que o *BRCA2* interage diretamente com a proteína RAD51, sendo que essa interação é responsável pela ativação-desativação dessa proteína em momentos propícios (SCULLY e LIVINGSTON 2000). Células contendo *BRCA1* e *BRCA2* mutados apresentam hipersensibilidade a quebras no DNA, uma vez que o reparo não ocorre de maneira correta. Parece haver relação direta entre o *BRCA1* e complexos multiméricos, tal como o complexo SW1-SNF, e o sistema “BASC”. O sistema BASC (sigla inglesa *BRCA Associated Surveillance*

Control) é um complexo protéico que se liga à porção central do *BRCA1* e possui funções relacionadas à manutenção da integridade do DNA, dentre elas o remodelamento da cromatina. Ambos, *BRCA1* e *BRCA2*, estão dentre algumas das proteínas chaves da regulação do ciclo celular, principalmente pela regulação do *checkpoint*. Células com o *checkpoint* intacto sofrem apoptose na presença de instabilidade genômica (NAROD e FOULKES 2004). Dessa forma, células com os genes mutantes possuem DNA altamente instável às agressões do meio. Tal instabilidade tem sido implicada como uma etapa importante no processo carcinogênico. Recentemente tem sido descoberto que, além dessas funções, o *BRCA2* regula componentes protéicos que impedem células tumorais de migrarem do tecido original, reduzindo o potencial invasivo tumoral. Tal efeito seria principalmente na regulação da matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) (MORO et al. 2008).

3 JUSTIFICATIVA

Considerando-se o contexto inicialmente exposto, da necessidade de estratificar com maior acurácia o prognóstico dos pacientes e tendo em vista que mutação germinativa no éxon 9 do *BRCA2* teve impacto negativo, surge um possível candidato a marcador de prognóstico a ser avaliado. No entanto, não há relatos na literatura que tenham avaliado mutação do gene nos tumores esporádicos de CaP, a fim de testá-lo como marcador prognóstico. Por isso, questiona-se qual seria a frequência de mutação do éxon 9 do *BRCA2* em tumores esporádicos de CaP e qual seria seu impacto como fator prognóstico nesse contexto.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a prevalência da mutação no éxon 9 do gene *BCRA2*, nos tumores de pacientes com adenocarcinoma prostático não metastáticos submetidos à prostatectomia radical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a associação das variáveis pré-tratamento em relação aos achados anatomopatológicos da peça cirúrgica.
2. Estimar a influência nas taxas de sobrevida (global, livre de recidiva bioquímica e livre de recidiva clínica) dos dados clínicos e da estratificação de risco pré-tratamento, bem como da classificação de risco pós-tratamento e dos achados anatomopatológicos.
3. Comparar entre o grupo de pacientes portadores de mutação no *BRCA2* e o grupo de pacientes ausentes da mutação, fatores prognósticos, subgrupo de risco para falha bioquímica, recidiva bioquímica, recidiva clínica e sobrevida (global, livre de recidiva bioquímica, livre de recidiva clínica).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Estudaram-se de forma retrospectiva os prontuários e as peças operatórias de pacientes submetidos à prostatectomia radical (PR) no Hospital A.C. Camargo com o diagnóstico de adenocarcinoma prostático não metastático. Para atingir a amostra necessária o banco de dados foi formado por 329 pacientes, de acordo com os critérios estabelecidos, submetidos à PR de 14/03/1994 a 10/10/2008. Após a seleção dos pacientes e estudo dos prontuários para levantamento das variáveis (vide item 4.6), foi realizada, por patologista experiente, revisão do material anatomopatológico para confirmação da histologia e do EG.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos pacientes com EG do exame anatomopatológico da peça cirúrgica (EAP) maior ou igual a 7 ou PSA_{pré} maior ou igual a 10 ou estágio patológico tumoral maior ou igual a T2b.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes cujos prontuários continham nenhum dos dados referentes aos critérios de inclusão. Também foram excluídos pacientes cujo material biológico não permitiu o seqüenciamento adequado do éxon 9 do *BRCA2*.

4.4 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Não há relatos de estudos que avaliaram o status do gene *BRCA2* em tumores de pacientes portadores do CaP, bem como não se encontra dados referentes à mutação do *BCRA2* em pacientes com CaP em nosso meio. Por isso, fundamentou-se em trabalhos que avaliaram mutação germinativa, cujas frequências variaram de 2,3 a 5,69% (EDWARDS et al. 2003; MITRA et al. 2008). Segundo TRYGGVADÓTTIR et al. (2007) a frequência de mutação na sua amostra foi de 5,69%, sendo que 84% dos portadores da mutação encaixam-se nos grupos de intermediário a alto risco. Portanto, caso exista alteração nesse éxon na população avaliada, e caso ela influencie da mesma maneira a agressividade biológica, ao excluírem-se pacientes de baixo risco, espera-se uma frequência mais próxima dos 5%. Assim, do banco de dados estruturado, seqüenciou-se inicialmente uma amostra de 263 pacientes, número suficiente para avaliar se mutações nesse éxon são relevantes em nosso meio e se possuem valor prognóstico.

4.5 AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO NO ÉXON 9 DO GENE *BRCA2*

A análise genética iniciou com a extração de DNA do material biológico referente aos tumores dos pacientes estudados a partir dos blocos de parafina ou de amostras congeladas. A seguir foi amplificado o éxon 9 do gene *BRCA2* através da reação da cadeia de polimerase (PCR) e por fim sequenciado o éxon 9.

4.5.1 Extração do DNA

Para cada amostra emblocadas em parafina foi obtido um corte de 5µm, o tecido foi corado com hematoxilina-eosina (HE) para confirmação do diagnóstico e detecção da região tumoral. Para extração do DNA, foram realizados quatro cortes com 5µm e para os casos onde o tumor estava presente em menos de 70% da amostra foi realizada uma microdissecção com bisturi. Para isso, os cortes foram colocados nas lâminas e com auxílio da lâmina corada HE, a área tumoral foi separada com bisturi e colocada em tubo de 2ml. Esses cortes foram desparafinizados com 1ml de xilol e em seguida acrescentado um tampão com Proteinase K por 18 horas. Para as amostras congeladas utilizou-se o procedimento do banco de macromoléculas, em que somente são utilizadas amostras com mais de 70% do tecido desejado, no caso tecido tumoral.

4.5.2 Sequenciamento Direto

A reação de PCR para amplificar o éxon 9 do gene *BRCA2* (NM_000059.3) foi realizada nas seguintes condições: 0,4 uM cada iniciador (*primer*), 0,2 mM de cada dNTP, 2,25 mM MgCl₂, 1U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e 150 ng de DNA para um volume final de reação de 20 ul. As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial de 2 min. a 94°C; 40 ciclos de 30 segundos (s) a 94°C, 30 s a 57°C, e 45 s a 72°C; e a fase final de alongação de 5 min. a 72°C. Os *primers* foram desenhados nas regiões flangeadoras do éxon 9 e geraram um fragmento de aproximadamente 300 bp.

Os produtos da amplificação foram tratados com 3U de Exonuclease I e 1U de *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) (USB/GE) antes do sequenciamento.

O DNA tratado e purificado foi sequenciado utilizando um dos *primers* da reação de PCR e ABI *Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit*, seguindo as instruções do fabricante. As reações foram sequenciadas na plataforma ABI 3130xl *Genetic Analyzer*.

Todas as sequências geradas foram analisadas pelo software CLC *Main Workbench* (CLC Bio) alinhadas com a sequência referência (NM_000059.3).

4.5.3 Análise do Sequenciamento Obtido

Na Figura 3 observa-se um o cromatograma referente a uma sequencia selvagem (normal).

