

**EXPRESSÃO DE iNOS, COX-2, GLUT1, E  
NITROTIROSINA COMO BIOMARCADORES  
PREDITIVOS DA EVOLUÇÃO DO ADENOCARCINOMA  
PROSTÁTICO EM PACIENTES COM MARGENS  
POSITIVAS PÓS-PROSTATECTOMIA RADICAL**

**RICARDO LEO ROBERTO FELTS DE LA ROCA**

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

**Orientador: Dr. Francisco Paulo da Fonseca**

**Co-Orientadora: Dra Isabela Werneck da Cunha**

**São Paulo**

**2013**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

De La Roca, Ricardo Leo Roberto Felts

**Expressão de iNOS, COX-2, GLUT1, e Nitrotirosina como biomarcadores preditivos da evolução do adenocarcinoma prostático em pacientes com margens positivas pós-prostatectomia radical** / Ricardo Leo Roberto Felts de la Roca - São Paulo, 2013.

141p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Francisco Paulo da Fonseca

Descritores: 1.PROSTATECTOMIA. 2. PROGNÓSTICO 3. PRÓSTATA 4. ADENOCARCINOMA. 5. MARCADORES BIOLÓGICOS.

## **AGRADECIMENTOS**

Prof. Dr. Ademar Lopes pelo seu apoio e incentivo constantes, possibilitando a realização deste estudo no Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center.

Dr. Gustavo Cardoso Guimarães pela oportunidade de realizar este estudo no Serviço de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center.

Dr. Francisco Paulo da Fonseca, meu orientador, por ceder acesso ao seu vasto banco de dados, pela sua orientação e apoio em todas as horas, pelas correções e orientações fundamentais na elaboração desta Tese, pela amizade demonstrada, pelo carinho de sempre, meu mais sincero agradecimento.

Dra. Isabela Werneck da Cunha, co-orientadora, cuja participação foi fundamental na interpretação dos achados anatomopatológicos, na avaliação dos resultados imunoistoquímicos dos biomarcadores estudados, na revisão desta tese, pelo seu apoio e dedicação, minha gratidão.

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por permitir a realização dos estudos anatomopatológicos e imunoistoquímicos desta Tese no Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center e por ter me aceito no programa de pós-graduação sob sua coordenação.

Dra. Stephania Martins Bezerra, pelo seu empenho, dedicação e revisão dos dados anatomopatológicos e imunoistoquímicos, e na interpretação destes, pelo constante incentivo, meu sincero agradecimento.

Dr. Stênio de Cássio Zequi, meu agradecimento pela sua participação na Banca de Qualificação, na qual através das revisões, me orientou com importantes contribuições na realização deste estudo, além do seu constante incentivo, apoio e amizade.

Prof. Dra. Katia Ramos Moreira Leite, meu sincero reconhecimento pela sua participação na Banca de Qualificação, onde através de suas observações e orientações, teve importância ímpar na elaboração desta tese.

Prof. Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira e a Srta. Aline Damascena, pelo inestimável apoio na confecção e interpretação das análises estatísticas.

Às incansáveis secretárias(os) da Pós-Graduação *Stricto Senso* do A.C.Camargo Cancer Center, Sra. Ana Maria Kunimari, Srta. Vanuza Barros Rodrigues, Srta. Luciana Costa, e Sr. Reinaldo Spessato Carolino, pela dedicação, gentileza e profissionalismo demonstrados nestes anos.

Sra. Suely Francisco, bibliotecária chefe da Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, pelo seu apoio na correção gramatical e padronização desta tese, como também na revisão da literatura médica referida.

Aos companheiros e amigos da equipe de Urologia, e a todos que compõe a Pós-Graduação do A.C.Camargo Cancer Center, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese, muito obrigado pelo carinho e estímulo.

Aos companheiros e amigos do Serviço de Urologia do Hospital São Luiz – Jabaquara e do Lithocenter, Ricardo Di Migueli; João Paulo da Cunha Lima; Ugo de Queiroz Barros, Cesar Thiago, pelo incentivo, apoio, e amizade dedicados nestes 21 anos juntos, meu muito obrigado.

Aos companheiros e amigos Silvio da Ressureição Pires, Armando Bosschaerts Neto, Gustavo Cuck, pelo incentivo, apoio e amizade, meu agradecimento.

A todos companheiros de Pós-Graduação do A.C.Camargo Cancer Center, onde juntos passamos estes últimos quatro anos trocando experiências, e sonhando com este momento, meu reconhecimento e gratidão.

A minha esposa Valéria, aos meus filhos Fernanda, Armando e Monica, genros José Lamartine Soares Sobrinho e Eduardo Contador Stipp, netos Maria Tereza e João Aguiar, pela alegria de poder tê-los ao meu lado em todas as horas me incentivando, apoiando, meu amor eterno.

Aos meus pais Juan Armando e Melitta, minha irmã Adriana, onde estiverem, saibam que os ensinamentos, a educação, e o amor que recebi, foram meus alicerces em todas as lutas e conquistas, a vocês dedico esta tese.

## RESUMO

de la Roca RLR. **Expressão de iNOS, COX-2, GLUT1, e Nitrotirosina como biomarcadores preditivos da evolução do adenocarcinoma prostático em pacientes com margens positivas pós-prostatectomia radical.** São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Apesar dos bem estabelecidos parâmetros clínicos, cirúrgicos e anatomopatológicos utilizados na atualidade para podermos prever a evolução para recidiva bioquímica do adenocarcinoma da próstata, após seu tratamento cirúrgico, sobretudo quando da presença de margens cirúrgicas positivas, análises imunoistoquímicas tem se revelado importantes ferramentas para apoiar a indicação de tratamentos adjuvantes precocemente ou não com base na expressão de determinados marcadores que sinalizam a agressividade do tumor. O iNOS (sintase do óxido nítrico induzível) sintetiza óxido nítrico (NO) que tem importante papel no crescimento tumoral e na angiogênese, como também influencia a citotoxicidade de macrófagos e a imunossupressão induzida pelo tumor, sendo um marcador muito encontrado em células do adenocarcinoma da próstata diferenciando este de tecido benigno. A COX-2 que tem produção estimulada pelo NO, também tem sido associada a diversas neoplasias por sua ação angiogênica e no processo da inflamação, sendo estudada como via alvo terapêutico. O GLUT1 é um ativo transportador de glicose expressado em tecidos normais e expresso em altos níveis em numerosos tumores, sendo um marcador intrínseco e mediador de hipóxia reduzindo a fosforilação oxidativa e agindo na via de sinalização oxigênio-dependente através do fator de hipóxia induzida (HIF-1). A Nitrotirosina é um produto da nitração da tirosina mediado por espécies reativas do nitrogênio, tais como o ânion peroxinitrito e o dióxido de nitrogênio, sendo detectado em condições patológicas como em neoplasias sendo considerado marcador de estresse oxidativo dependente de NO. Os objetivos deste trabalho foram avaliar as

expressões desses marcadores em espécimes cirúrgicos de próstatas com adenocarcinoma e avaliar suas relações com o prognóstico pós-prostatectomia radical em pacientes com margens cirúrgicas positivas, fator este considerado na literatura como significativo para recidiva bioquímica. Foram analisados retrospectivamente prontuários de 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata, submetidos à prostatectomia radical sendo que 110 casos apresentaram margens cirúrgicas positivas. Para comparação, analisamos outro grupo com 52 pacientes com margens cirúrgicas negativas. As lâminas e respectivos blocos histológicos foram revisadas, e através do método de micro arranjo de tecidos, avaliamos as expressões de iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina. Estas expressões foram correlacionadas com a sobrevida livre de recidiva bioquímica dos pacientes, num seguimento maior do que 2 anos, avaliando-se os resultados aos 5 e 10 anos no seguimento. A associação entre as variáveis clínicas ou das anatomopatológicas com a presença ou ausência de margens foi verificada com teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Utilizou-se o estimador de Kaplan-Meier na estimativa dos tempos para recidiva bioquímica, e sobrevida livre de doença. Para a comparação das curvas utilizou-se o teste não paramétrico de LogRank. O nível de significância adotado foi o de 5% e os cálculos, gráficos e testes foram construídos com o auxílio do software estatístico livre R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). A regressão logística múltipla foi empregada para a avaliação dos fatores preditivos para a recorrência bioquímica do CaP. O risco para recorrência foi estimado através do “*hazard ratio*” obtido do modelo de Cox. Este trabalho demonstra que escore de Gleason, o nível do PSA, o volume tumoral, o estágio patológico, a invasão capsular, e margens cirúrgicas positivas tiveram associação significativa com menores taxas de sobrevida livre de recidiva bioquímica ( $p < 0,001$ ). As imunoexpressões da iNOS, COX-2, GLUT1, e Nitrotirosina não apresentaram associação com recidiva bioquímica em pacientes com margens cirúrgicas positivas ( $p=0,3646$ ;  $p=0,1457$ ;  $p=0,4414$  e  $p=0,0806$ , respectivamente). A análise multivariada nos 110 pacientes com MCP evidenciou que volume tumoral quando maior que 30% do volume total

do espécime cirúrgico (RR 12,13; 95%CI = 4,208 – 34,965;  $p < 0,001$ ) e a presença de invasão capsular (RR 3,106; 95%CI = 1,249 - 7,277;  $p = 0,014$ ) foram fatores prognósticos independentes para ocorrência de recidiva bioquímica do CaP.



## SUMMARY

de la Roca RLR. **[Expression of iNOS, COX-2, GLUT1, and nitrotyrosina as predictive biomarkers from progression of prostatic adenocarcinoma in patients with positive surgical margins post-radical prostatectomy]**. São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

In spite of the well-established clinical, surgical and anatomopathological parameters currently used to allow us to predict the evolution to biochemical recurrence of adenocarcinoma of the prostate, after its surgical treatment, especially when in the presence of positive surgical margins, immunohistochemical tests have become very important tools to support the indication of adjuvant therapies, either precociously or not, based on the expression of certain markers that signalize the tumor's aggressiveness. The iNOS (inducible nitric oxide synthase) synthesizes nitric oxide (NO) which plays an important role in the tumor's growth and in the angiogenesis, affecting as well the macrophages cytotoxicity and the tumor-induced immunosuppression, being a marker very commonly found in prostate adenocarcinoma cells, thus differentiating this from a benign hyperplasia. The COX-2, which production is stimulated by the NO, has also been associated to various neoplasias due to its angiogenic action and to its influence on the inflammation process as well, being then studied as a therapeutic target via. The GLUT1 is an active glucose transporter expressed in normal tissues and expressed at high levels in numerous tumors, playing the role as intrinsic and mediator hypoxia marker, reducing oxidative phosphorylation and acting on the oxygen-dependent signaling via through hypoxia inducible factor (HIF-1). Nitrotyrosine is a product of tyrosine nitration mediated by reactive nitrogen species such as peroxynitrite anion and nitrogen dioxide, being detected in pathological conditions such as in neoplasias, thus being considered a marker of NO-dependent oxidative

stress. The objectives of this work were to evaluate the expressions of those markers in surgical specimens of prostates with adenocarcinoma, as well as to evaluate their relation with prognosis after radical prostatectomy in patients with positive surgical margins, factor which has been considered in the literature significant for biochemical recurrence. Medical records of 162 patients with prostatic adenocarcinoma who were submitted to radical prostatectomy were retrospectively checked and analyzed, out of which 110 cases presented positive surgical margins. For comparison purposes, we have also studied another group consisting of 52 patients with negative surgical margins. The microscope slides and corresponding histological blocks were revised, and by using the tissue microarray technique, we have appraised iNOS, COX-2, GLUT1 and Nitrotyrosine expressions. These expression values were associated with the patients' biochemical recurrence-free survival for a follow-up period larger than two years, with those results being reappraised after five and ten years of postoperative survival. The association between the clinical variables or the anatomopathological variables with the presence or absence of positive margins was checked using the chi-square test or the Fisher's exact test. The elapsed times for biochemical recurrence, and disease-free survival were assessed using Kaplan-Meier estimator. For graphics comparison the non-parametric LogRank test was used. The significance level assumed was 5% and calculations, graphics and tests were developed with the aid of the 'R Project for Statistical Computing' free software ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Multiple logistic regression analysis was used to assess the predictive factors for CaP biochemical recurrence. The risk for recurrence was estimated through the "hazard ratio" obtained from the Cox model. This work demonstrates that the Gleason score, the PSA level, the tumor volume, the pathological stage, the capsular invasion, and positive surgical margins showed to keep a significant association with lower biochemical recurrence-free survival rates ( $p < 0.001$ ). The iNOS, COX-2, GLUT1 and Nitrotyrosine immunoexpressions did not present association to biochemical recurrence in patients with positive surgical margins ( $p = 0.3646$ ;  $p = 0.1457$ ;  $p = 0.4414$  and  $p = 0.0806$ ,

respectively). The multivariate analysis in the 110 patients with positive surgical margins evidenced that the tumor volume when higher than 30% of total volume of the specimen (HR 12.13; 95%CI = 4.208 – 34.965;  $p < 0.001$ ) and the presence of capsular invasion (HR 3.106; 95%CI = 1.249 – 7.277;  $p = 0.014$ ) were independent prognosis factors for CaP biochemical recurrence.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Margem cirúrgica positiva sem tecido adiposo.....	23
<b>Figura 2</b>	Margens negativas.....	23
<b>Figura 3</b>	Mecanismos inflamatórios implicados com a carcinogênese, crescimento tumoral e progressão.....	53
<b>Figura 4</b>	Adenocarcinoma da próstata – Padrão celular Gleason 3.....	69
<b>Figura 5</b>	Adenocarcinoma da próstata – Padrão celular Gleason 4.....	69
<b>Figura 6</b>	Adenocarcinoma da próstata – Padrão celular Gleason 5.....	69
<b>Figura 7</b>	Expressão da iNOS.....	82
<b>Figura 8</b>	Expressão da COX-2.....	83
<b>Figura 9</b>	Expressão da GLUT1.....	84
<b>Figura 10</b>	Expressão de Nitrotirosina.....	85
<b>Figura 11</b>	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com as margens cirúrgicas em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.....	90
<b>Figura 12</b>	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com o volume tumoral em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.....	91