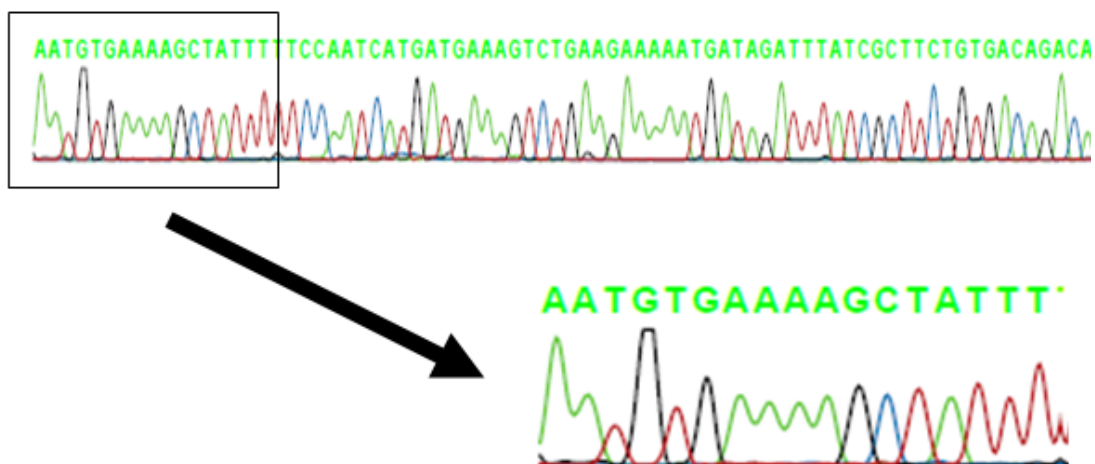


Figura 3 - Exemplo de um fragmento do éxon 9 sequenciado e em maior amento um pequeno fragmento.

Cada elevação (pico) no cromatograma representa uma base nitrogenada. Ele é considerado selvagem, pois cada base corresponde exatamente à sequência referência, e porque não há outro pico além do selvagem na mesma posição. É possível observar que não há ruídos no cromatograma, ou seja, a linha de base é praticamente uma reta, não havendo outras elevações interferindo a leitura da sequência selvagem. Isso demonstra uma alta qualidade do sequenciamento. Mutações germinativas, ou mutações presentes em apenas algumas células tumorais, geram um pico adicional no cromatograma, junto da base nitrogenada selvagem. Demais alterações podem ser evidenciadas quando nota-se uma não correspondência da sequência obtida em relação à padrão. Todas as alterações encontradas que resultariam em mudança de aminoácido foram repetidas. Para tal, foi realizada nova reação de PCR seguida de novo sequenciamento.

4.6 VARIÁVEIS

As variáveis encontram-se listadas abaixo e foram levantadas pelos prontuários no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico do Hospital A.C. Camargo (SAME).

- ✓ Status do éxon 9 do gene *BRCA2*.
- ✓ Idade ao diagnóstico.
- ✓ História familiar de CaP.
- ✓ PSA pré-tratamento.
- ✓ Estádio TNM clínico e patológico (5ª edição AJCC, 1997).
 - **Tx** Tumor primário não pode ser acessado.
 - **T1** (exclusivo do estadiamento clínico, tumor inaparente, não palpável no TR nem visível em exames de imagem).
 - **T1a** Achado histológico incidental em <5% do tecido ressecado.
 - **T1b** Achado histológico incidental em ≥5% do tecido ressecado.
 - **T1c** Tumor identificado pela biópsia.
 - **T2** (confinado ao órgão).
 - **T2b** Unilateral.
 - **T2c** Bilateral.
 - **T3** (extensão extra-prostática).
 - **T3a** Extensão extra-prostática.
 - **T3b** Invasão de vesícula seminal.

- **T4** Invasão de estruturas adjacentes além das vesículas: bexiga, reto, esfíncter externo, musculatura pélvica.
 - **Nx** Linfonodos regionais não podem ser acessados.
 - **N0** Ausência de metástases em linfonodos regionais.
 - **N1** Metástases em um ou mais linfonodos regionais.
 - **Mx** Metástases à distância não podem ser acessadas.
 - **M0** Ausência de metástase à distância.
 - **M1** Presença de metástase à distância.
- ✓ Escore de Gleason na biópsia.
 - ✓ Porcentagem dos fragmentos biopsiados comprometidos por neoplasia.
 - ✓ Grupo de risco pré-tratamento baseado no PSA pré, no EG da biópsia e no cT, de acordo com D'AMICO et al. (1998):
 - Risco baixo: EG menor ou igual a 6, PSA menor ou igual a 10ng/ml e cT menor ou igual T2a.
 - Risco Intermediário: EG igual a 7 ou PSA maior que 10 a maior ou igual a 20 ng/ml ou estágio T2b.
 - Risco Alto: EG maior ou igual a 8 ou PSA maior que 20 ou estágio maior ou igual T2c.
 - ✓ Escore de Gleason no espécime cirúrgico.
 - ✓ Grupo de risco pós-tratamento baseado no PSA pré, no EG do EAP e no pT, seguindo os mesmos critérios de estratificação utilizados na estratificação pré-tratamento.

- ✓ Invasão capsular, envolvimento das vesículas seminais, *status* das margens, invasão vaso-linfática, invasão perineural no espécime cirúrgico pela análise anatomopatológica.
- ✓ Recidiva bioquímica pós prostatectomia radical, sendo considerada como PSA > 0,2ng/ml.
- ✓ Recidiva clínica, sendo considerada quando detectada metástase sistêmica, nódulo ou massa em loja prostática, linfadenomegalia pélvica e/ou abdominal, confirmadas por exames de imagem (Tomografia Computadorizada, Cintilografia Óssea, Ressonância Magnética, Ultrassonografia ou Radiografia). Confirmação histológica desses achados para diagnóstico apenas quando não houver correlação clínico-radiológica.
- ✓ Sobrevida global.
- ✓ Sobrevida livre de recidiva bioquímica.
- ✓ Sobrevida livre de recidiva clínica.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis qualitativas foram descritas quanto às suas frequências absolutas (n) e relativas (%), e as quantitativas quanto às medidas de tendência central, dispersão e variabilidade. Foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson (χ^2) para avaliar a presença de associação entre variáveis qualitativas. Foi aplicado o método de Kaplan-Meier para avaliar o efeito das variáveis de interesse nas curvas de sobrevida. O teste de Log

Rank foi empregado para comparar as curvas de sobrevida das categorias de cada uma das variáveis. Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($p = 5\%$), sendo que valores iguais ou inferiores foram considerados significantes. O software usado para a análise estatística foi o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 16.0[®].

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICA DOS PACIENTES

5.1.1 Dados Clínicos Pré-Tratamento

A amostra foi composta de 329 pacientes submetidos à PR de 14/03/1994 a 10/10/2008, tendo um seguimento mediano de 58 meses (média de 62 meses). A média de idade foi de 62 anos e a mediana de 63, sendo que 65 pacientes (19,8%) tinham histórico familiar de CaP. A maioria dos pacientes tinha como estágio clínico T1c 128 (38,91%), EG da biópsia 6 em 123 (37,38%), e a média do PSA pré-operatório foi de 13,89 ng/ml. Analisou-se a estratificação do risco de falha bioquímica pré-tratamento sendo 96 casos (29,18%) classificados como risco baixo, 107 (32,52%) risco intermediário, 80 (24,32%) risco alto. Os dados clínicos estão contidos na Tabela 1.

Tumores clinicamente detectáveis, em relação aos identificados apenas nas biópsias ($\leq T1c$ X $\geq T2a$), relacionaram-se com aumento da recidiva clínica ($p = 0,011$), com invasão tumoral das vesículas seminais no EAP ($p = 0,030$) e com o acometimento patológico linfonodal ($p = 0,016$). Porém, essa estratificação não se associou com recidiva bioquímica ($p = 0,327$), com a invasão capsular ($p = 0,178$), nem com o volume tumoral ($p = 0,228$). Não houve associação do estágio clínico com o estágio patológico ao estratificarmos ambos em T2 x T3 ($p = 0,266$) (tabela 2).

O aumento da porcentagem dos fragmentos positivos relacionou-se de maneira significativa, com maior recidiva bioquímica ($p = 0,009$) e clínica ($p = 0,018$). Além disso, esteve associado aos principais fatores patológicos tais como pT ($p = 0,001$), invasão capsular ($p = 0,004$), invasão das vesículas seminais ($p = 0,004$), estágio patológico linfonodal ($p = 0,040$) e volume tumoral ($p < 0,01$) (tabela 3).

Nenhum dos fatores pré-operatórios teve associação significativa com a sobrevida global (SG), sendo que a estratificação pré-tratamento do risco teve significância marginal ($p = 0,052$). Relacionaram-se significativamente à SLRB, os níveis de PSA ($p < 0,001$), a porcentagem dos fragmentos positivos na biópsia ($p=0,010$), o EG da biópsia ($p = 0,018$) e a estratificação do risco baseados nos fatores pré-tratamento ($p < 0,001$). O cT não teve relação com a SLRB ($p = 0,391$), nem quando sub-estratificado em $\leq cT1c$ X $\geq cT2a$ ($p = 0,250$). À exceção do PSApré, os demais fatores associaram-se significativamente à SLRC. Pormenores da análise univariada estão contidos na Tabela 5.

Tabela 1 - Distribuição das variáveis pré-tratamento.

Variável	Categoria	n	%
Escore de Gleason na biópsia	2 a 6	174	52,89
	7	79	24,01
	8 a 10	32	9,73
	Dado não disponível	44	13,37
Estádio T clínico	T1a	4	1,22
	T1b	3	0,91
	T1c	128	38,91
	T2a	103	31,31
	T2b	29	8,81
	T3	5	1,52
	Tx	57	17,33
Porcentagem de fragmentos positivos na biópsia	≤ 34	103	31,31
	> 34 e ≤ 50.0	60	18,24
	> 50	55	16,72
	Dado não disponível	111	33,74
PSA pré-operatório (ng/ml)	≥ 10	187	56,84
	10 a 20	88	26,75
	> 20	50	15,20
	Dado não disponível	4	1,22
	Média	13,89	
	Mediana	8,7	
Risco pré-tratamento de falha bioquímica	Baixo	96	29,18
	Intermediário	107	32,52
	Alto	80	24,32
	Dado não disponível	46	13,98

Tabela 2 - Estadiamento clínico tumoral e associações

		≤T1c	%	≥T2	%	$P_{pearson}$
		135	100	137	100	
Recidiva Clínica	Sim	6	4,44	18	13,14	0,011
	Não	129	95,56	119	86,86	
Recidiva Bioquímica	Sim	59	43,70	68	49,64	0,327
	Não	76	56,30	69	50,36	
Volume tumoral	<15%	69	51,11	80	58,39	0,228
	≥15%	66	48,89	57	41,61	
pN	N1	4	2,96	14	10,22	0,016
	N0	131	97,04	123	89,78	
Invasão Capsula	Sim	79	58,52	91	66,42	0,178
	Não	56	41,48	46	33,58	
Invasão Vesículas	Sim (n)	79	58,52	91	66,42	0,03
	Não	56	41,48	46	33,58	
		≤T2	%	≥T3	%	
		267		5		
pT	≤pT2	120	44,94	1	20,00	0,266
	≥pT3	147	55,06	4	80,00	

Tabela 3 - Porcentagem dos fragmentos biopsiados positivos e associações.

		Porcentagem dos fragmentos biopsiados positivos						$P_{pearson}$
		≤ 34	%	$>34 \leq 50$	%	>50	%	
		103		60		55		
Recidiva Clínica	Sim	5	4,85	5	8,33	8	14,55	0,018
	Não	98	95,15	55	91,67	47	85,45	
Recidiva Bioquímica	Sim	36	34,95	34	56,67	30	54,55	0,009
	Não	67	65,05	26	43,33	25	45,45	
Volume Tumoral	$<15\%$	72	69,90	29	48,33	21	38,18	$< 0,01$
	≥ 15	31	30,10	31	51,67	34	61,82	
pN	N1	4	3,88	4	6,67	7	12,73	0,04
	N0	99	96,12	56	93,33	48	87,27	
Invasão Capsula	Sim	56	54,37	41	68,33	43	78,18	0,004
	Não	47	45,63	19	31,67	12	21,82	
Invasão Vesículas	Sim	7	6,80	15	25,00	12	21,82	0,004
	Não	96	93,20	45	75,00	43	78,18	
pT	pT2	60	58,25	29	48,33	22	40,00	0,001
	$\geq pT3$	43	41,75	31	51,67	33	60,00	

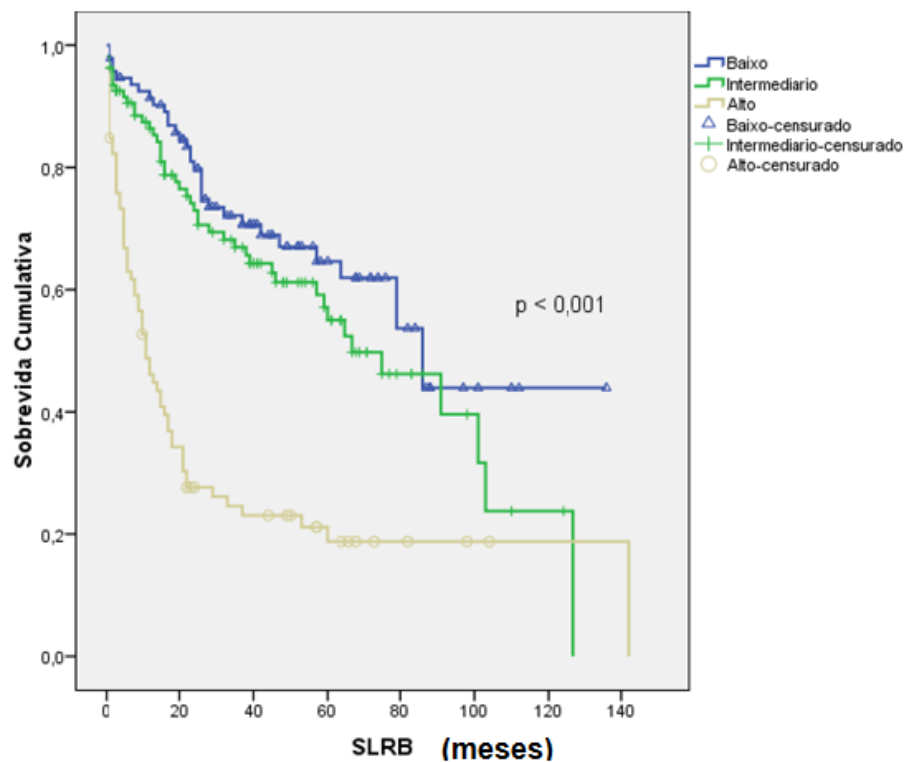


Figura 4 - Curva de Kaplan Meier para a SLRB segundo o risco pré-tratamento ($p < 0,001$ teste do Log-Rank)

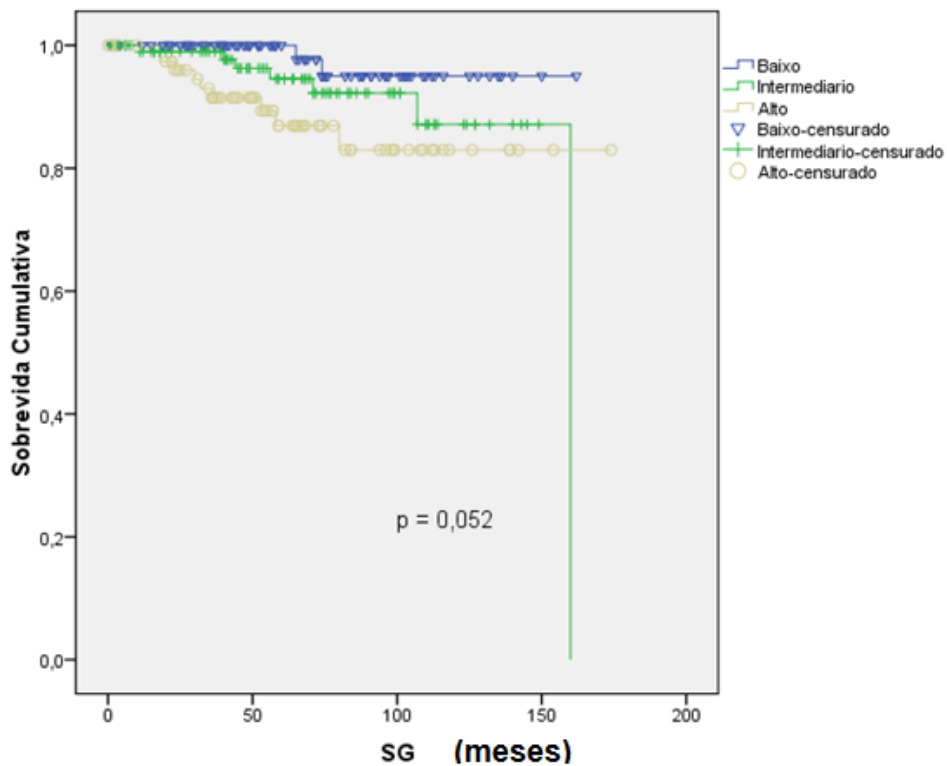


Figura 5 - Curva de Kaplan Meier para a SG segundo o risco pré-tratamento ($p = 0,052$ teste do Log-Rank)

5.1.2 Dados do Exame Anatomopatológico da Peça Cirúrgica

Dados histopatológicos da peça cirúrgica encontram-se pormenorizados na Tabela 4. O EG mais frequente foi o valor de 7, encontrado em 220 pacientes (66,87%). Houve concordância do EG da peça cirúrgica em relação ao EG da biópsia, em 83 casos (29,12% dos 285 EG das biópsias disponíveis no prontuário). Em 188 casos (65,97%) o EG da biópsia foi subestimado em comparação à peça cirúrgica e em 14 casos (4,91%) o EG da biópsia foi superestimado.