<b>Figura 13</b>	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com a invasão da cápsula prostática em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.....	92
<b>Figura 14</b>	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com o escore de Gleason em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.....	93
<b>Figura 15</b>	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com a dosagem plasmática do PSA em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.....	94
<b>Figura 16</b>	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com a expressão imunohistoquímica da Nitrotirosina em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.....	95
<b>Figura 17</b>	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com a invasão capsular em 110 pacientes com margens cirúrgicas positivas.....	101
<b>Figura 18</b>	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com o volume tumoral no espécime cirúrgico em 110 pacientes com margens cirúrgicas positivas.....	102
<b>Figura 19</b>	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de recorrência bioquímica de acordo com a expressão da iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina, em 110 pacientes com MCP.....	103

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Classificação TNM do CaP.....	6
<b>Quadro 2</b>	Classificações de riscos do CaP.....	10
<b>Quadro 3</b>	Anticorpos, clones, origens e diluições utilizadas.....	71
<b>Tabela 1</b>	Distribuição das margens cirúrgicas.....	75
<b>Tabela 2</b>	Distribuição das variáveis quantitativas de acordo com presença de MCP ou MCN (n=162).....	76
<b>Tabela 3</b>	Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas, clínicas e patológicas de acordo com presença de margens cirúrgicas positivas e negativas (n=162 casos).....	77
<b>Tabela 4</b>	Médias das variáveis quantitativas (MCP+MCN) (n=162).....	78
<b>Tabela 5</b>	Reações imunoistoquímicas nas amostras de CaP (n=162).....	81
<b>Tabela 6</b>	Associação da imunexpressão de iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina e RB em CaP com MCP (n=110).....	86
<b>Tabela 7</b>	Associação da imunexpressão de iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina e RB em CaP com MCN (n=52).....	87
<b>Tabela 8</b>	Análise das expressões da iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina e RB pelo escore de Gleason (n=162 casos).....	88

<b>Tabela 9</b>	Taxas de sobrevida livre de RB de todos os pacientes (MCP+MCN) relacionadas com todas variáveis (n=162).....	89
<b>Tabela 10</b>	Análise univariada das taxas de sobrevida livre de RB de acordo com variáveis clínicas, cirúrgicas, anatomopatológicas e imunoistoquímicas (MCP+MCN) (n=162).....	97
<b>Tabela 11</b>	Análise multivariada da sobrevida livre de RB (MCP+MCN) (n=162).....	98
<b>Tabela 12</b>	Análise univariada da sobrevida livre de RB em pacientes com MCP (n=110).....	99
<b>Tabela 13</b>	Análise multivariada para sobrevida livre de recorrência bioquímica em pacientes com MCP (n=110).....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CaP</b>	Adenocarcinoma da próstata
<b>CECP</b>	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
<b>CO</b>	Cintilografia óssea
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase2
<b>GLUT1</b>	Proteína transportadora de glicose 1
<b>HIF</b>	Fator induzível por hipóxia
<b>HPB</b>	Hiperplasia prostática benigna
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde
<b>iNOS</b>	Sintase óxido nítrico induzível
<b>MCN</b>	Margens cirúrgicas negativas
<b>MCP</b>	Margens cirúrgicas positivas
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PR</b>	Prostatectomia radical
<b>PSA</b>	Antígeno prostático específico
<b>RB</b>	Recidiva bioquímica
<b>RC</b>	Recidiva clínica
<b>RM</b>	Ressonância magnética
<b>SLRB</b>	Sobrevida livre de recidiva bioquímica
<b>SLRC</b>	Sobrevida livre de recidiva clínica
<b>TMA</b>	Tissue micro array – Micro arranjo de tecidos
<b>TC</b>	Tomografia computadorizada
<b>TR</b>	Toque retal
<b>USTR</b>	Ultrassom transretal
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Adenocarcinoma da próstata.....	1
1.2	Estadiamento, fatores de risco, e progressão .....	4
1.3	Formas de tratamento .....	15
1.4	Margens cirúrgicas .....	16
1.5	Recidiva bioquímica .....	26
1.6	Recidiva clínica.....	31
1.7	Biomarcadores preditivos da evolução.....	34
1.7.1	iNOS – Sintase óxido nítrico induzível.....	40
1.7.2	COX-2 -- Ciclooxygenase2.....	45
1.7.3	GLUT1 – Proteína transportadora de glicose 1 .....	54
1.7.4	Nitrotirosina .....	59
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>62</b>
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>63</b>
3.1	Casuística.....	63
3.2	Materiais e métodos .....	65
3.2.1	Exame anatomopatológico .....	66
3.2.2	Construção do array de tecido.....	70
3.2.3	Imunoistoquímica .....	70
3.2.4	Dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos.....	73
3.3	Análise estatística.....	78
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>80</b>
4.1	Imunoistoquímica .....	80
4.2	Análise das associações entre iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina com recidiva bioquímica em pacientes com margens cirúrgicas positivas.....	86

4.3	Análise das associações entre expressões da iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina com recidiva bioquímica em pacientes com margens cirúrgicas negativas.....	87
4.4	Análise das associações entre iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina; graduação histológica de Gleason; com recidiva bioquímica nos 162 pacientes (MCP+MCN).....	88
4.5	Análise da sobrevida livre de recidiva bioquímica aos 5 e 10 anos de seguimento em todos os casos (MCP+MCN) .....	89
4.6	Análise univariada da sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com variáveis clínicas, cirúrgicas, anatomopatológicas, e imunoistoquímicas em todos os casos (MCP+MCN) (n=162 casos).....	96
4.7	Análise da Sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com variáveis clínicas, cirúrgicas, anatomopatológicas e imunoistoquímicas nos 110 casos com margens cirúrgicas positivas.....	98
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>125</b>

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Exemplo de Laudo Anatomopatológico

**Anexo 2** Banco de dados dos 162 pacientes (MCP+MCN)

**Anexo 3** Planilha do banco de dados dos 162 pacientes (MCP+MCN)

**Anexo 4** Planilha dos 162 pacientes portadores de CaP com e sem margens comprometidas para identificação nas lâminas do TMA em duplicata (nº do laudo anatomopatológico e da lâmina com fragmento mais representativo do tumor)

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 ADENOCARCINOMA DA PRÓSTATA**

O adenocarcinoma da próstata (CaP) é o segundo tumor maligno mais comum entre os homens superado na sua frequência pelo câncer de pele não-melanoma sendo o 6º tipo mais comum no mundo. Em nosso país a estimativa do Instituto Nacional de Câncer-INCA para ano de 2012 foi de 60.180 casos novos da doença (Ministério da Saúde 2011).

Segundo as recomendações da Associação Americana de Urologia - AUA, válidas até o presente, a conduta frente ao CaP clinicamente localizado, em fase inicial, e em casos selecionados restritos à glândula e de baixo risco, estes podem ser acompanhados apenas através de observação vigilante (COOKSON et al. 2007). Neste estágio, bem como nos de risco intermediário ou de alto risco, desde que ainda localizados à glândula, podem ser tratados através de procedimentos cirúrgicos ou radioterápicos com ou sem neoadjuvância hormonal. Entretanto, mesmo nos casos localizados, a recidiva ocorre em cerca de 30 a 54% dos casos em 10 anos de seguimento (D'AMICO et al. 1998; POTTERS et al. 2004). A recorrência tumoral pode decorrer da excisão incompleta da neoplasia, do sub-estadiamento clínico, ou da disseminação de micrometástases pré-existentes sendo manifestada como recidiva bioquímica (RB), indicando que a neoplasia ainda persiste localmente ou à distância sem manifestação

clínica, enquanto que a recidiva clínica (RC) manifesta-se em forma de metástases ósseas, linfonodais, hepáticas ou pulmonares com consequentes repercussões clínicas, ou pela invasão a outros órgãos (DAMIÃO et al. 2008).

Na possibilidade de ocorrer tais eventos, associados à alta incidência desta doença, justificam-se esforços na busca de métodos de detecção precoce e de marcadores biológicos prognósticos, com consequente melhora no planejamento e na escolha da forma de tratamento, que podem influir nos resultados da evolução dos pacientes (THOMPSON et al. 2007).

Margens cirúrgicas comprometidas presentes no espécime cirúrgico de uma prostatectomia radical (PR) é fator independente de pior prognóstico, e em conjunto com outros fatores como a extensão destas margens; o escore de Gleason destas e o da glândula prostática; e a invasão tumoral para tecidos periprostáticos, indicam maior probabilidade de ocorrer RB e posterior evolução para a RC (CHENG et al. 1999; THURAIRAJA et al. 2006; SHIKANOV et al. 2009; BRIMO et al. 2010).

Quando ocorre a RB é indicada complementação com radioterapia externa sobre o leito prostático operado e da região pélvica isoladamente ou associada a bloqueio hormonal com deprivação androgênica. Apesar da radioterapia ocasionar variáveis graus de toxicidade sobre a continência urinária e a potência sexual, pode ser indicada preventivamente e portanto logo nos primeiros meses após a cirurgia, ou postergada após a constatação da RB, como tratamento de resgate. Entretanto a RB não ocorre em todos

casos de MCP, estimando-se esta taxa entre 20 a 50% dos casos (RENDA et al. 2002; BILLIS et al. 2011).

É aceito que o valor prognóstico de qualquer critério isolado na previsão da progressão tumoral do CaP é limitado e, por isto, acredita-se que a análise combinada de variáveis clássicas pode significativamente melhorar a acurácia desta avaliação. Tabelas de probabilidade e nomogramas, baseados nos parâmetros como estágio, escore de Gleason, e PSA foram construídos e observou-se, como isto, melhora na predição do resultado após cirurgia ou radioterapia (PARTIN et al. 1997; STEPHENSON et al. 2006a).

Torna-se claro a necessidade de identificação das características morfológicas ou biológicas que identifiquem o potencial de progressão tumoral e que possibilitem a seleção individualizada do tratamento.

Vários estudos procuram novos fatores prognósticos destacando-se os marcadores moleculares (WRIGHT e LANGE 2007) sendo considerado marcador ideal aquele com padrão de expressão único nos tumores recorrentes ou metastáticos, específico da doença, minimamente invasivo, de ensaio reprodutível, com sensibilidade e especificidade adequadas, e que permitiria de antemão a identificação dos pacientes com pior prognóstico.

Recentemente constatou-se através de estudos imunoistoquímicos em espécimes de PR níveis de expressão de vários biomarcadores que predizem a ocorrência destas recidivas, com isto reservando a indicação de tratamento radioterápico adjuvante aos casos selecionados com maior

segurança do êxito de sua indicação (SARDANA et al. 2008; SARDANA et al. 2012).

Em vários estudos encontramos referências sobre a expressão de iNOS, COX-2, GLUT1, e Nitrotirosina, como elementos reconhecidamente presentes em diversos tecidos neoplásicos, incluindo o CaP, associados a alto grau de malignidade celular, neoangiogênese, isquemia, inflamação, e invasão tecidual (KLOTZ et al. 1998; AIRLEY et al. 2001; FONSECA 2002; VERHAGEN et al. 2002; PALAYOOR et al. 2003; RUBIO et al. 2005). Por outro lado, poucos trabalhos com estas enzimas e proteínas foram realizados para poderem ser consideradas como marcadores preditivos de progressão da doença, o que nos motivou a realização desta pesquisa.

## **1.2 ESTADIAMENTO, FATORES DE RISCO E PROGRESSÃO**

O estadiamento do CaP é importante fator a ser considerado na forma de tratamento desta doença.

A classificação Tumor - Linfonodo - Metástase (TNM) mais utilizada é a 7ª edição da “Union Internationale Contre le Cancer” (UICC) (SOBIN e WITTEKIND 2009) sendo esta a mais recente, citado por HEIDENREICH et al. (2011) (Quadro 1).

Segundo pareceres e recomendações da V Reunião do Comitê Brasileiro de Estudos em Uro-Oncologia (FERREIRA et al. 2005), o estadiamento clínico pré-operatório do CaP carece de precisão, sendo baseado nos resultados do toque retal (TR), nos níveis do antígeno prostático específico (PSA), e complementado por exames de imagem. No

entanto, o TR é parte integrante do estadiamento clínico, e utilizado amplamente em nomogramas para avaliação de extensão extracapsular e prognóstico.