Tumor sem extravasar os limites da próstata (pT2) foi detectado em 151 pacientes (45,89%), extensão extraprostática (pT3a) em 98 (29,78%) e invadindo as vesículas seminais (pT3b) em 63 (19,14%). Em 126 pacientes (38,30%) as margens foram positivas. Comparando-se esses dados com o estágio clínico do tamanho tumoral, em 267 casos inicialmente foi estimado que a neoplasia estivesse confinada à próstata. Em 147 (59,51%) destes, o exame anatomopatológico demonstrou estágio maior ou igual a T3a.

Utilizando os dados do EAP e o PSA, 116 (35,25%) pacientes pertenceram ao grupo de risco intermediário de recidiva bioquímica, enquanto que 213 (64,74%) do grupo de alto risco.

Dos 96 pacientes classificados pelos fatores pré-tratamento como risco baixo, 51 (53,12%) passaram ao grupo de risco intermediário e 45 (46,87%) ao grupo de risco alto utilizando-se a classificação baseada nos dados do EAP. Desses 96 casos, o EG da biópsia foi subestimado em relação ao EG da peça em 95. No único paciente em que houve concordância no EG, o estágio clínico estimava tumor localizado, sem

extravasaram os limites da próstata, porém no exame histológico da peça havia extensão extraprostática. Dos 107 pacientes inicialmente classificados como risco intermediário, 64 (59,81%) passaram ao grupo de alto risco de acordo com os fatores pós-operatórios. Desses, em 37 casos o EG da biópsia foi subestimado, em 27 casos houve concordância nos EG, porém havia extravasamento tumoral dos limites prostáticos no anatomopatológico não estimado no estágio clínico.

No teste de Log-Rank, relacionaram-se significativamente com a SG: o grupo de risco pós-tratamento ($p = 0,003$), o Estádio patológico tumoral (pT) ($p = 0,003$), o EG do espécime cirúrgico ($p = 0,014$), e as margens ($p = 0,032$). Todas essas variáveis associaram-se com SLRB e SLRC (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição das variáveis patológicas da peça cirúrgica

Variável	Categoria	n	%
Escore Gleason na peça cirúrgica	6	38	11,55
	7	220	66,87
	8	47	14,29
	9	23	6,99
	10	1	0,30
Estádio patológico tumoral (pT)	pT2a	23	6,99
	pT2b	128	38,91
	pT3a	98	29,79
	pT3b	63	19,15
	pT4	17	5,17
Invasão vaso-linfática	Sim	88	26,75
	Não	241	73,25
Invasão capsular	Ausente	120	36,48
	Focal	147	44,68
	Extensa	62	18,84
Invasão perineural	Ausente	61	18,54
	Focal	254	77,20
	Extensa	14	4,26
Margem	Positivas	126	38,30
	Negativas	203	61,70
Linfonodo	Positivos	24	7,29
	Negativos	305	92,71
Risco pos-tratamento*	Intermediário	116	35,26
	Alto	213	64,74

Legenda: * Risco pos-tratamento = estratificação do risco de falha bioquímica usando o EG do EAP, o PSA e o pT.

Tabela 5 - Análise das variáveis em relação à percentagem de SG, SLRB e SLRC em cinco anos.

Variável	Categoria	SG		SLRC		SLRB	
		Porcentagem em 5 anos	$p_{\log \text{ rank}}$	Porcentagem em 5 anos	$p_{\log \text{ rank}}$	Porcentagem em 5 anos	$p_{\log \text{ rank}}$
Geral	-	93,6	-	91,1	-	46,7	-
EG da biópsia	"2-6"	93,5		95,2		50,8	
	7	92,7	0,408	84,2	<0,001	49,9	0,018
	"8-10"	88,4		66,8		34,2	
PSApré	≤10	96,1		94,3		60,1	
	10-20	91,8	0,551	89,7	0,088	40,5	<0,001
	>20	86,7		82,8		10,8	
cT ¹	≤T1c	95,1	0,18	98,3	0,006	56,2	0,25
	>T2c	91,8		84,9		45,6	
%frag. Positivos ²	≤34%	96,0		95,3		62,2	
	34-50	94,6	0,938	92,8	0,025	39,1	0,01
	>50%	95,9		82,5		38,4	
Risco pré-tratamento ³	Baixo	100		100		63,4	
	Intermediário	93,9	0,052	91,5	<0,001	55,0	<0,001
	Alto	86,5		80,6		18,8	
pT ⁴	T2	97,8	0,003	95,4	0,003	64,9	<0,001
	T3 e T4	89,4		86,8		31,9	
EG do EAP	6	100		96,8		34,3	
	7	94,3	0,014	94,0	0,008	53,9	<0,001
	8-10	91,6		74,6		31,2	
Margem	Positiva	89,6	0,032	86,8	0,037	30,2	<0,001
	Negativa	95,7		92,8		56,1	
Invasão da Capsula	Focal	90,0		88,3		38,4	
	Extensa	90,5	0,428	91,7	0,104	40,2	0,009
	Negativa	97,9		92,4		61,1	
Risco pós-tratamento ⁵	Intermediário	100	0,003	97,9	0,008	73,0	<0,001
	Alto	90,8		88,2		33,1	

Legenda: 1) cT=estádio clínico do tamanho tumoral; 2) %frag. Positivos= percentagem dos fragmentos biopsiados positivos; 3) Risco pré-tratamento= estratificação do risco de falha bioquímica usando o EG da biópsia, o cT e o PSApré; 4) pT = Estádio patológico tumoral; 5) Risco pos-tratamento = estratificação do risco de falha bioquímica usando o EG do EAP, o PSApré e o pT. Obs: O teste de Log Rank foi empregado para comparar as sobrevidas das categorias de cada uma das variáveis.

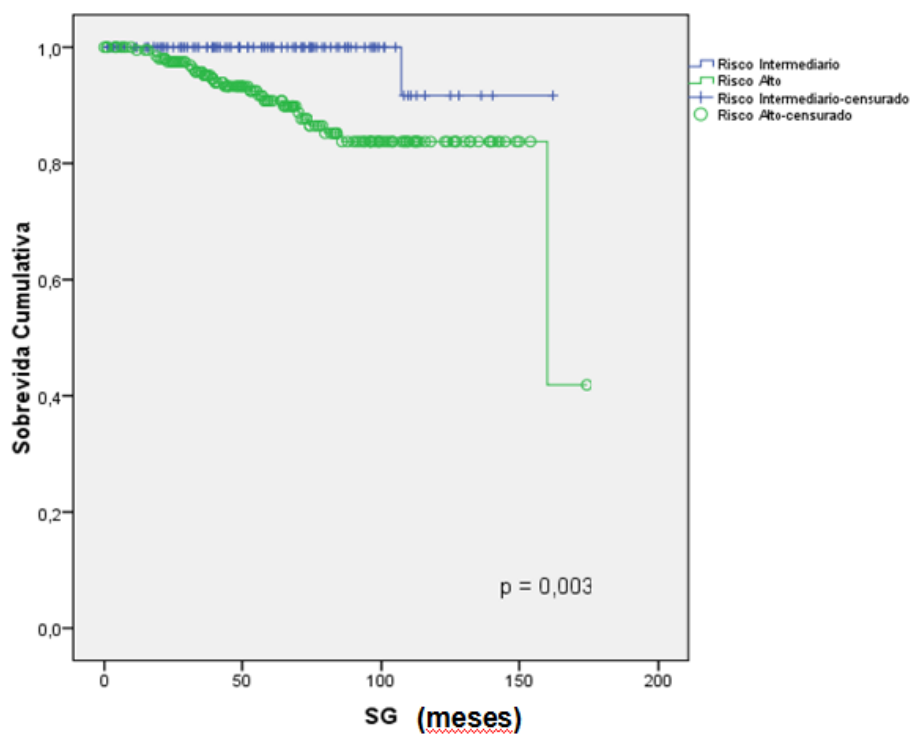


Figura 6 - Curva de Kaplan Meier da SG segundo o risco pós-tratamento ($p = 0,003$ pelo teste do Log-Rank)

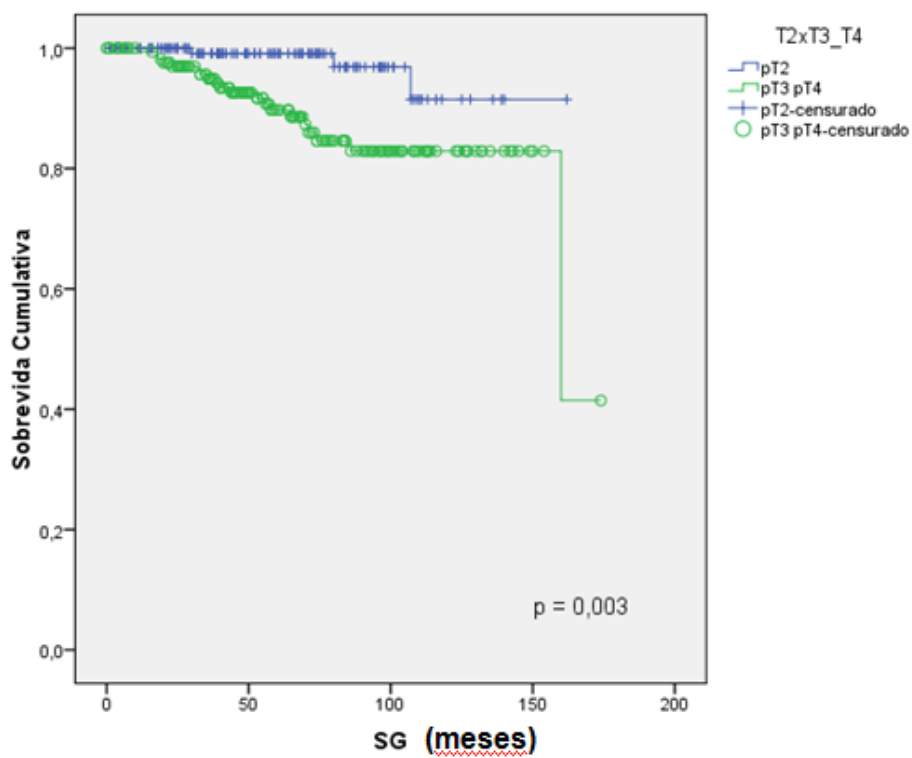


Figura 7 - Curva de Kaplan Meier da SG segundo o estágio patológico ($p = 0,003$ pelo teste do Log-Rank)

5.2 DESFECHOS CLÍNICOS

No período do seguimento, houve 165 recidivas bioquímicas de acordo com o critério estabelecido (PSA > 0,2ng/ml), totalizando 50,15% dos pacientes. Tratamento de resgate foi instituído em 148 pacientes (89,69% das recidivas bioquímicas). Em 78 pacientes (52,70% de 148) o tratamento utilizado foi a radioterapia. Destes, 43 fizeram uso de bloqueio androgênico conjuntamente. Sessenta e nove (46,62% de 148) pacientes com recidiva foram tratados com bloqueio androgênico exclusivo (23 bloqueio periférico, 33 bloqueio central, 13 bloqueio intermitente), e 1 paciente foi tratado com orquiectomia.

Em cinco anos, a SG foi de 93,6%, a SLRB de 46,7% e a SLRC 91,1%. As Figuras 9, 10 e 11 representam as respectivas curvas de sobrevidas.

Até a data do último seguimento, 208 pacientes (63,22%) encontravam-se vivos e sem evidência de doença, 67 (20,36%) vivos com recidiva bioquímica, 15 (4,55%) vivos com recidiva clínica. Houve 15 óbitos devido à doença (representando 4,55% dos pacientes), 8 óbitos por outras causas (representando 2,43% dos pacientes) e perda de seguimento em 16 pacientes (4,86%) que não foram excluídos das análises estatísticas.

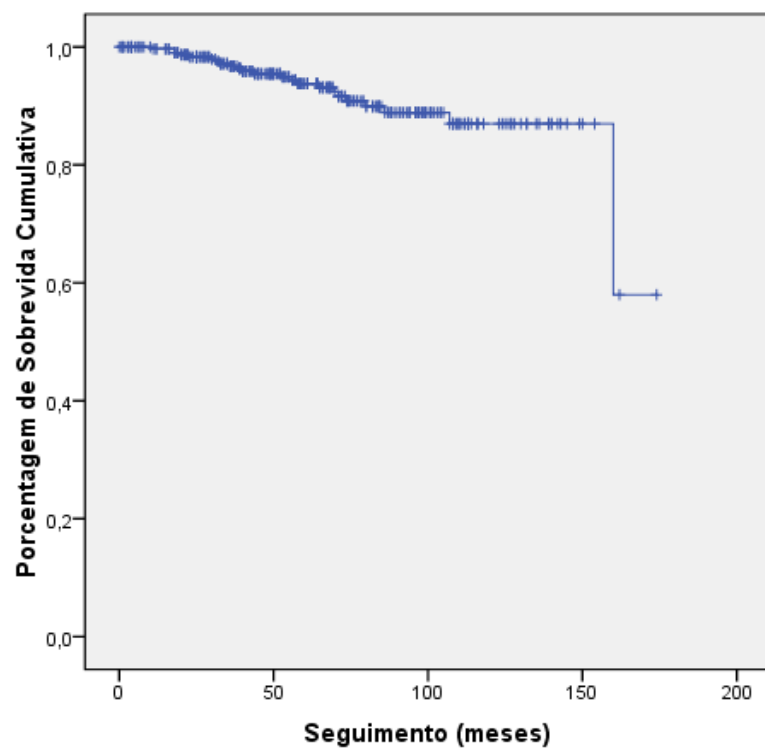


Figura 8 - Curva de Kaplan-Meier para a Curva de Sobrevida Global

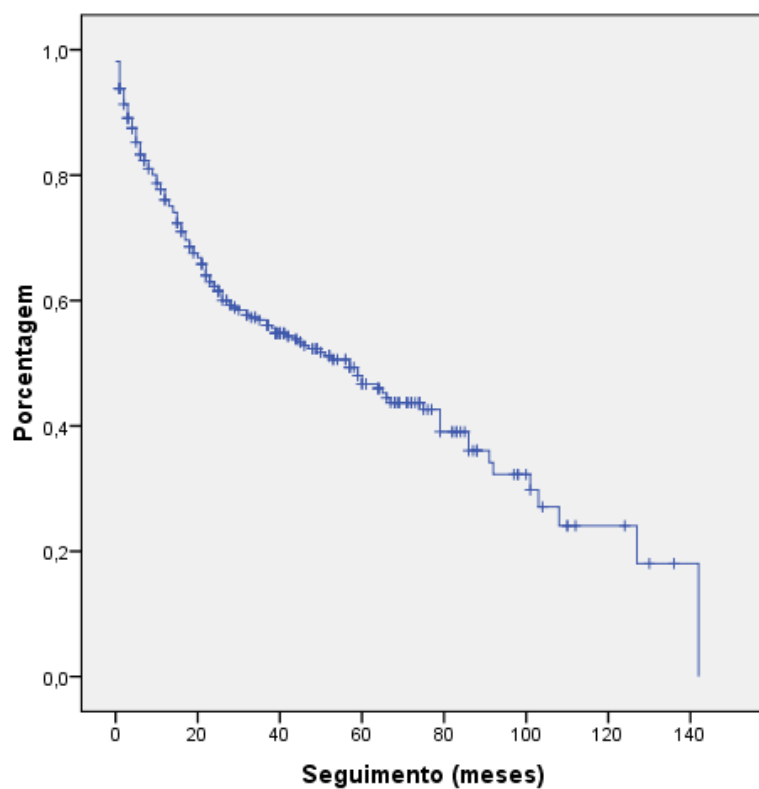


Figura 9 - Curva de Kaplan-Meier para a Sobrevida Livre de Recidiva Bioquímica.