Outro fator importante a se considerar é que a maioria dos tumores de próstata que cursam com PSA <4,0 ng/ml, e que são diagnosticados exclusivamente pelo TR, são em geral de pequeno volume (0,24mm<sup>3</sup> a 0,83 mm<sup>3</sup>) e bem diferenciados (escore de Gleason <7) (FERREIRA et al. 2005). Entretanto, 16% dos casos podem apresentar doença avançada.

Diversos trabalhos consideram a doença clinicamente localizada em casos de PSA <10 ng/ml, existindo risco aumentado de extensão extracapsular, de comprometimento das vesículas seminais, e de metástases à distância nos casos quando PSA total >10 ng/ml. Se o PSA total é maior que 50 ng/ml, a maioria dos pacientes tem metástases em linfonodos pélvicos (FERREIRA et al. 2005).

O ultrassom transretal (USTR) é o exame usado para a realização das biópsias, embora questionável no estadiamento do CaP por ser operador dependente, onde o valor preditivo positivo das lesões hipoecóicas prostáticas em zona periférica representam câncer em apenas 15 a 41% dos casos, subestadiando a doença em até 26% dos casos, e sendo preditivo positivo em 63% na detecção de extensão extracapsular. O USTR doppler em 3D mostrou maior probabilidade de diagnóstico de extensão extracapsular (SAUVAIN et al. 2003). Alcança valor preditivo positivo de 90% e valor preditivo negativo de 96% no diagnóstico de lesões T3, com acurácia no estadiamento de 94% contra os 72% do USTR convencional. Uma limitação do método é que estes dados foram significativos apenas em lesões hipoecóicas (GARG et al. 1999).

**Quadro 1 - Classificação TNM do CaP**

T	Tumor primário
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor clinicamente não aparente, não palpável ou não visibilizado em estudos de imagem
T1a	Achado histológico incidental em 5% ou menos de tecido ressecado
T1b	Achado histológico incidental em 5% ou mais de tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia com agulha (devido a PSA elevado) (1)
T2	Tumor confinado dentro da próstata
T2a	Tumor envolve metade de um lobo ou menos
T2b	Tumor envolve mais da metade do lobo, porém não os dois lobos
T2c	Tumor envolve ambos os lobos
T3	Tumor estende-se além da cápsula da próstata (2)
T3a	Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
T3b	Tumor invade a(s) vesícula(s) seminal(is)
T4	Tumor está fixo ou invade estruturas adjacentes outras além das vesículas seminais, esfíncter externo, reto, elevador do ânus e/ou parede pélvica
N	Linfonodos regionais
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases em linfonodos regionais
M	Metástases à distância
M0	Ausência de metástases a distância
M1	Metástases à distância
M1a	Linfonodo(s) não regionais
M1b	Osso (s)
M1c	Outro(s) local(is)
1	Tumor encontrado em um ou ambos os lobos nas biópsias por agulha, porém não palpável ou visível em exames de imagem, é classificado como T1c.
2	Invasão do ápice da próstata, ou para dentro (não abaixo) da cápsula prostática, não é classificada como T3, mas como T2.

**Fonte:** SOBIN e WITTEKIND (2009)



A tomografia computadorizada (TC) tem baixa sensibilidade e especificidade para diagnóstico de doença extracapsular. Há evidências que só deva ser indicada em pacientes de alto risco (T2c, escore de Gleason 8-10 e PSA >20ng/ml) para o estadiamento regional (acometimento de linfonodos ilíacos e obturatórios). A eficácia da RM na detecção de linfonodos pélvicos metastáticos baseia-se na avaliação de seu tamanho (potencialmente positivos >1cm em seu menor eixo), embora sua especificidade seja de 90%, e sua sensibilidade inferior a 70%, próxima a da TC (FERREIRA et al. 2005).

A cintilografia óssea (CO) deve ser solicitada no estadiamento apenas em casos onde existe suspeita de metástases ósseas na fase do diagnóstico inicial da doença.

Vários estudos retrospectivos prévios analisaram estes achados. Em estudo envolvendo 8.644 pacientes, a positividade da CO foi de 5,3% para pacientes com PSA até 20 ng/ml, e de 16,2% para a faixa com PSA de 20 a 50 ng/ml (ABUZALLOUF et al. 2004).

Parâmetros como estágio clínico e patológico, o escore de Gleason e os níveis plasmáticos do PSA são comumente usados como marcadores de prognóstico em pacientes portadores de CaP, embora nos casos de grau de malignidade intermediário, isoladamente estes fatores tenham menor fator preditivo (PARTIN et al. 1997; PARTIN e FENELEY 2001).

No Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, e Sociedade Brasileira de Urologia (2006), definindo fatores prognósticos em CaP, para formular um melhor prognóstico baseado

em fatores ditos essenciais, este tem que ser composto por uma análise conjunta do estadiamento clínico, do escore de Gleason e dos níveis plasmáticos do PSA sendo que quando  $<4$  ng/ml há 80% de probabilidade da doença estar restrita ao órgão;  $<10$  ng/ml, CO e TC da pelve são desnecessárias na avaliação de rotina; e quando  $>10$  ng/ml o risco de extensão extracapsular é acima de 60%. Quando PSA  $>50$  ng/ml, há alto risco de doença metastática (CORRÊA et al. 2006).

A dosagem do PSA é utilizada na monitorização do tratamento. Se o PSA não baixar a nível considerado indetectável após a PR, ou aumentar a despeito da radioterapia ou da crioterapia realizadas, ou aumentar dentro do primeiro ano após a realização de qualquer tratamento local ou, ainda dobrar de valor em menos de 6 meses, provavelmente o paciente apresenta metástase à distância. Nível detectável de PSA  $>0,2$  ng/ml pode estar associado com recorrência da doença, sendo que a média do intervalo entre a recorrência do PSA e a morte por câncer situa-se entre 5 e 12 anos, dependendo do estágio clinicopatológico e escore de Gleason (CORRÊA et al. 2006).

O escore de Gleason é aceito como o mais importante método de graduação do CaP, observando-se ao microscópio em média-baixa magnificação as alterações no grau da arquitetura glandular e sua relação com o estroma prostático, num paralelo com o grau citológico, apresentando graduação de 2 (1+1) a 10 (5+5), sendo o primeiro e o segundo nesta soma os graus mais prevalentes.

Quanto mais indiferenciado o tumor maior o escore de Gleason e pior o prognóstico e maior a taxa de recorrência, sendo que aproximadamente 85% dos casos apresentam escore entre 6 e 7 de Gleason, classificação esta atualizada pela *International Society of Urological Pathology-ISUP* em 2005 (EPSTEIN 2010).

Os achados pós-cirúrgicos comparados aos dados analisados no pré-operatório tem maior exatidão para estabelecer o estágio do câncer, assim como também uma maior acurácia na classificação histológica pelo escore de Gleason, permitindo maior predição da evolução e consequente orientação terapêutica para o paciente.

A classificação por riscos, na escolha da melhor opção terapêutica, é baseada nos principais parâmetros pré-operatórios acima descritos. Apresentamos como exemplos as classificações de riscos de quatro diferentes instituições (Quadro 2).

## Quadro 2 - Classificações de riscos do CaP

<b>Classificação de D'Ámico</b>	
<b>BAIXO RISCO</b>	▶ Sobrevida em 10 anos de 80% * T1-T2a e PSA < 10 ng/ml e Gleason < 7
<b>RISCO INTERMEDIÁRIO</b>	▶ Sobrevida em 10 anos de 50% * T2b ou PSA 10 – 20 ng/ml ou Gleason 7
<b>ALTO RISCO</b>	▶ Sobrevida em 10 anos de 30% * T3 ou PSA > 20 ng/ml ou Gleason > 7
* Com prostatectomia radical ou RT em doses de 70Gy	

Fonte: D'AMICO et al. (1998)

<b>Classificação do Memorial Sloan Kettering Cancer Center<sup>8</sup> e Seattle<sup>9</sup></b>	
<b>BAIXO RISCO</b>	▶ T1-T2a e PSA < 10 ng/ml e Gleason < 7
<b>RISCO INTERMEDIÁRIO</b>	▶ Um dos parâmetros abaixo
<b>ALTO RISCO</b>	▶ Dois ou mais parâmetros abaixo
Parâmetros: >T2a ou PSA > 10 ng/ml ou Gleason >6	

Fonte: Clinical Practice Guidelines in Oncology-NCCN (2007)

- Risco baixo: pacientes com T1-T2a, Gleason 2 a 6, PSA <10.
- Risco intermediário: pacientes com T2b-T3a ou Gleason 7 ou PSA 10 a 20.
- Risco alto: pacientes com mais que T3a ou Gleason >7 ou PSA >20.

Fonte: FERREIRA e SASSE (2007)

Grupo de risco	Estádio Clínico	Score de Gleason	PSA (ng/ml)
Baixo	T1 ou T2a	2-6	≤10
Intermediário	T2b/T2c	7	10-20
Alto	T3a/T3b	8-10	20
Muito alto	T3c/T4 ou N+		

Fonte: GUIMARÃES et al. (2010)

Segundo OHORI et al. (2004) escore de Gleason 4/5 foi fator preditor independente de progressão tumoral, mas não superior quando em análise multivariável, do escore tradicional. Quanto à invasão da cápsula prostática, verificou que os pacientes com câncer restrito a glândula, mas com infiltração da cápsula sem ultrapassá-la totalmente, ou o fazendo para tecidos periprostáticos na região apical ou anteriormente, estes têm pior prognóstico em comparação daqueles que exibem câncer confinado ao estroma prostático, dentro dos limites, ou mais exteriormente aos limites dos ácinos prostáticos. Quanto à invasão perineural, medido o maior foco da invasão perineural dentro ou fora do espécime prostático, em linha perpendicular ao acesso ao longo dos núcleos celulares de Schwann do nervo afetado, relatam que existe significância importante deste achado em análise uni e multivariável. Nos casos onde foi encontrada invasão perineural extensa, mesmo em pacientes com o câncer confinado à glândula, isto representou um importante fator preditor de progressão tumoral. Ressaltam ainda que o estágio patológico final, determinado pelo exame do produto da PR, prediz a possibilidade de recorrência com mais acurácia que fatores rotineiramente obtidos no pré-operatório: estágio clínico, dosagem do PSA, e escore de Gleason nas biópsias.

São considerados como fatores prognósticos independentes por análise multivariável no pós-operatório: a invasão do câncer à cápsula prostática, o acometimento das vesículas seminais, de linfonodos, das margens cirúrgicas, bem como do escore de Gleason no espécime. Estes mesmos autores analisaram também qual a importância do volume tumoral

total encontrado, considerado como importante fator preditor de progressão associado a outros achados anatomopatológicos, mas neste estudo não foi preditor independente da progressão do PSA, concluindo ser desnecessário medir este volume na prática clínica diária (OHORI et al. 2004).

Por outro lado, no Projeto Diretrizes da AMB/CFM (SADI et al. 2006), considera-se o volume do câncer prostático fator importante que se correlaciona com o prognóstico e também com o grau histológico, entretanto, os tumores não precisam atingir grandes volumes ou altos graus histológicos antes de se tornarem localmente invasivos. Embora este volume possa ser uma variável importante no prognóstico, há tumores que podem evoluir rapidamente a partir de pequenas alterações histológicas e outros que podem se tornar agressivos após muitos anos, atingindo grandes volumes, perdendo então sua relativa “benignidade”.

LEITE et al. (2005) avaliaram a chance de progressão tumoral correlacionando volume tumoral e a presença de um grau terciário de Gleason menos diferenciado, em produto de PR em pacientes com CaP bem diferenciados, escore de Gleason  $\leq 6$ , e no pós-operatório separando os pacientes em três grupos, respectivamente aqueles com PSA  $< 0,4$  ng/ml;  $0,4-1,1$  ng/ml e  $> 1,1$  ng/ml, e observaram que o volume tumoral e a porcentagem do padrão 4 de Gleason mostraram associação com progressão da doença. O volume tumoral foi o parâmetro mais importante para determinação da RB em análises uni e multivariadas. A mediana do volume foi de 25% nos pacientes que sofreram recidivas, e 11,5% naqueles que permaneceram livres de doença ( $p=0,003$ ). A porcentagem de padrão 4

de Gleason foi importante apenas em análise univariada. A mediana da porcentagem de Gleason 4 foi de 7,5% para os pacientes que não sofreram recidiva e de 19% naqueles que recidivaram ( $p=0,046$ ). A análise de regressão logística considerando idade, escore de Gleason, porcentagem de padrão 4 de Gleason, volume tumoral, invasão capsular e infiltração tumoral extraprostática mostrou que o único indicador de progressão foi o volume tumoral ( $p=0,010$ ). Concluem que o volume tumoral distinguiu pacientes com recidiva daqueles sem, independentemente do nível de PSA. Por outro lado, a porcentagem do padrão 4 de Gleason associou-se a recidiva com maiores níveis de PSA, sugerindo que a porcentagem do padrão 4 de Gleason seja um indicador de recidiva sistêmica.