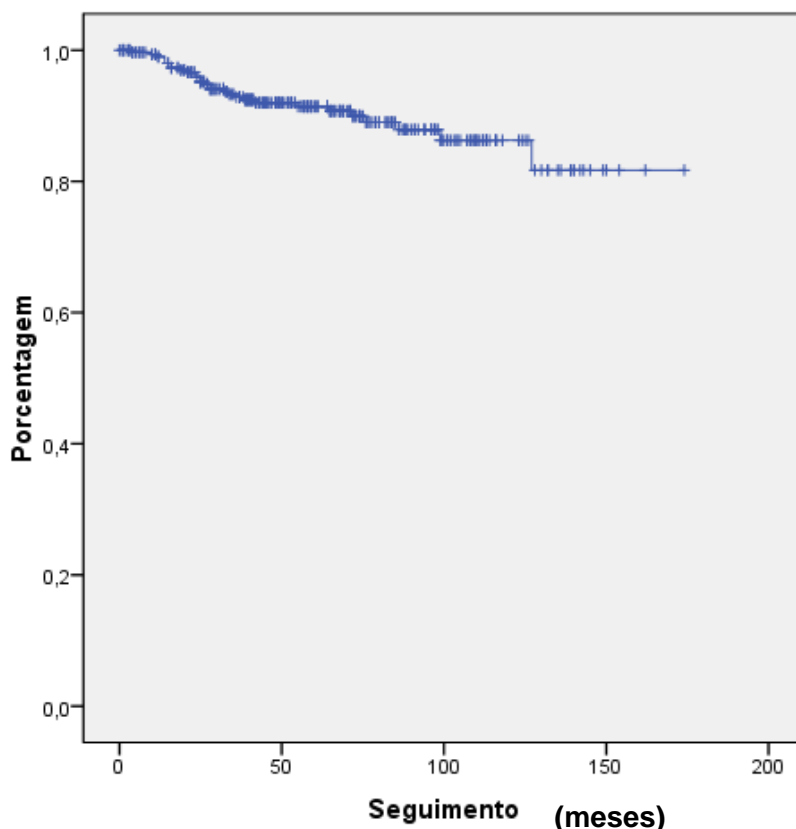


Figura 10 - Curva de Kaplan-Meier para a Sobrevida Livre de Recidiva Clínica

5.3 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO

Foi sequenciado um total de 263 pacientes, sendo 90 de tecido congelado e 173 de tecido fixado em formalina. Inicialmente, foram encontradas oito alterações no éxon 9, trocas de única base nitrogenada na cadeia do DNA. Dessas, todas ocorreram em tecidos fixados em formalina e apenas quatro resultariam em mudança do aminoácido da proteína final. Nesses casos, repetiu-se o sequenciamento para certificar-se de que as alterações encontradas não fossem resultado de artefatos. Há evidências

demonstrando que eles podem ser gerados devido à natureza do processo de fixação e ao tempo de armazenamento do tecido. Alguns trabalhos têm demonstrado que, em relação aos tecidos congelados, tecidos fixados apresentam uma maior frequência de simples trocas em bases nitrogenadas não reproduzíveis (SRINIVASAN et al. 2002). No processo de sequenciamento, na etapa da reação de PCR, a enzima polimerase pode falhar em reconhecer alguns sítios de citosina nos tecidos fixados, podendo gerar falsas alterações C-T ou G-A (WILLIAMS et al. 1999). Dos casos alterados, novas reações de PCR foram realizadas utilizando enzimas com diferentes especificidades e sensibilidades. Os sequenciamentos obtidos foram comparados e pôde-se observar que as alterações encontradas primariamente foram realmente artefatos. Em todos os casos sequenciados novamente não se encontrou alterações no DNA, havendo concordância da normalidade em mais de duas reações de sequenciamento. Portanto, depois de sequenciados 263 casos, não foi encontrada nenhuma mutação no éxon 9.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou uma considerável discordância do EG da biópsia e do cT em estimarem, respectivamente, a diferenciação tumoral e a extensão da neoplasia quando analisadas no EAP do espécime cirúrgico.

No teste de Pearson, o cT esteve associado apenas à invasão das vesículas e ao estágio linfonodal, mas não houve correlação com o pT, com a invasão capsular, com o volume tumoral nem com a recidiva bioquímica. Assim como não se relacionou com SG, nem com SLRB na análise univariada (Log Rank). Dos 267 casos nos quais o cT estimava tumor localizado dentro da próstata, o EAP demonstrou invasão das vesículas em 18,73% e extensão extraprostática em 29,96%. Esses achados são compatíveis com o estudo de REESE et al. (2010) que questionou a real utilidade do estágio clínico e demonstrou não haver associação dele com recidiva bioquímica nem com sobrevida.

Em relação ao EG, observou-se que em apenas 29,12% dos casos houve concordância nos escores da biópsia em relação à peça cirúrgica. Os dados da literatura reportam uma concordância que varia de 40 a 60%, de acordo com o número de biópsias realizadas. DIVRIK et al. (2007) demonstraram 56,31% de concordância em biópsias com mais de 10 fragmentos e 40,86% em biópsias sextantes. ISARIYAWONGSE et al. (2008) observaram discordância em 55,8% dos casos. BOSTWICK (1994), e

KING et al. (2004) demonstraram 45% e 62% de concordância respectivamente. Na amostra analisada, há de se pesar as seguintes considerações. Não foi possível realizar a revisão de lâminas do material biopsiado, apenas do EAP. Nos casos anteriores a 2001, 32,6% dos EG tinham valores de 2 a 5. Após 2001, apenas 7,2% dos casos tinham escore menor ou igual a 5. Caso também fosse possível a revisão do EG da biópsia, possivelmente obter-se-ia alteração desses escores baixos, resultando numa maior taxa de acerto. BOSTWICK (1994) demonstrou que as maiores taxas de erro nas biópsias estão nos escores de 2 a 4. Nos casos analisados mais contemporâneos, observa-se um aumento na concordância, sendo de 34,67% após 2004, quando 58,67% tiveram o EG subestimado, comparado com 65,97% de toda a amostra e 78,26% analisando os casos anteriores a 2001. Pesa também o fato de que muitas biópsias foram feitas fora de centros oncológicos especializados, fato também reportado na literatura como sendo fator de discordância, conforme demonstrado por KUROIWA et al. (2010).

A estratificação em grupos de risco pré-tratamento foi capaz de prever SLRB e SLRC, não estando associada com a SG. No entanto, após análise pormenorizada das curvas de sobrevivência, foram comparados, dois a dois, cada um dos grupos. Em relação à SLRB, não houve diferença significativa entre o grupo baixo e o intermediário ($p_{\log \text{rank}} = 0,171$).

A porcentagem dos fragmentos, por sua vez, demonstrou ser capaz de prever o estágio patológico (pT) associando-se aos principais achados patológicos de mau prognóstico (invasão capsular, invasão das vesículas e

volume tumoral). Ademais, correlacionou-se com a recidiva bioquímica e clínica. Por isso, foram reclassificados os grupos de risco adicionando esse fator. Além dos usados por D'AMICO et al. (2003), foram excluídos do grupo de baixo risco pacientes com mais de 34% de fragmentos positivos, incluídos casos com mais 50% dos fragmentos positivos como alto risco, e os pacientes com 34 a 50% pertenceram ao grupo intermediário (desde que respeitassem os demais critérios). Ao realizar a análise univariada, observou-se relação significativa com SLRB ($p < 0,001$), mas não com SG. Ao contrario da estratificação sem esse fator, quando comparando o risco baixo e o intermediário, obteve-se significância estatística ($p_{\log \text{ rank}} = 0,025$) em relação à SLRB.

O fato de não ter sido encontrada nenhuma alteração no éxon 9 do gene *BRCA2* nos tumores dos 263 casos sequenciados demonstra a baixa frequência de mutação. O presente trabalho diferencia-se dos demais na literatura, por ter estudado esse gene sem levar em consideração a história familiar e por ter avaliado a mutação nos tumores. Salienta-se, porém, que 19,8% da amostra tinha história familiar positiva para CaP, mas apenas 1,5% desses fecham os critérios para agregação familiar (dois parentes de primeiro grau ou um de primeiro e dois de segundo), conforme STANFORD e OSTRANDER (2001). Dos trabalhos pesquisados na literatura, apenas EDWARDS et al. (2003, 2010) estudaram mutação do *BRCA2* fora do contexto familiar. Dos seis pacientes no quais foram detectadas mutação apenas um tinha história familiar de CaP em EDWARDS et al. (2003).

Analisando as características dos pacientes portadores de mutação nos trabalhos citados, observa-se uma idade precoce ao diagnóstico e tumores indiferenciados. Conforme TRYGGVADÓTTIR et al. (2007), a média de idade ao diagnóstico nos portadores foi de 69 anos, e 84% dos pacientes tinham EG maior ou igual a 7. Já no estudo de MITRA et al. (2008) 85% dos portadores tinham EG maior ou igual a 8, e a média de idade foi de 52,5 anos. EDWARDS et al. (2003) estimaram que o risco absoluto da CaP em portadores é de 1,3% aos 55 anos e de 10% aos 65 anos. Na presente amostra, 19,2% dos pacientes tinham idade inferior aos 55 anos, 57,9% inferior aos 65 anos, a média foi de 62 anos e apenas 11,6% dos pacientes tinham EG de 6 na peça cirúrgica.

O fato de ter-se estudado a mutação nos tumores, não exclui a possibilidade de encontrar mutação germinativa. Porém, em um tumor, caso ocorra uma deleção da porção alterada, encontrar-se-ia um resultado falsamente normal, uma vez que a reação de PCR amplificaria apenas o alelo restante, e a sequência final não teria alterações. No entanto, nos tumores, o que mais frequentemente ocorre é a perda do alelo normal, fenômeno conhecido como perda da heterozigose. Esse fenômeno tem sido descrito como um dos primeiros passos da carcinogênese nos pacientes portadores de mutação germinativa em genes supressores tumorais como o *BRCA2*. Poucos trabalhos, e com número limitado de pacientes, avaliaram a perda de heterozigose nos tumores de pacientes com CaP e portadores de mutação germinativa no *BRCA2*. Em cinco pacientes, EDWARDS et al. (2010) encontrou perda do alelo nativo em três pacientes e do mutante em

um. WILLEMS et al. (2008) observaram perda de heterozigose em 71% de 14 casos avaliados. Em apenas cinco, foi possível realizar o sequenciamento genético para identificar o alelo restante, sendo detectada apenas a perda do nativo. De sete casos, GUDMUNDSSON et al. (1995) detectou perda do alelo nativo em seis, o caso restante não tinha perda de nenhum dos alelos.

7 CONCLUSÕES

- 1 Não foi encontrada mutação no éxon 9 do *BRCA2*, não sendo possíveis correlações prognósticas, provavelmente ela não tem relevância no CaP esporádico.
- 2 O estágio clínico do tamanho tumoral e o EG da biópsia demonstraram baixa acurácia em predizer o estágio patológico e o EG da peça cirúrgica. A porcentagem dos fragmentos positivos na biópsia demonstrou ser mais acurada que o cT em estimar a extensão anatômica da neoplasia.
- 3 A estratificação de risco pré-tratamento correlacionou-se com SLRB, SLRC, mas não com SG. Ela não foi capaz de diferenciar os grupos baixo e intermediário em relação à SLRB. A porcentagem dos fragmentos positivos na biópsia pode ser usada para refinar a classificação do risco, tendo sua maior utilidade na melhor separação entre os grupos de intermediário e baixo risco quanto à SLRB. O grupo de risco pós-tratamento, o Estádio patológico tumoral, o EG do espécime cirúrgico, e as margens estiveram associados à SG à SLRB e à SLRC.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Breast Cancer Linkage Consortium] Cancer risks in *BRCA2* mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1310-6.

Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H. Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. **J Urol** 2004; 171: 2122-7.

Afnan J, Tempany CM. Update on prostate imaging. **Urol Clin North Am** 2010; 37:23-5.

Albertsen PC, Fryback DG, Storer BE, et al. Long-term survival among men with conservatively treated localized prostate cancer. **JAMA** 1995; 274:626-31.

Albertsen PC, Hanley JA, Harlan LC, et al. The positive yield of imaging studies in the evaluation of men with newly diagnosed prostate cancer: a population based analysis. **J Urol** 2000; 163:1138-43.

Anderson DE, Badzioch MD. Breast cancer risks in relatives of male breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 1992; 84:1114-7.

Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, PLCO Project Team. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. **N Engl J Med**. 2009; 360:1310-9.

Andriole GL, Bostwick DG, Brawley OW, et al. Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer. **N Engl J Med** 2010; 362:1192-202.

Bostwick DG. Gleason grading of prostatic needle biopsies. Correlation with grade in 316 matched prostatectomies. **Am J Surg Pathol** 1994; 18:796-803.

Bostwick DG, Shan A, Qian J, et al. Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with matched foci of prostate carcinoma. **Cancer** 1998; 83:1995-2002.

Bueschen AJ, Lockhart ME. Evolution of urological imaging. **Int J Urol** 2011; 18 :102-12.

Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. **Cancer Res** 1999; 59:5975-9.

[CDC] Center for Diseases Cancer and Prevention. **1999-2007 cancer incidence and mortality data.** Available from:<UR:http>//www.cdc.gov/uscs> [2011 fev 12]

Canby-Hagino E, Hernandez J, Brand TC, et al. Looking back at PCPT: looking forward to new paradigms in prostate cancer screening and prevention. **Eur Urol** 2007; 51:27-33.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. **N Engl J Med** 1991; 324:1156-61. Erratum in: **N Engl J Med** 1991; 325:1324.

Chodak GW, Keller P, Schoenberg HW. Assessment of screening for prostate cancer using the digital rectal examination. **J Urol** 1989; 141:1136-8.

Chute CG, Panser LA, Girman CJ, et al. The prevalence of prostatism: a population-based survey of urinary symptoms. **J Urol** 1993; 150:85-9.

Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:61-8.

Coley CM, Barry MJ, Fleming C, et al. Early detection of prostate cancer. Part I: Prior probability and effectiveness of tests. The American College of Physicians. **Ann Intern Med** 1997; 126:394-406.

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. **JAMA** 1998; 280:969-74.

D'Amico AV, Schultz D, Silver B, et al. The clinical utility of the percent of positive prostate biopsies in predicting biochemical outcome following external-beam radiation therapy for patients with clinically localized prostate cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2001; 49:679-84.

D'Amico AV, Moul J, Carroll PR, Sun L, Lubeck D, Chen MH. Cancer-specific mortality after surgery or radiation for patients with clinically localized prostate cancer managed during the prostate-specific antigen era. **J Clin Oncol** 2003; 21:2163-72.

D'Amico AV, Chen MH, Roehl KA, Catalona WJ. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. **N Engl J Med** 2004; 351:125-35.

D'Amico AV, Renshaw AA, Sussman B, Chen MH. Pretreatment PSA velocity and risk of death from prostate cancer following external beam radiation therapy. **JAMA** 2005; 294:440-7.

Delongchamps NB, Singh A, Haas GP. The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. **Cancer Control** 2006; 13:158-68.

Divrik RT, Eroglu A, Sahin A, et al. Increasing the number of biopsies increases the concordance of Gleason scores of needle biopsies and prostatectomy specimens. **Urol Oncol** 2007; 25:376-82.

Djulgovic M, Beyth RJ, Neuberger MM, et al. Screening for prostate cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ** 2010; 341:c4543.

Edwards SM, Kote-Jarai Z, Meitz J, et al. Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1-12.

Edwards SM, Evans DG, Hope Q et al. Prostate cancer in BRCA2 germline mutation carriers is associated with poorer prognosis. **Br J Cancer** 2010; 103:918-24.

Efstathiou JA, Chen MH, Renshaw AA, et al. Influence of body mass index on prostate-specific antigen failure after androgen suppression and radiation therapy for localized prostate cancer. **Cancer** 2007; 109:1493-8.

Epstein JI. An update of the Gleason grading system. **J Urol** 2010; 183:433-40.

Ferdowsian HR, Barnard ND. The role of diet in breast and prostate cancer survival. **Ethn Dis** 2007; 17(2 Suppl 2):S2-18-22.

Flanigan RC, McKay TC, Olson M, et al. Limited efficacy of preoperative computed tomographic scanning for the evaluation of lymph node metastasis in patients before radical prostatectomy. **Urology** 1996; 48:428-32.

Forman JD, Lee WR, Roach M 3rd, et al. Staging evaluation for patients with adenocarcinoma of the prostate. American College of Radiology. ACR Appropriateness Criteria. **Radiology** 2000; 215 Suppl:1373-82.

Freedland SJ, Sun L, Kane CJ, et al. Obesity and oncological outcome after radical prostatectomy: impact of prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: results from the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital and Duke Prostate Center databases. **BJU Int** 2008; 102:969-74.

Gillanders EM, Xu J, Chang BL, et al. Combined genome-wide scan for prostate cancer susceptibility genes. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:1240-7.

Gleason DF, Mellinger GT. The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. **J Urol** 1974; 111:58-64.

Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. **Hum Pathol** 1992; 23:273-9.

Gong Z, Agalliu I, Lin DW, et al: Obesity is associated with increased risks of prostate cancer metastasis and death after initial cancer diagnosis in middleaged men. **Cancer** 2007; 109:1192-202.