O'BRIEN et al. (2011) consideraram como preditores da evolução, associado aos achados pré-operatórios: o peso prostático, a presença de carcinoma intraductal, e a porcentagem de escore de Gleason 4/5 como tendo valor independente na predição de RB quando associados aos preditores clássicos pré-operatórios como valor do PSA, estadiamento tumoral incluindo invasão das vesículas seminais e extensão extracapsular. Concluem que a importância preditiva da presença de margens positivas é máxima em tumores de baixo grau, mas diminui sua importância se a porcentagem do escore de Gleason 4/5 aumenta. Por outro lado, o valor preditivo da extensão extracapsular é mínimo em tumores de baixo grau, mas aumenta significativamente com porcentagem maior de escore de Gleason 4/5.

Quanto ao fator extensão do volume tumoral, BILLIS et al. (2011) analisaram como fator prognóstico independente esta extensão tumoral relacionada a ocorrência ou não de RB analisando 305 peças cirúrgicas resultantes de PR, sendo o volume tumoral contabilizado por contagem de pontos em método semi-quantitativo, e correlacionando com variáveis clínicas e anatomopatológicas. Tumores mais extensos mostraram de forma significativa no pré-operatório um PSA mais elevado, estágio clínico mais avançado, mais margens cirúrgicas positivas, maior estágio patológico e maior escore de Gleason nas biópsias por agulha e nos espécimes cirúrgicos.

Em análise univariada, progressão bioquímica correlacionou-se significativamente com extensão tumoral, PSA pré-operatório, escore de Gleason nas biópsias prostáticas e nas peças, e margens cirúrgicas e estágio patológico. Não houve diferença relacionando tempo da RB comparado a maior ou menor extensão tumoral ( $p=0,20$ ), e em análise multivariada, a extensão tumoral não foi preditora de RB combinada com qualquer das variáveis estudadas ( $p>0,05$ ). Concluem que extensão tumoral não trouxe informação preditiva adicional de RB pós-PR, em comparação com PSA pré-operatório, escore de Gleason, margens cirúrgicas e estágio patológico.



### 1.3 FORMAS DE TRATAMENTO

O CaP deve ser tratado de acordo com nomogramas ou diretrizes de diversas entidades urológicas e oncológicas, mas sobretudo o é pela escolha terapêutica decidida pelo médico e pelo paciente.

Em revisão da literatura RHODEN e AVERBECK (2010) observaram que para o tratamento do CaP localizado (T1-T3a NX) existem diferentes modalidades utilizadas, segundo dados do CAPSURE (*Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor*) entre os quais: PR (51,6%), braquiterapia (21,7%), radioterapia externa (6,8%), observação (7,9%) e outros (12%). Segundo as Diretrizes em Câncer da Próstata, SBU (2011), a PR apresenta os melhores resultados na redução da mortalidade câncer-específica e progressão local e sistêmica da doença (DALL'OGGIO et al. 2011).

Em estudo comparativo, não randomizado, entre PR e radioterapia, envolvendo 1.682 pacientes, a sobrevida livre de RB para PR e radioterapia foi de 80% e 72% em 5 anos, e 73% e 70% em 8 anos, respectivamente ( $p=0,01$ ). Não houve diferença significativa entre os dois grupos quanto à sobrevida global (KUPELIAN et al. 2002).

A PR pode ser realizada por via retropúbica, perineal, laparoscópica ou robótica com a retirada total da próstata, vesículas seminais e linfonodos das cadeias ilíaca externa e obturadora, de forma limitada ou estendida.

São fatores de pior prognóstico: constatação de margens cirúrgicas comprometidas; linfonodos e vesículas seminais comprometidas, ou tumor em estágio pT4.

Pacientes com elevação do PSA pós-PR a níveis  $>0,2$  ng/ml em duas dosagens sucessivas e com suspeita de recidiva local devem receber pelo menos 64 Gy na fossa prostática (radioterapia de resgate) antes do PSA atingir níveis séricos de 1,0 ng/mL. Pacientes com recidiva sistêmica devem ser submetidos à terapia antiandrogênica. Não está claro, porém, qual a época ideal e qual o tipo de bloqueio androgênico recomendado. As evidências disponíveis sugerem que o tratamento hormonal precoce é superior ao tardio, em termos de sobrevida estas recomendações são baseadas no consenso da *American Society of Therapeutic Radiology and Oncology*- ASTRO (ROACH et al. 2006).

#### **1.4 MARGENS CIRÚRGICAS**

A definição das margens cirúrgicas em produto de PR por CaP, em revisão elaborada por KHAN e PARTIN (2005) e para muitos autores, é considerada margem cirúrgica comprometida ou positiva (MCP) quando o tumor se apresenta até ou a 1 mm da margem cirúrgica, enquanto para outros, se o tumor não chega a ultrapassar, ou está no limite da superfície pintada com tinta da Índia, ou esta margem é tão exígua quanto  $< 0,1$  mm, não deveria se considerar como margem positiva. Mas, é consenso que

MCP deva ser definida como presença do tumor na superfície pintada (WIEDER e SOLOWAY 1998).

A definição anatomopatológica da MCP, é a extensão tumoral pela linha pintada na superfície da peça, por onde houve a incisão cirúrgica no momento da liberação da mesma do sítio prostático, mas existe a dificuldade da aplicação prática desta definição pelo fato da próstata estar envolta por estruturas vitais como distalmente o diafragma urogenital, a parede pélvica lateralmente, o reto posteriormente e o colo vesical anteriormente, por consequência, em muitos sítios a peça prostática é envolta por tecidos moles periprostáticos <1 mm de espessura (MONTIRONI et al. 2009).

Se o tumor aos cortes não ultrapassar a tinta demarcatória, margens exíguas (<0,1mm) não deveriam ser relatadas como positivas. MCPs podem resultar da incapacidade de se extirpar amplamente uma extensão extraprostática do tumor sendo um dos locais mais frequentes de extensão extraprostática a póstero-lateral, na região onde se encontram os feixes neurovasculares.

Na tentativa de preservar a potência e poupar o feixe neurovascular, há possibilidade maior para ocorrer MCP. Estas MCP poderiam ser evitadas se a ressecção fosse mais ampla na região da banda neurovascular. Podemos encontrar relato de MCP na ressecção, causada por um artefato cirúrgico, quando há uma quantidade muito escassa de tecido conjuntivo frágil em torno da próstata, facilmente rompido quando se manuseia a peça durante a RP, e o tumor microscopicamente visível na borda pintada do espécime cirúrgico, entretanto ainda há tecido conjuntivo frouxo adicional em

torno desta área quando a glândula foi removida. Outra causa de MCP é a transecção do tumor intraprostático, resultando em estágio T2 + (incisão capsular). Este estágio indica que em outra parte o tumor está confinado ao órgão, ainda que não se possa determinar se existe extensão extraprostática na região da incisão dentro da próstata, já que a borda prostática foi deixada no paciente (MONTIRONI et al. 2009).

A presença de MCP está associada a um aumento no risco de permanência local da doença com conseqüente RB e maior taxa de tratamento secundário. Trabalhos recentes demonstraram que o volume cirúrgico e a experiência do cirurgião também influenciam esta taxa. MCPs são em geral mais frequentes em: ápice prostático e ou uretra membranosa (40 a 60%), próstata posterior (40%), base da próstata (20%) e colo vesical (6%) (CORRADI et al. 2009).

Uma incisão acidental na próstata e no tumor, em que este não ultrapassa a cápsula, frequentemente é relatada como MCP em 70% das vezes no ápice prostático, podendo representar artefato da secção do ápice. Outro local que comumente pode apresentar uma falsa MCP, é no estroma fibromuscular que recobre anterior e ântero-lateralmente a próstata, onde a transecção pode se apresentar como sendo uma incisão capsular comprometida. MCPs tipicamente resultantes de incisões capsulares são geralmente identificadas nas margens posteriores e na porção média da glândula. Por sorte não há correlação de MCPs resultantes de incisões capsulares com maior risco de progressão tumoral pós-PR.

A progressão tumoral é consideravelmente maior em pacientes com MCP verdadeiras do que naqueles com MCN. A probabilidade de sobrevida livre de progressão aos 5 anos pós-PR é estimada entre 81 a 83% para MCN, diminuindo para 58 a 64% para os casos com MCP. A multiplicidade e a extensão das margens positivas são consideradas como fortes fatores de risco para progressão tumoral quando comparadas entre margem solitária ou margens focalmente positivas. Da mesma forma, margem positiva no colo vesical indica um risco maior de RB. Tumores que apresentem múltiplas margens positivas refletem doença de alto grau ou estágio, podendo haver metástases ocultas à distância, apesar de terem sido considerados como sendo doença clinicamente localizada. Portanto MCP pode indicar a possibilidade de recorrência local, mas isto não exclui doença disseminada oculta, pois podemos relacionar uma RB pós-PR em homens com CaP escore de Gleason 7 e MCP, associados com metástases a distância ou recorrência local. A radioterapia externa após aumento do nível do PSA, não apresentou respostas satisfatórias de controle da doença, em casos de escore de Gleason >7 e MCP, portanto deve-se considerar a indicação de terapia hormonal adjuvante.

Com MCP, na ausência de envolvimento linfonodal, com vesículas seminais negativas e escore de Gleason <8, pode ocorrer a RB em um período de tempo maior que um ano pós-PR, predizendo recorrência local. Estes pacientes podem se beneficiar de radioterapia externa adjuvante. Tanto imediata quanto postergada, tende a diminuir os níveis de PSA

observando-se melhora nas taxas de sobrevida livre de progressão bioquímica em 5 anos, mas sem melhora nas taxas de sobrevida global.

Este estudo conclui, que apesar da importância das MCPs, outras variáveis incluindo extensão extraprostática, invasão das vesículas seminais ou dos gânglios linfáticos, escore de Gleason, tempo de duplicação do PSA, podem alterar negativamente o prognóstico. Embora ainda não exista consenso sobre o tratamento das MCP existem evidências que a radioterapia pode trazer benefícios em casos selecionados (KHAN e PARTIN 2005).

ALGABA (2008) ressalta o importante papel do anatomopatologista no estudo das biópsias prostáticas quanto da peça da PR, observando que além do escore de Gleason, o estadiamento dado pelo estudo da peça é um importante fator prognóstico. Cita um estudo de 552 peças de PR, onde houve alto índice de concordância entre os patologistas envolvidos neste estudo, quanto à invasão das vesículas seminais (94%), e de apenas 57,5% em relação à comprovação da invasão do tecido adiposo periprostático. Considera este resultado fruto de uma hipervalorização da observação da zona de invasão, mas sendo mais significativos: a falta de consenso nesta descrição, pois existem critérios diferentes para estabelecer esta invasão por falta de limites anatômicos nítidos entre a próstata e seu envoltório, enquanto alguns consideram o carcinoma ser extraprostático apenas se houver contato direto com o tecido adiposo extracapsular, enquanto outros acham glândulas malignas no tecido fibroso fora do eixo da área extraprostática (periprostática ou no feixe neurovascular), mesmo sem tecido

adiposo, preenchendo os requisitos para relatar como tumor presente em extensão extraprostática.

VAN DER KWAST et al. (2006) relatam índice de MCP em 69,4% no produto de PR, também relacionado aos critérios adotados pelos anatomopatologistas. Estes definem que MCP só pode assim ser considerada, se o tumor estiver em contato direto com a tinta demarcatória dos limites da peça, sendo que devem ser considerados MCN quando a tinta não está em contato com a neoplasia independente da distância para a superfície pintada, e este dado não afetará a evolução após a PR. Existem áreas de retração tecidual, ou segmentos de ressecção cirúrgica da fásia periprostática, onde a tinta não cobrirá as áreas de delimitação externa, não sendo, portanto consideradas margens autênticas. Separadamente, lacerações capsulares durante o ato cirúrgico pode resultar em falsas margens positivas.

Estas discrepâncias entre os patologistas podem influenciar no diagnóstico de margens positivas e negativas (Figuras 1 e 2).

Relatam estudos onde MCPs têm o mesmo impacto na RB quanto a invasão periprostática, não encontrando correlação entre extensão da margem positiva e a RB, e que MCPs são mais preditoras de RB do que quando existente extensão extraprostática.

Concluem que quando relatadas MCPs o mais importante, é avaliar qual o risco do paciente em ter focos residuais do carcinoma na loja prostática, pois sabemos que MCPs não necessariamente significa ter câncer residual, pois são citados casos de MCPs seguidos por 10 anos em

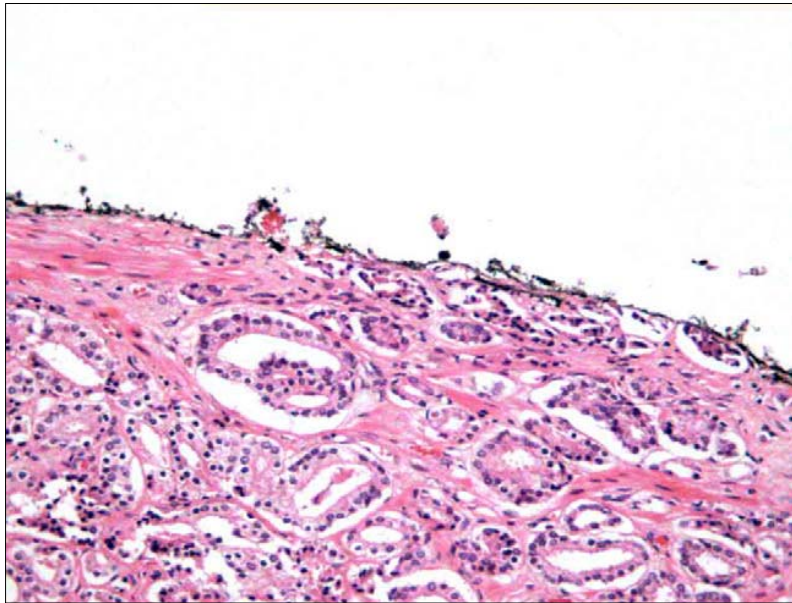
que ocorreu RB em 52% dos casos, mas só foi possível documentar recidiva local em 6% destes casos.