Gudmundsson J, Johannesdottir G, Bergthorsson JT, et al. Different tumor types from BRCA2 carriers show wild-type chromosome deletions on 13q12-q13. **Cancer Res** 1995; 55:4830-2.

Hoffman RM, Gilliland FD, Eley JW, et al. Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:388-95.

Hsing AW, Chua S Jr, Gao YT, et al. Prostate cancer risk and serum levels of insulin and leptin: a population-based study. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:783-9.

Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. **Front Biosci** 2006; 11:1388-413.

Hubert A, Peretz T, Manor O, et al. The Jewish Ashkenazi founder mutations in the BRCA1/BRCA2 genes are not found at an increased frequency in Ashkenazi patients with prostate cancer. **Am J Hum Genet** 1999; 65:921-4.

Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Mod Pathol** 2004; 17:292-306.

Inman BA, Davies JD, Rangel LJ, et al. Long-term outcomes of radical prostatectomy with multimodal adjuvant therapy in men with a preoperative serum prostate-specific antigen level \geq 50 ng/mL. **Cancer** 2008; 113:1544-51.

Isariyawongse BK, Sun L, Bañez LL, et al. Significant discrepancies between diagnostic and pathologic Gleason sums in prostate cancer: the predictive role of age and prostate-specific antigen. **Urology** 2008; 72:882-6.

Johannesdottir G, Gudmundsson J, Bergthorsson JT, et al. High prevalence of the 999del5 mutation in icelandic breast and ovarian cancer patients. **Cancer Res** 1996; 56:3663-5.

Joniau S, Van Poppel H. Localized prostate cancer: can we better define who is at risk of unfavourable outcome? **BJU Int** 2008; 101 Suppl 2:5-10.

Kaul LL, Martinez AA, Stromberg JS, et al. The role of diet in prostate cancer. **Nutr Cancer** 1987; 9:123-8.

Kavanaugh CJ, Trumbo PR, Ellwood KC. The U.S. food and drug administration's evidence-based review for qualified health claims: tomatoes, lycopene, and cancer. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:1074-85.

King CR, McNeal JE, Gill H, et al. Extended prostate biopsy scheme improves reliability of Gleason grading: implications for radiotherapy patients. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 59:386-91.

Kirsh VA, Peters U, Mayne ST, et al. Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:1200-9.

Kulkarni GS, Lockwood G, Evans A, et al. Clinical predictors of Gleason score upgrading: implications for patients considering watchful waiting, active surveillance, or brachytherapy. **Cancer** 2007; 109:2432-8.

Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:497-511.

Kuroiwa K, Shiraishi T, Ogawa O, et al. Discrepancy between local and central pathological review of radical prostatectomy specimens. **J Urol** 2010; 183:952-7.

Lagiou P, Signorello LB, Trichopoulos D, Tzonou A, Trichopoulou A, Mantzoros CS. Leptin in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Int J Cancer** 1998; 76:25-8.

Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. **N Engl J Med** 2000; 343:78-85.

Llaverias G, Danilo C, Wang Y, et al. A western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. **Am J Pathol** 2010; 177:3180-91.

Master VA, Chi T, Simko JP, et al. The independent impact of extended pattern biopsy on prostate cancer stage migration. **J Urol** 2005; 174:1789-93.

Meeks JJ, Loeb S, Helfand BT, et al. Characteristics of prostate cancers detected at prostate specific antigen levels less than 2.5 ng/ml. **J Urol** 2009; 181:2515-8.

Mellinger GT, Gleason D, Bailar. III J. The histology and prognosis of prostatic cancer. **J Urol** 1967; 97:331-337.

Mikaelsdottir EK, Valgeirsdottir S, Eyfjord JE, et al. The Icelandic founder mutation BRCA2 999del5: analysis of expression. **Breast Cancer Res** 2004; 6:284-90.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Mitra A, Fisher C, Foster CS, et al. Prostate cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype. **Br J Cancer** 2008; 98:502-7.

Moro L, Arbini AA, Yao JL, Loss of BRCA2 promotes prostate cancer cell invasion through up-regulation of matrix metalloproteinase-9. **Cancer Sci** 2008; 99:553-63.

Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. **J Urol** 2008; 179:1804–9.

Nam RK, Sugar L, Yang W, et al. Expression of the TMPRSS2: ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. **Br J Cancer** 2007; 97:1690-5.

Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:665-76.

Noguchi M, Stamey TA, Neal JE, et al. An analysis of 148 consecutive transition zone cancers: clinical and histological characteristics. **J Urol** 2000; 163:1751-5.

Partin AW, Yoo J, Carter HB, et al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. **J Urol** 1993; 150:110-4.

Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, et al. TMPRSS2: ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. **Cancer Res** 2006; 66:8337-41.

Pierorazio PM, Ferrucci L, Kettermann A, et al. Serum testosterone is associated with aggressive prostate cancer in older men: results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. **BJU Int** 2010; 105:824-9.

Reese AC, Cooperberg MR, Carroll PR. Minimal impact of clinical stage on prostate cancer prognosis among contemporary patients with clinically localized disease. **J Urol** 2010; 184:114-9.

Rifkin MD, Zerhouni EA, Gatsonis CA, et al. Comparison of magnetic resonance imaging and ultrasonography in staging early prostate cancer: results of a multi-institutional cooperative trial. **N Engl J Med** 1990; 323:621-6.

Roach M 3RD, Lu J, Pilepich MV, et al. Predicting long-term survival, and the need for hormonal therapy: a meta-analysis of RTOG prostate cancer trials. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2000; 47:617-27. Erratum in: **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2000; 48:313.

Roach M 3rd, Weinberg V, McLaughlin PW, Grossfeld G, Sandler HM. Serum prostate-specific antigen and survival after external beam radiotherapy for carcinoma of the prostate. **Urology** 2003; 61:730-5.

Roddam AW, Allen NE, Appleby P, et al. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100:170-83.

Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. ERSPC Investigators. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. **N Engl J Med** 2012; 366:981-90.

Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. **Nature** 2000; 408:429-32.

Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, et al. Cancers of the prostate and breast among Japanese and immigrants in Los Angeles County. **Cancer** 1991; 63:963-66.

Shibley WU, Thames HD, Sandler HM, et al. Radiation therapy for clinically localized prostate cancer: a multi-institutional pooled analysis. **JAMA** 1999; 28:1598-604.

Sigurdsson S, Thorlacius S, Tomasson J, et al. BRCA2 mutation in Icelandic prostate cancer patients. **J Mol Med** 1997; 75:758-61.

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effects of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. **Am J Pathol** 2002; 162:1961-71.

Stanford JL, Ostrander EA. Familial prostate cancer. **Epidemiol Rev** 2001; 23:19-23.

Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, et al. Family history and the risk of prostate cancer. **Prostate** 1990; 17:337-47.

Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. **N Engl J Med** 1997; 336:1401-8.

Thiessen EU. Concerning a familial association between breast cancer and both prostatic and uterine malignancies. **Cancer** 1974; 34:1102-7.

Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. **N Engl J Med** 2003; 349:215–24.

Tryggvadóttir L, Vidarsdóttir L, Thorgeirsson T, et al. Prostate cancer progression and survival in BRCA2 mutation carriers. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:929-35.

Tulinius H, Egilsson V, Olafsdóttir GH, et al. Risk of prostate, ovarian, and endometrial cancer among relatives of women with breast cancer. **BMJ** 1992; 10:855-7.

Tulinius H, Olafsdottir GH, Sigvaldason H, et al. The effect of a single BRCA2 mutation on cancer in Iceland. **J Med Genet** 2002; 39:457-62.

Villers A, McNeal JE, Redwine EA, et al. The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma. **J Urol** 1989; 142:763-8.

Willems AJ, Dawson SJ, Samaratunga H, et al. Loss of heterozygosity at the BRCA2 locus detected by multiplex ligation-dependent probe amplification is common in prostate cancers from men with a germline BRCA2 mutation. **Clin Cancer Res** 2008; 14:2953-61.

Williams C, Poten F, Moberg C, et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. **Am J Pathol** 1999; 155:1467-71.

Wise AM, Stamey TA, McNeal JE, et al. Morphologic and clinical significance of multifocal prostate cancers in radical prostatectomy specimens. **Urology** 2002; 60:264-9.

Woolf CM. An investigation of the familial aspects of carcinoma of the prostate. **Cancer** 1960; 13:739-44.

Yan L, Spitznagel EL. Meta-analysis of soy food and risk of prostate cancer in men. **Int J Cancer** 2005; 117:667-9.