Questionamentos restam a serem elucidados sobre porque MCPs nem sempre representam doença residual, e nestas situações, se estas poderiam ser margens falso positivas, ou se pequenos focos de câncer residual poderiam ser destruídas por isquemia ou inflamação a ponto de não evoluírem com RB e doença tumoral local.

A significância prognóstica não será a mesma se a margem está diretamente sobre o carcinoma sem evidência de invasão do tecido adiposo, ou se existe uma invasão deste na área da margem positiva, além da constatação anatomopatológica de uma margem positiva ser lisa o risco de carcinoma residual é de 12,5% comparada a 60% quando a margem for microscopicamente irregular.

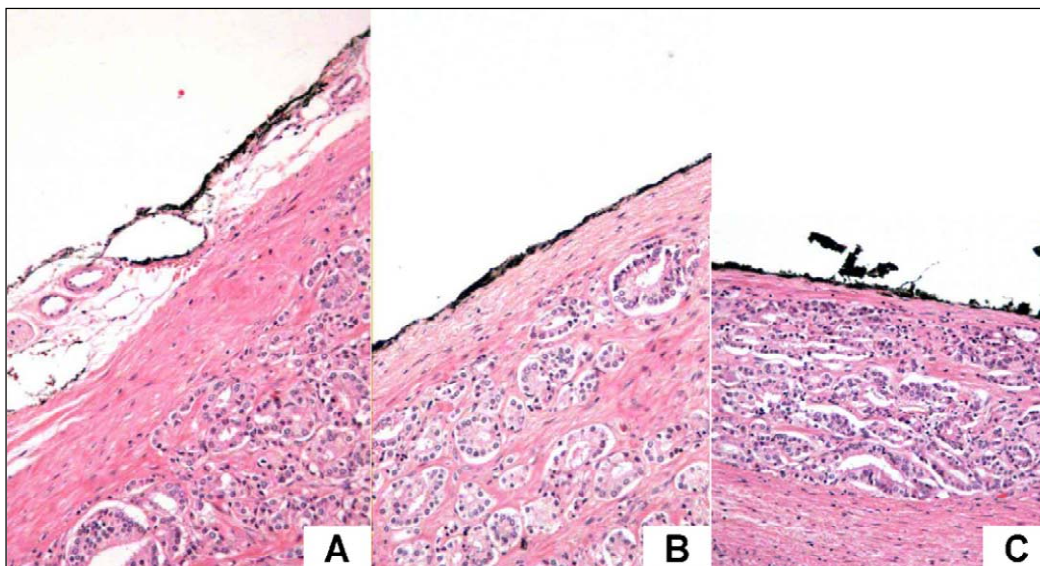
Séries recentes demonstraram que a incidência de 30,6% de RB foi encontrada em casos de margens positivas lisas contra 65,5% em margens irregulares (ALGABA 2008).





Fonte: ALGABA (2008)

**Figura 1** - Margem cirúrgica positiva sem tecido adiposo. A tinta está sobre o adenocarcinoma da próstata



Fonte: ALGABA (2008)

**Figura 2** - Margens negativas. A: com tecido adiposo, B: sem tecido adiposo, C: com mínima distância fibrosa do adenocarcinoma com a margem pintada.

A importância das margens cirúrgicas é bem descrita por LI et al. (2009) que avaliaram os seus resultados em 1398 PR laparoscópicas robóticas, encontrando 243 casos (17%) com margens positivas e entre estes 25% tendo múltiplos focos de MCP. Verificaram que pacientes com MCP apresentavam valores pré-operatórios de PSA significativamente maiores; maior grau de Gleason nas biópsias, maior estágio patológico, maior escore de Gleason na peça de PR, definindo como RB um PSA pós-operatório  $>0,1$  ng/ml. Houve também uma maior taxa de RB quando MCP (11%) do que quando MCN (3%), desta forma em análise regressiva simples de Cox, MCP foi estatisticamente significativa preditora da ocorrência de RB ( $p<0,001$ ). Quanto às taxas de MCP em relação ao estágio clínico, estas foram encontradas no estágio pT2 em 11% (120/1100) e quando pT3 em 41% (123/298). Quanto à dimensão das margens, as MCP foram divididas em categorias como sendo  $<1$ mm, entre 1- 3 mm e  $>3$  mm, com respectivas frequências de 44%, 33% e 23%. A taxa de RB foi significativamente maior quando a MCP apresentava dimensão  $>3$  mm sendo que as MCP foram localizadas em topografia póstero-lateral em 45% dos casos, apical em 29%, colo vesical em 6%,e anterior em 2%. A dimensão, mas não a localização das MCPs, ou a presença de múltiplos focos, foi fator preditor significativo de RB. Concluem que MCP é fator independente prognóstico de RB pós-PR, em conjunto com valores pré-operatórios do PSA, escore de Gleason e estágio patológico, além de que a dimensão total das MCP é fator significativo e independente de RB, mas não seu número ou localização,

sendo que dimensionar estas MCP pode estratificar pacientes com risco de RB pós-PR.

O relato no exame anatomopatológico de MCPs é um importante elemento a ser considerado pois pode significar uma probabilidade maior de RB ou de RC (BOORJIAN et al. 2010).

A mínima incidência de MCP é considerada o ponto culminante a ser atingida na curva do aprendizado cirúrgico em PR.

Estudo analisando 7.765 pacientes tratados por PR por via aberta retropúbica, calcularam a curva de aprendizado e a probabilidade de MCPs e a RB em 5 anos. A incidência de MP foi identificada em 2.059 pacientes (27%), e foi fortemente associada com a experiência do cirurgião, sendo os extremos de 40% de MCP para o cirurgião em seus primeiros 10 casos e 25% para os que fizeram mais que 250 procedimentos. Houve pouca concordância entre margens cirúrgicas e taxas de RB, concluindo que se deve procurar o mínimo de margens positivas, como índice de melhora da aptidão cirúrgica, e a presença de MCP não foi considerada um item importante a ser considerado no controle do câncer, já que nos casos onde houve mais MCP, apenas 58% dos casos evoluíram para RB (VICKERS et al. 2010).

Em outro estudo analisando a evolução de 7.725 pacientes, pós-PR aberta retropúbica, quanto à performance de sete cirurgiões experientes, constataram taxa de RB em 5 anos menor que 10%, enquanto que 5 outros cirurgiões ainda em formação, tiveram esta taxa superior a 25%,

evidenciando a importância da cirurgia oncológica bem realizada nos resultados finais (BIANCO et al. 2010).

A incidência de MCP em PR por via laparoscópica em 220 pacientes foi de 20% dos casos independente do estágio tumoral, sendo que quando quantificados no estágio pT2c a taxa foi de 11,5% (WAGNER et al. 2005).

A casuística do Hospital Montsouris (Paris-França) usando a via laparoscópica na PR mostrou que em 182 pacientes operados no estágio T1 (35%), T2 (62%), T3 (2%), com média do PSA de 8,2 ng/ml, obtiveram 66% dos pacientes com MCN e 34% com MCP, sendo que após 24 meses em 96 pacientes avaliados, apenas 12 (12,5%) apresentavam PSA detectável (WANG e WALDEN 2005).

O impacto de MCP pós-PR pode ser considerado como fator preditivo independente de RB em pacientes com CaP de intermediário e de alto risco. Pacientes com doença de baixo risco tem uma evolução a longo tempo, favorável, independente de terem MCP e podem ser candidatos a conduta expectante (ALKHATEEB et al. 2010).

## **1.5 RECIDIVA BIOQUÍMICA**

Cerca de 15% a 40% dos pacientes portadores de CaP localizado, apresentam RB pós-PR. A detecção do local da recidiva, se pélvica ou à distância, é fundamental para a definição do tratamento complementar.

Variáveis clínicas e anatomopatológicas, que incluem a graduação histológica de Gleason; a presença de extensão extraprostática do tumor; o

comprometimento das vesículas seminais; a presença de margens cirúrgicas e especialmente, o tempo e padrão de recidiva do PSA, ajudam a prever se a recidiva será local ou sistêmica.

Após seis semanas da cirurgia, os níveis de PSA total devem atingir valores próximos de zero, podendo ter um pequeno número de pacientes com tecido benigno residual nas regiões apicais ou junto ao colo vesical, que manterão níveis baixos de PSA, valores estes que poderão aumentar lentamente. Valores elevados do PSA total devem ser considerados indicativos de recidiva ou persistência tumoral e variam desde  $>0,1$  até  $>0,4$  ng/ml.

Há relato de que 100% dos homens com níveis de PSA  $>0,4$  ng/ml pós-PR apresentem recidiva tumoral, entre 6 e 49 meses, propondo então que este seja o valor mais apropriado para caracterização de RB, pois quando valores de 0,2 ng/ml são considerados, somente 49% dos pacientes apresentam elevação progressiva do PSA em 3 anos. Demonstrou-se que 100% dos pacientes com valores  $>0,2$  ng/ml apresentam elevação progressiva do PSA total em 3 anos (FONSECA et al. 2007).

Consenso europeu recomenda que RB pós-PR caracterize-se por elevação do nível do PSA  $>0,2$  ng/ml, seguido por outra elevação subsequente (BOCCON-GIBOD et al. 2004). Para pacientes tratados por radioterapia externa, intersticial, ou ambas, sem hormonioterapia adjuvante, RB deve ser considerada quando existir três elevações consecutivas do PSA, utilizando-se o nadir (menor valor atingido após o tratamento) como o valor de base  $\geq 0,2$  ng/ml (ROACH et al. 2006).

Em um estudo da história natural da elevação progressiva do PSA pós-PR, um grupo de 329 pacientes que apresentou RB e que não recebeu tratamento complementar, foi seguido por 10,5 anos apenas com CO anual. A recidiva bioquímica foi definida como PSA no pós-operatório  $>0,2$  ng/ml. A mediana do tempo para aparecimento de metástases ósseas foi de 7,5 anos. Estes pacientes foram então tratados com bloqueio androgênico e a mediana do tempo de sobrevida foi maior que 6,5 anos. Em análises multivariadas, RB antes do segundo ano após a cirurgia, escore de Gleason  $>7$  e tempo de duplicação do PSA  $<10$  meses, foram fatores preditivos para o aparecimento de metástases ósseas (POUND et al. 1999) (Projeto Diretrizes - Câncer de Próstata Localizado: Progressão Bioquímica (PSA) após tratamento) (SADI et al. 2006).

Procurando associar o valor prognóstico da presença de MCPs com a RB, HASHIMOTO et al. (2008) analisaram retrospectivamente 238 pacientes com CaP que foram submetidos a PR e linfadenectomia bilateral num período de 20 anos, definindo RB como aumento de um PSA indetectável para  $\geq 0,2$  ng/ml. Encontraram em 82 pacientes (34,4%) MCPs. Em análise multivariada, o PSA pré-operatório  $\geq 10$  ng/ml, estágio clínico  $\geq pT2a$ , e porcentagem das biópsias positivas  $\geq 35\%$  foram parâmetros que puderam prever uma MCP.

Na média de seguimento de 31,2 meses, 48 pacientes (20,2%) desenvolveram RB. A taxa de sobrevida livre de RB em 5 anos foi de 81,7% e de 62,6% em pacientes com MCN e MCP, respectivamente ( $p < 0,001$ ). O PSA pré-operatório  $\geq 20$  ng/ml e/ou estágio patológico pT3a/pT3b foram

fatores de risco significativos para RB em pacientes com MCP, concluindo que estes pacientes terão risco maior de RB em comparação com os que tiveram MCN, associados aos valores do PSA e do estágio tumoral.

A probabilidade de ocorrer RB pós-PR por CaP clinicamente localizado, foi estudada por HAN et al. (2003), retrospectivamente por 17 anos na evolução de 2091 pacientes submetidos a PR e linfadenectomia bilateral por CaP estágio clínico pT1c ou T2, e escore de Gleason  $\geq 5$ . Considerando como RB quando o PSA  $\geq 0,2$  ng/ml obtiveram como resultados que a média de seguimento foi de 5,9 anos (1 a 17), e onde 360 homens (17%) apresentaram RB. As taxas de sobrevida livres de RB em 5, 10 e 15 anos foram de 84%, 72% e 61%, respectivamente. O risco relativo de RB pós-PR diminuiu com o tempo mesmo após terem sido ajustados para outros parâmetros perioperatórios. Como variáveis pré-operatórias significativas foram identificados o escore de Gleason nas biópsias pré-operatórias, o estágio TNM, e o PSA. Como variáveis pós-operatórias identificaram o escore de Gleason na peça, níveis do PSA, e estágio patológico (doença confinada ou não na glândula) encontrando que 50% apresentavam tumor confinado, enquanto MCN com extensão extraprostática e escore de Gleason  $\leq 7$  foram identificados em 15%; extensão extraprostática, escore de Gleason  $\geq 7$  e MCP em 5%; MCN com extensão extraprostática e escore de Gleason  $\geq 7$  em 15%; e MCP, extensão extraprostática e escore de Gleason  $\geq 7$  em 6%.

KIM et al. (2010) analisaram retrospectivamente as taxas de sobrevida livre de tumor, RB e sobrevida câncer específica, num período de

19 anos, em 1822 pacientes submetidos a PR e linfadenectomia bilateral. Analisaram prontuários de 1324 pacientes, com média de idade de 64,4 anos e média dos níveis do PSA de 12,3 ng/ml, correlacionaram idade, nível do PSA pré-operatório, escore de Gleason nas biópsias pré-operatórias e na peça, estágio patológico, margens cirúrgicas, progressão da doença e sobrevida, tendo como resultados: média de seguimento de 40 meses (variação de 6-193), taxas de sobrevida livre de RB aos 5 e 10 anos respectivamente de 73,2% e 66,2%, e as taxas de sobrevida câncer específica aos 10 anos foi de 92,4%. A média de tempo para ocorrer a RB após a PR foi de 18 meses. Em análise multivariada, o escore de Gleason 4+3 vs. 2-6, 8-10 vs. 2-6, o estágio patológico pT3a vs. pT2, pT3b-4 vs. pT2, pN1 vs. pT2, e a presença de margens cirúrgicas foram preditoras estatisticamente significantes de RB, sendo que apenas o estágio patológico pT3b-4 vs. pT2 e pN1 vs. pT2 foi preditor significativo em relação a sobrevida câncer específica. Concluem que a PR resulta em controle favorável no controle do câncer em mais de 70% dos casos após cinco anos e tem uma baixa taxa (<10%) de mortalidade câncer específica após 10 anos. Os principais fatores preditivos de RB foram: escore de Gleason, estágio patológico e comprometimento das margens cirúrgicas em 30,4% dos casos.

A RB definida então pelo aumento progressivo dos níveis plasmáticos do PSA pós-PR, pode ter variações deste valor entre instituições, a partir da dosagem >0,2ng/ml (Guidelines for localized prostate cancer- Update, American Urological Association) (COOKSON et al. 2007) ou para outros >0,4 ng/ml, sendo que em alguns centros esta medida passa a ser



representativa quando  $>0,1$  ng/ml em dois exames consecutivos sendo considerada uma evolução da doença. A escolha dos pacientes candidatos a tratamento complementar é baseada na possibilidade ou ocorrência de RB e pode significar a cura ou a progressão para RC. Devem ser analisados os índices de PSA, o escore de Gleason, o tempo de duplicação do PSA, a presença de margens positivas, a invasão das vesículas seminais, para decidir a melhor conduta, já que existem 12 diferentes modos de se interpretar a RB, sem um consenso ainda bem definido (CRONIN et al. 2010).

## **1.6 RECIDIVA CLÍNICA**

A recidiva clínica (RC) pode ser definida como sendo a evolução da RB, após falha no tratamento desta, caracterizando doença localmente recidivada ou disseminada, sintomática ou não, dependendo do acometimento ósseo, hepático, pulmonar, e das alterações sobre o organismo.

Extensão extraprostática do tumor, margens cirúrgicas positivas e escore de Gleason  $<7$  correlacionam-se com recidiva pélvica local, tardia, geralmente após 1 a 3 anos pós-PR, enquanto que invasão das vesículas seminais, comprometimento linfonodal e escore de Gleason  $>7$  com doença disseminada, precoce, menor do que 18 meses, sendo em geral o PSA detectável  $<1$  ano após a cirurgia, o tempo de duplicação do PSA  $<10$

meses, e a velocidade da duplicação do PSA  $>0,75$  ng/ml por ano (FERREIRA et al. 2005).

Em artigo de revisão, FONSECA et al. (2007) ponderam que os pacientes com diagnóstico de RB constituem um grupo bastante heterogêneo em relação ao desenvolvimento de doença metastática. Citam estudo da história natural dos pacientes com RB pós-PR, trabalho de POUND et al. (1999) e atualizado na ASCO de 2003, onde avaliaram 329 pacientes com diagnóstico de RB, de um total de 3.263 pacientes submetidos à PR entre 1982 e 2002 ressaltando que os pacientes não fizeram uso de hormonioterapia até o diagnóstico de doença metastática. A mediana do tempo para o desenvolvimento de doença metastática foi de 7,5 anos e a mediana do tempo entre o diagnóstico de metástase e o óbito foi de 6,5 anos. Os principais fatores preditores da probabilidade e do tempo para o desenvolvimento de doença metastática foram: o escore de Gleason (5-7 vs 8-10), o tempo para o diagnóstico de RB ( $>2$  anos vs  $<2$  anos) e o tempo de duplicação do PSA ( $>10$  meses vs  $<10$  meses).

Outros estudos citados nesta revisão, também determinaram o risco da RC analisando-se o tempo pós-PR em que ocorreu RB e o tempo que levou para ocorrer a duplicação do PSA, quanto menores, piores. Em outros estudos, o alto escore de Gleason e o menor tempo de duplicação do PSA foram os fatores significativos da possibilidade da evolução tumoral para RC.

Os dados indicam que a maior parte das recidivas bioquímicas nestes casos poderia ser manifestação antecipada da doença metastática.

POUND et al. (1999) reportaram que após a RB, aproximadamente um terço dos pacientes apresentam doença localizada e dois terços doença metastática, acompanhada ou não de recorrência local.

Outros investigadores também relatam uma baixa incidência de recidiva local isolada, variando de 10 a 25%. Portanto, vários investigadores reforçam a importância de fatores histológicos bem como os ligados à cinética do PSA para a distinção entre uma recidiva local e a sistêmica (RC). Sabe-se que em um paciente com escore de Gleason >7, com RB que ocorre em menos de dois anos do tratamento definitivo e tempo de duplicação do PSA menor do que seis meses, a probabilidade de recorrência local exclusiva é muito baixa.

STEPHENSON et al. (2006b) procuraram normatizar a definição de RB e a probabilidade de sobrevida livre de progressão e seu risco de doença metastática com subsequente progressão (RC), que varia muito dependendo do critério adotado tendo-se como referência o PSA.

Para tanto analisaram dez definições de RB para identificar a que melhor explicaria a progressão metastática usando dados de 3125 pacientes operados em sua instituição desde 1985, onde 75 desenvolveram metástases à distância numa média de seguimento de 49 meses. Para prever esta progressão usaram as informações clínicas em análise de regressão multivariável de Cox. RB foi incluída neste modelo como co-variável dependente de tempo, e assim criaram vários modelos para cada definição. A probabilidade de sobrevida livre de progressão da RB em 10 anos variou de 63% a 79%, dependendo da definição de RB. O modelo

contendo RB definido como um PSA no mínimo de 0,4 ng/ml seguido de outro aumento, foi a que melhor explica a progressão metastática, sendo associada a alta probabilidade de terapia secundária subsequente, progressão continuada e rápida duplicação do PSA.

Concluem como sendo RB representado por um valor de PSA no mínimo de 0,4 ng/ml, seguido de outro aumento na sequência, como melhor explicação para correlacionar o aparecimento de metástases distantes, após controladas as variáveis clínicas, e o uso de terapia adjuvante secundária.

## **1.7 BIOMARCADORES PREDITIVOS DA EVOLUÇÃO**

A possibilidade de contar com dados que possam prever a evolução indicando tratamento complementar em pacientes portadores de CaP com MCPs pós-PR precocemente, ou apenas quando ocorrer a RB, estimulou a pesquisa através de estudos imunoistoquímicos, para identificação de biomarcadores preditivos desta potencial progressão.

SHARIAT et al. (2008) estudaram níveis plasmáticos pré-cirúrgicos de marcadores biológicos para correlacionar estes dados com RB em pacientes com CaP, assim podendo, dependendo dos resultados, instituir terapia adjuvante ou neoadjuvante mais efetiva e precoce, naqueles que apresentassem recidiva, comparando estes dados com os bem estabelecidos dados de prognóstico de RB, como estágio clínico, escore de Gleason nas biópsias e PSA pré-operatório.

Analisaram os índices plasmáticos de TGF-h1, interleucina - 6 (IL-6), receptor solúvel de IL- 6 (sIL - 6R), Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1), endoglina, ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA) e o receptor desta uPA, através de exames imunoistoquímicos em 423 pacientes submetidos a PR e linfadenectomia bilateral, por CaP localizado. Tiveram como resultados em análise multivariada que TGF-h1, sIL-6R, IL-6, VCAM-1, VEGF, endoglina e uPA estavam associados significativamente com RB. O modelo multivariável contendo variáveis clínicas consagradas, sozinho, teve uma acurácia de 71,6%. A adição dos resultados destes biomarcadores aumentou a acurácia na predição em 15%, chegando a 86,6% ( $p < 0,001$ ), assim possibilitando aconselhar os pacientes com risco mais precoce de RB, a um tratamento adjuvante mais imediato pós-PR.

Pesquisadores conseguiram determinar com acurácia, entre 323 pacientes estudados, aqueles com maior probabilidade de RB pós-PR. Evidenciaram que nas próstatas que apresentavam altos índices de receptores androgênicos, detectados por imunoistoquímica, o tempo da RB foi menor, predizendo este fato com alto índice de acerto, apresentando sensibilidade de 96% e especificidade de 72%. Expandindo este estudo empregando múltiplos ensaios de imunofluorescência, e analisando agora 682 pacientes, repetiram os achados que demonstraram sensibilidade de 77% e especificidade de 72%. Elegeram o receptor de androgênio junto com cinco achados clinico-patológicos (invasão da vesícula seminal, escore de Gleason na biópsia, extensão extracapsular, PSA pré-operatório, e escore

de Gleason dominante da peça prostática final), bem como dois achados histológicos (textura dos núcleos epiteliais e citoplasma em redor do tumor), como a plataforma para poder conferir prognósticos de RB em pacientes operados por CaP submetidos à PR (CORDON-CARDO et al. 2007).

BEDOLLA et al. (2007) detectaram por estudos imunoistoquímicos em tecido prostático parafinado, de pacientes submetidos a PR por CaP, que a perda da expressão da fosfatase supressora de tumores e a deleção da tensina homóloga no cromossomo 10 (PTEN), e a fosforilação da proteína de sobrevivência celular Akt (pAkt), previram a RB, num prazo de 60 meses. Notaram que PTEN não foi um bom preditor, entretanto em combinação com pAkt comportou-se melhor nesta função, comparado só com a pAkt, e viram também que 90% de todos casos com alto pAkt e PTEN negativo apresentaram RB, enquanto que 88,2% daqueles com baixo pAkt e PTEN positivo não tiveram RB. Em adição, escore de Gleason elevado resulta em proteção reduzida por menor índice de pAkt e aumento do PTEN.

Concluíram que a perda da expressão do PTEN, junto com aumento da fosforilação do Akt, e o escore de Gleason são de significativo valor na predição ao tempo da PR, para risco de RB.

Estudando o biomarcador Clusterina, glicoproteína sulfatada secretora do sistema ubiquitina, PINS et al. (2004) aventaram a possibilidade desta poder ser preditora de RB em pacientes com CaP, cujo escore de Gleason era intermediário, considerado grupo difícil de prever a evolução pós tratamento em comparação com aqueles que apresentam baixo ou alto índice de malignidade pelo mesmo escore. Em três grupos de pacientes,

foram separados aqueles que apresentaram RB nos 3 primeiros anos pós-PR, e os outros dois grupos foram os que não apresentaram RB, 5 e 10 anos pós-PR. Utilizando um anticorpo monoclonal específico para Clusterina e analisando em quatro sítios do tecido prostático estudado, notaram que a coloração de células epiteliais prostáticas, benignas como as malignas, não mostraram relação significativa entre os três grupos. Mas a coloração das células estromais, em torno de células benignas e malignas evidenciou significativa diferença entre os pacientes que apresentaram RB e aqueles que não apresentaram RB em seguimento de 10 anos, portanto qualificaram a Clusterina como um interessante biomarcador.

Outros pesquisadores estudando a Myosina VI, vetor actínico que se move na direção do terminal minus do filamento de actina, em uma direção oposta as demais miosinas, através de técnicas de expressão por TMA, a promoveram com um dos importantes genes que demonstram uma hiperexpressão câncer específica em tecidos prostáticos.

A expressão da proteína Myosina VI positivamente se correlaciona com a presença de receptores de andrógenos. A pequena interferência mediada por RNA Myosina VI nocauteadores, em células da linhagem LNCaP do câncer prostático resultaram “*in vitro*” em diminuição da migração e formação de colônias soft-agar. Depleção na expressão de Myosina VI também foi acompanhada por uma expressão gênica global refletiva do potencial atenuado tumorigênico, como evidenciado por uma indução dez vezes maior de TXNIP (VDUP1), um supressor tumoral que normalmente se apresenta com baixa expressão em câncer prostático. Estes resultados

suportam o papel crítico que a Myosina VI tem na manutenção das propriedades malignas no CaP (DUNN et al. 2006).

Na mesma linha de pesquisa, outros pesquisadores realizaram hibridização "*in situ*" por fluorescência para a detecção da perda do gene PTEN e rearranjo no gene ERG/ETV1 em 308 pacientes portadores de CaP tratados de forma conservadora. Evidenciaram que o rearranjo de ERG/ETV1 sozinho e a perda do gene PTEN sozinho, falharam em mostrar um caminho para sobrevivência celular, mas houve forte interação entre estes dois acontecimentos. O maior grupo de pacientes (54%) que tiveram a perda do gene PTEN e perderam o rearranjo de ERG/ETV1 tiveram um bom prognóstico exibindo uma sobrevida câncer específica favorável (85,5% vivos aos 11 anos de seguimento). A presença da perda do gene PTEN na ausência de rearranjos genéticos de ERG/ETV1 identificaram uma população (6%) com menor sobrevida câncer específica, que foi altamente significativa (13,7% vivos aos 11 anos de seguimento) (REID et al. 2010).

Foi publicada uma lista de biomarcadores com interação no CaP e suas respectivas possibilidades de uso clínico (SARDANA et al. 2008). Entre os mais importantes destacamos: KLK2 (preditor de diagnóstico e prognóstico de extensão extra capsular, volume tumoral e RB); PSMA (marcador de imagem e alvo para terapia); KLK11 (preditor precoce de CaP no soro); PCA3 (marcador urinário para detecção de CaP); EPCA/EPCA2 (detecção imunistoquímica, marcador sérico para metástases de CaP disseminadas); AMACR (aumenta a detecção de anticorpos no CaP, detecção imunistoquímica, prognóstica de RB); uPA/uPR (aumento sérico



ou tecidual predizem RB e metástases); IGF/IGBP – IGF1 (aumenta pouco no soro em CaP, IGFBP concentra inversamente /progressão CaP); TMPRSS2/ERGETV1 (aumenta na urina no CaP e PIN, gene fusão presente no CaP por FISH); TGF- $\beta$ 1 (aumento imunistoquímico e no soro com progressão do CaP e RB); EZH2 (expressão gênica no tecido de CaP prediz progressão tumoral); GSTP1 (detecção urinária de gene promotor de hipermetilação indicando necessidade de biópsia); PSP94 (prediz score Gleason, MP, RB e recidiva tumoral local); CRISP3 (aumenta sua expressão imunistoquímica em tecidos com PIN, prediz RB independente); Chromogranin A (monitoração de pacientes com CaP andrógeno-independente e diferenciação neuroendócrina); Peptídeo liberador de progastina (idem ao anterior); E-caderina (expressão diminuída no CaP relaciona-se a pior estágio e sobrevida reduzida); Annexin A3 (produção diminuída no CaP, marcador de risco de prognóstico); PSCA (marcador imunistoquímico associado a score Gleason e estágio, alvo terapêutico); Hepsina (detecção imunistoquímica de PIN e CaP comparada com hipertrofia benigna); IL-6 (aumento na concentração sérica nos estágios finais do CaP).

Correlacionando processos fisiopatológicos e seus biomarcadores e moléculas chave, QUINN et al. (2005) enumeraram os principais biomarcadores para estudo, diagnóstico e predição de eventos tumorais em CaP: Apoptose (p53; Bcl-2); Sinalizador de receptor androgênico (AR, possível via de transdução de sinal); Transdução de sinalização (família de receptores de fator crescimento epidérmico); Regulação do ciclo celular (c-

Myc, p16<sup>ink4a</sup>, p27<sup>k1p1</sup>, pRb, índice de apoptose, Ki67); Adesão e Coesão celular (E-caderina,  $\alpha$ -catenina, metaloproteinases, sulfato condroitina); Angiogênese (VEGF- fator crescimento endotelial, Receptores VEGF, Sintases do óxido nítrico).

### 1.7.1 iNOS – Sintase Óxido Nítrico Induzível

Óxido nítrico sintases (iNOSs) são uma família de enzimas que catalisam a produção de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina.

O óxido nítrico (NO) constitui uma das dez menores moléculas existentes e é uma das mais simples moléculas biossintetizadas. O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado sendo considerado um mensageiro celular com capacidade de difusão nos meios aquosos e lipídicos das membranas celulares, e participa de vários eventos fisiológicos, nos sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico.

No organismo, portanto o NO age como uma molécula sinalizadora, que passa através da membrana celular rapidamente para regular a atividade de proteínas intracelulares específicas.

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pelas isoformas da enzima NO-sintase (NOS). Estudos bioquímicos e análise sequencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são

produtos de três genes distintos no cromossomo 7 (eNOS), 12 (nNOS) e 17 (iNOS).

As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. A c-NOS e a i-NOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO e já foram caracterizadas, purificadas e tiveram os genes clonados.

A i-NOS 2 é cálcio independente, não é expressa sob condições normais, é induzida por estímulos imunológicos, citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas. Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a c-NOS e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra a morte celular. Diferente da NOS-1 e NOS-3 que produzem baixos níveis de NO, a NOS-2 pode produzir e manter altos níveis de NO.

O NO resultante da ativação da i-NOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base

bioquímica para a ação direta do NO consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do seu alvo.

Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular. O NO pode mediar mutações no DNA por três possíveis mecanismos: formação de nitrosaminas carcinogênicas (nitrosaminas, S-nitrosotiol); ou pela modificação direta do DNA, não por NO, mas por RNOS; ou por inibição dos sistemas de reparo do DNA, mediada por outras substâncias genotóxicas. Alguns RNOS podem mediar quebras nas cadeias do DNA (DUSSE et al. 2003).

O estresse oxidativo pode também mediar dano no DNA. A oxidação induzida por RNOS é mediada, primariamente, pela formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) proveniente da reação do excesso de NO com superóxido, que é ativado pelos macrófagos e, podem desta maneira, causar quebras nas cadeias do DNA, pois o peroxinitrito é um potente agente nitrosilante e nitrante, podendo reagir com as tirosinas livres ou ligadas à proteínas, produzindo nitrotirosina, que por ser mais estável, sua mensuração tecidual é considerada um marcador de formação do peroxinitrito e da atividade das NOS, além de ser estimulador da atividade da ciclooxigenase (COX), portanto, quando em excesso, o NO pode induzir efeitos mutagênicos ou citotóxicos (LANDINO et al. 1996).

Primeiro, o NO reage com ânion superóxido para formar uma molécula citotóxica, o peroxinitrito, sendo que a sua decomposição resulta

na formação do radical altamente tóxico e reativo, o hidroxil e dióxido de nitrogênio, sendo que, este último causa dano ao DNA.

Segundo, o NO pode estar envolvido na geração de nitrosaminas que são fortes carcinógenos animais (MIRVISH 1995). Por fim, o NO por si só pode causar dano ao DNA pela deaminação da nucleobase de DNA, incluindo 5-metilcitosina, a qual causa quebra da cadeia de DNA.

Diversas doenças apresentam expressão alterada de NO, incluindo as neoplasias. A ação do NO nos tumores é dupla, tendo ações pró e anti-tumorais. O NO pode participar na carcinogênese, angiogênese, inibição da resposta imune, indução de apoptose e lise celular. A ação depende do local, da quantidade do NO produzido, da capacidade da célula tumoral expressar determinadas proteínas, do tempo em que o NO interage com as células alvo.

Assim, seu efeito pode ter ação tanto na atividade tumoricida exercida pelo sistema imune, como na própria atividade biológica do tumor, incluindo efeitos nos mecanismos de iniciação, promoção e progressão do câncer, favorecendo a angiogênese e, por consequência a metástase (JENKINS et al. 1995; WINK et al. 1998).

Os tumores mais indiferenciados de mama apresentam maior produção de iNOS e são mais invasivos (JENKINS et al. 1995). Estes dados sugerem que o NO tem um papel crítico no crescimento e na invasão dos tumores, principalmente na regulação da angiogênese e, portanto, com uma participação direta no processo de metástase (FOLKMAN 1997).

Há controvérsia de como o NO pode regular a angiogênese através da citocina VEGF. Esta citocina é produzida por muitos tipos celulares na presença de hipóxia, mas em alguns tumores sua produção é um processo independente da situação de oxigenação local. O VEGF se liga a receptores específicos no endotélio, estimulando três processos da angiogênese. Inicialmente, o VEGF causa aumento da permeabilidade vascular, pela produção de NO, formação de uma matriz de fibrina com consequente proliferação e migração de células endoteliais. O processo é estimulado por outros co-fatores, incluindo TNF<sub>a</sub>, TNF<sub>b</sub>, bFGF, que também podem regular NO (MAZZUCHELLI et al. 2000).

A expressão de NO tem sido descrita em neoplasias de vários sítios como os ginecológicos, mama, sistema nervoso, pulmão, próstata, estômago, pâncreas, bexiga, cólon, vascular e linfocitário.

Nos condrossarcomas, NAKAGAWA (2005), estudou a expressão de NOS1, NOS2, NOS3, além de Nitrotirosina, COX-2 e CD 34, sendo que a expressão das NOS esteve relacionada com a expressão da Nitrotirosina, e COX-2, que em conjunto expressaram CD34 sendo observados conjuntamente com aumento da microcirculação. Também verificou que a expressão positiva da NOS2 está associada a uma menor sobrevida livre de doença local nos condrossarcomas, e quando as expressões conjuntas da NOS1 e NOS2 estão associadas, isto foi relacionado com menor sobrevida livre de doença metastática e com menor sobrevida global.

KLOTZ et al. (1998) mostraram que o CaP tinha alta expressão de iNOS, enquanto que o tecido benigno circunvizinho não apresentava

positividade. A expressão da iNOS não foi dependente do grau tumoral. Por outro lado, os NOS constitutivos (nNOS e eNOS) não revelaram nenhuma diferença das suas expressões entre o tecido benigno e maligno. Os autores sugerem que a expressão de iNOS pode ser usada como marcador imunistoquímico específico para confirmação da presença de carcinoma prostático.

### **1.7.2 COX-2 Ciclooxygenase 2**

As ciclooxigenases são enzimas que estão envolvidas na síntese de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico, catalizando a inserção da molécula de oxigênio, importante na conversão do ácido aracdônico em um intermediário instável prostaglandina PGG<sub>2</sub>, que é rapidamente convertido para prostaglandina - 2 PGH<sub>2</sub>. Este origina várias PGs ativas, tromboxanos e prostacilinas que contribuem para muitos processos fisiológicos e patológicos ocorrerem (KASPER et al. 2004).

Existem duas isoformas da COX; COX-1 e COX-2. A primeira é expressa constitutivamente em muitos tecidos e parece ser responsável pela produção basal de prostaglandinas. A COX-2 não é detectada em muitos tecidos normais, mas é altamente induzível por estímulos inflamatórios e mitóticos, e está fortemente implicada na tumorigênese, sendo expressa em uma série de tumores, principalmente os associados à inflamação, e está envolvida no processo de carcinogênese e inibição da apoptose. Sua presença pode ser fator prognóstico independente, cujo nível de expressão

tem sido relacionado ao desenvolvimento de metástases à distância, recorrências, menor sobrevida e grau de invasão vascular.

A identificação do aumento de expressão da COX-2 nos tumores ocorreu inicialmente nos tipos colorretais, desde então, esta identificação em outras neoplasias foi estudada como em tumores da próstata, mama, estômago, sistema nervoso, pele, rabdiossarcoma, osteossarcoma, tumor de Ewing, entre outros.

A COX-2 pode contribuir para a carcinogênese através de vários mecanismos. A PGE2 formada pelo COX-2 pode diminuir a imunidade local contra as células tumorais; o aumento da COX-2 pode inibir a apoptose, prolongando a vida das células com dano do DNA; o tromboxano derivado do COX-2, por ser um fator pró-agregante plaquetário, pode facilitar metástases tumorais pelas interações célula tumoral-plaqueta; e as células com aumento de expressão da COX-2 produzem prostaglandinas que são fatores pro-angiogênicos e estimulam a migração endotelial e formação tubular dos vasos sanguíneos. Os tecidos humanos que contêm RNA mensageiro para produção de COX-2 incluem pulmão, útero, testículo, cérebro, pâncreas, rim, timo, próstata, estômago, e intestino delgado. O estudo nos condrócitos da cartilagem humana demonstrou que estas células também expressam RNA mensageiro para COX-2 e sua proteína, quando ativados por IL-1 (GENG et al. 1995).

Em conjunto com outros biomarcadores, em estudo pesquisando a possível associação entre estes, foi avaliada a expressão das proteínas p53, COX-2 e p16 com o estágio do carcinoma escamoso de esôfago. Em área



tumoral, as análises revelaram 48,38% de positividade para p53, 16,12% de positividade para p16, e 100,00% de positividade escores 1+, 2+ ou 3+ para COX-2. No entanto, quando se avaliou possível relação da expressão destes marcadores com o estágio, apenas a COX-2, escore 3+ intensidade acentuada mostraram associação significativa. O estudo demonstrou que existe relação positiva entre a expressão de COX-2, escore 3+ e estágio mais avançado no carcinoma de esôfago (FELIN et al. 2008).

NAKAGAWA (2005), em sua dissertação de mestrado, demonstrou que os condrossarcomas expressam COX-2, e que as expressões de NOS1, 2 e 3, estavam relacionadas com a expressão da COX-2 nestes tumores, e também com a expressão de CD34 e portanto relacionadas com ambiente tumoral favorável para a microcirculação, como também estavam relacionadas com os graus histológicos, mas a COX-2 não apresentou associação significativa com as taxas de sobrevida livre de doença local ou de metástases.

Tumores colorretais, gástricos e esofágicos, tanto em animais de experimentação como também em humanos, expressam altos níveis de COX-2, ao contrário da mucosa intestinal normal, que apresenta baixos a indetectáveis níveis desta isoforma. Tais achados levantam a hipótese do envolvimento da COX-2 na progressão e disseminação do câncer nestes órgãos. Nestes tumores, a COX-2 é responsável também pelos altos níveis de PGE<sub>2</sub>, a qual parece promover o desenvolvimento tumoral inibindo a atividade supressora neoplásica e estimulando a proliferação de células epiteliais. Estudos com células em meio de cultura têm mostrado que a

expressão da COX-2 contribui para o potencial tumorigênico da célula epitelial por aumentar sua adesão à matriz extracelular, tornando-a resistente à apoptose, aumentando a viabilidade tumoral. Tais alterações foram reversíveis com a associação de inibidores COX-2.

Recentes evidências mostram relação da COX-2 com a regulação da angiogênese associada a células tumorais neoplásicas. Tal fato já está bem estabelecido e consiste em uma das formas através da qual a superprodução de PGE2 favorece a progressão do CaP. Através de estudos observacionais, mostrou-se que Aspirina® em baixas doses provavelmente reduz os riscos de câncer de cólon, assim como cânceres gástricos e esofágicos. O mecanismo para tal proteção ainda não está claro. Polipose adenomatosa familiar apresenta maior expressão da isoforma COX-2. Celecoxib® foi recentemente aprovado pelo FDA (*Food and Drugs Administration-USA*) como adjuvante no tratamento desta doença. Corticosteróides parecem agir como reguladores fisiológicos da expressão do RNAm da COX-2, o que talvez explique em parte a característica imunossupressiva desta enzima.

Vários estudos têm mostrado que antiinflamatórios não esteróides podem atuar reduzindo a progressão de tumores, através de mecanismos dependentes ou não da habilidade de inibir COX. Entretanto, ainda existem dúvidas sobre o real mecanismo possivelmente envolvido com a ação destas drogas na progressão de tumores.

Como já visto, drogas antiinflamatórias podem ter interessante ação contra o câncer pelas suas ações citotóxicas e propriedades antiangiogênicas.

PALAYOOR et al. (2003) estudaram a ação do Ibuprofeno e de outros antiinflamatórios não esteróides, em culturas de células cancerosas de próstata humana, em condições normais de oxigênio e de hipóxia. A exposição destas células em condições hipóxicas regulou para cima as proteínas HIF-1 e HIF-2, sendo que o tratamento com Ibuprofeno em condições normais e de hipóxia reduziu os níveis destas proteínas, que se associou a regulação para baixo de proteínas reguladas pelo HIF, como VEGF e GLUT 1, nas células expostas a hipóxia. O Diclofenaco e o Ketorolaco também inibiram os HIFs, na qual foi observada diminuição destes, em células que expressaram proteínas COX-2, como naquelas que não as expressavam. Concluíram que um dos efeitos destes antiinflamatórios é a redução dos níveis protéicos de HIF, sendo que a inibição dos HIFs pelos antiinflamatórios foi COX-2 independente.

Em artigo de revisão, KUMMER e COELHO (2002) citam as principais diferenças entre as COXs: a) sequência genética diferente para cada isoforma - os genes são regulados por dois sistemas independentes e diferentes, apesar da reação enzimática por eles catalisada ser idêntica, b) sítio de ligação do agente inibidor na isoforma COX-2 é estruturalmente cerca de 25% maior que o da COX-1, apresentando também local de ligação secundário, além do sítio catalítico. Isto tem permitido o desenvolvimento de agentes que bloqueiam a atividade COX-2, especificamente em

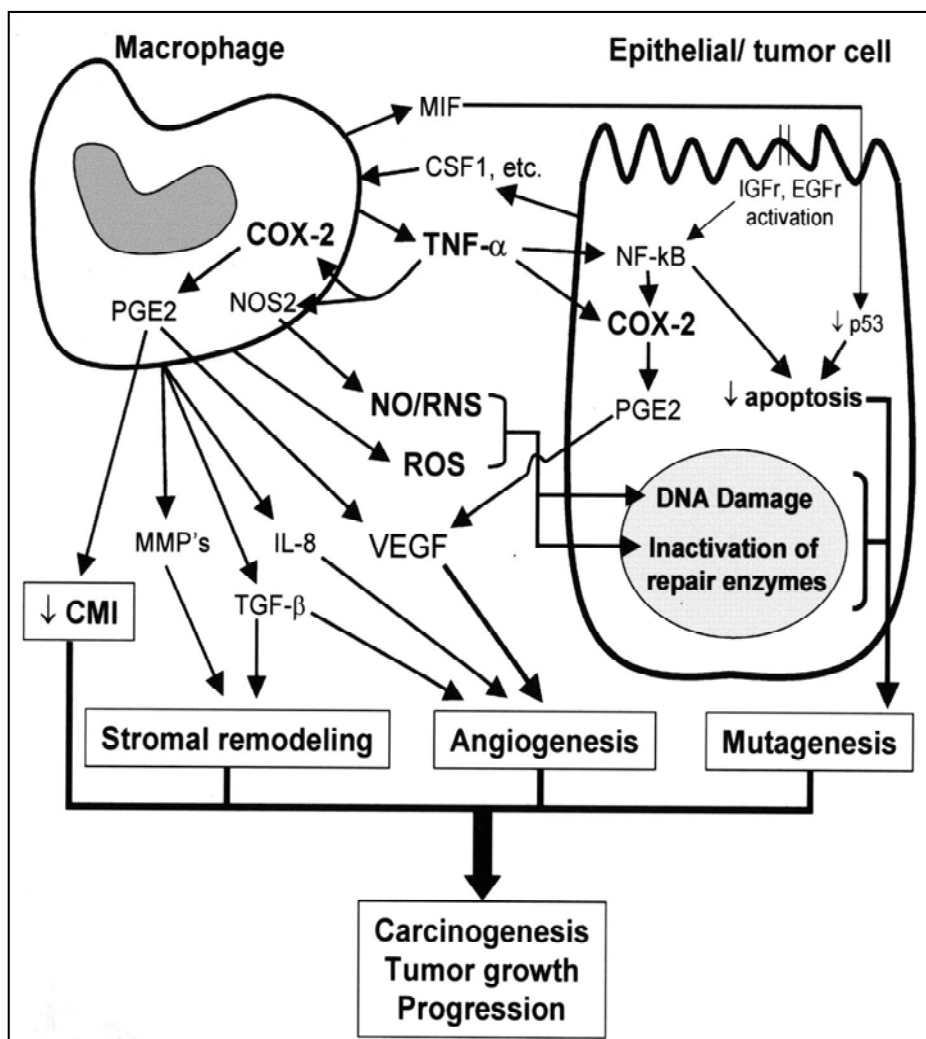
concentrações que apresentam mínimos efeitos COX-1 e o mesmo composto pode funcionar como um inibidor COX-2 em baixas concentrações e inibidor competitivo da COX-1 quando em altas dosagens, sendo que as bases moleculares para tais diferenças ainda não são completamente entendidas; c) COX-1 é uma enzima presente na maioria dos tecidos - diante de quadros inflamatórios, a atividade desta isoforma não parece ser alterada ou apresenta um aumento discreto de 2 a 4 vezes na sua expressão, em menores quantidades, a COX-2 encontra-se em determinados tecidos como cérebro, intestinos, rins, testículos, glândula tireóide, pâncreas; diante de quadro inflamatório, sua expressão é aumentada cerca de 20 vezes ou mais; d) Além do ácido aracdônico, a COX-2 também é capaz de agir no metabolismo de outras substâncias como: ácido linolênico e ácido linolêico. Recentemente foi proposta a existência de uma terceira isoforma desta família enzimática, denominada COX-3, a qual, ao contrário da COX-1 e COX-2, não produziria prostanóides pró-inflamatórios, mas sim substâncias antiinflamatórias.

Sabendo que a expressão da COX-2 é responsável pela produção de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico, e é elevada em tumores da próstata, HUH et al. (2006) investigaram se a expressão de COX-2 é efetiva contra a apoptose das células tumorais, disparado pela ação da sanguinarine, um alcalóide natural quarternário benzofenanthridino[13-methyl(1,3) benzodioxolo(5,6-c)-1,3-dioxolo(4,5i) phenanthridinium], derivado da *Sanguinaria canadensis*, planta medicinal conhecida com o nome de Raiz-Vermelha, da família *papaveraceae*, com propriedades antimicrobianas,

antiangiogênicas e antineoplásicas. Evidenciaram que sanguinarine efetivamente induziu apoptose em células epiteliais LNCaP do CaP verificada pela amostra de ativação com caspase-3, coloração por Annexin V, ou análise visual das modificações morfológicas de apoptose mediada pela sanguinarine que foi associada com aumento da produção do Óxido Nítrico (NO) nas células prostáticas cancerosas comprovado pelas medidas de nitritos através de aparelhos medidores da presença destes óxidos. Os resultados sugerem que os NOS constituídos não são suficientes em acelerar apoptose nestas células, mas produzem radicais superóxidos, sugerindo que a expressão de COX-2 resgata estas células cancerosas da apoptose sanguinarine induzidas, por um mecanismo envolvendo a inibição da atividade da NOS, portanto a administração de inibidores da COX-2 como sanguinarine pode ser uma estratégia no tratamento do CaP.

LUCIA e TORKKO (2004), procurando estudar a associação entre inflamação crônica ou infecção no desenvolvimento do CaP, não encontraram evidências fortes entre estas, mas ficou claro que inflamação pode contribuir na carcinogênese por um ou vários mecanismos interrelacionados, como por exemplo a elaboração de citocinas e fatores de crescimento em favor das células tumorais, indução da COX-2 nos macrófagos e células epiteliais, produção de espécies mutagênicas reativas ao oxigênio e nitrogênio (Figura 3). Inflamação crônica na forma de infiltrado estromal ou epitelial de linfócitos e histiócitos é extremamente comum na zona periférica da próstata, onde frequentemente ocorre o câncer. Mesmo que diferenças na histologia ou terminologia existam para estas lesões

atróficas e inflamatórias, em geral sempre exibem evidências de proliferação epitelial. Expressão heterogênea do gene GSTP1 nestas lesões foi proposta como evidência para a susceptibilidade ao dano oxidativo, portanto abrindo caminho para a carcinogênese. Concluem que evidências cumulativas demonstram que inflamação crônica pode ser um legítimo alvo para quimioprevenção, mais estudos são necessários para provar que este possa desempenhar papel na etiologia do CaP.



Fonte: LUCIA e TORKKO (2004)

**Figura 3** - Mecanismos inflamatórios implicados com a carcinogênese, crescimento tumoral e progressão. EGFr – receptor do fator de crescimento epidérmico, TGF – fator de transformação de crescimento beta, CMI – imunidade celular mediada

### 1.7.3 GLUT1 – Proteína Transportadora de Glicose 1

GLUTs são proteínas de membrana que diferem na expressão dos tecidos por especificidade e respondem a regulações hormonais e metabólicas.

O transporte de açúcar facilitado é mediado por membros da família de transportadores de glicose (GLUT, do inglês *glucose transporter*) que formam um poro aquoso através da membrana onde o açúcar pode passar de forma passiva (energia-independente). Como consequência, os poros podem somente transportar açúcares abaixo do seu gradiente de concentração. As GLUTs são glicoproteínas com doze segmentos de domínios exofascial e endofascial transmembranares (TMS) o que se acredita ser o resultado de uma duplicação intragênica das seis unidades TMS primordiais. A atividade desse transportador, portanto, não consome energia, atuando a favor do gradiente de concentração da glicose.

As GLUTs estão presentes nas membranas de quase todas as células e representam a principal via pela qual a glicose entra nas células, um aumento na taxa de transporte de glicose e no metabolismo tem sido visto em células em cultura transformadas por vírus e oncogenes. Esta transformação é associada com mudanças na expressão das proteínas carreadoras de glicose na membrana das células. Essas mudanças nas proteínas (GLUTs) podem ser feitas por sinais intra e extracelulares, onde existe uma variedade de mecanismos que aceleram o uso de glicose pela célula transformada favorecendo o crescimento de tumores em células malignas (BONDY et al. 1992). Atualmente são conhecidos 13 membros da



família GLUT (GLUT-1 a GLUT-12 e HMIT). As isoformas confirmadas são expressas de formas específicas nos tecidos e exibem distintas propriedades cinéticas e regulatórias, refletindo presumidamente seus papéis funcionais específicos. Em células com câncer é observada uma expressão de certas isoformas de GLUTs, as quais sob condições normais não são expressas (BONDY et al. 1992). Dentre esses subtipos ou isoformas, GLUT-1 e GLUT-3, têm uma expressiva afinidade pela glicose e, portanto desempenham importante papel em tecidos dependentes de glicose como fonte de energia (STOKKEL et al. 2002).

AYALA (2007), em sua dissertação de mestrado, analisando a expressão das GLUT-1 e GLUT-3 em relação a exame de imagem PetScan e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), faz revisão da literatura sobre estas proteínas em especial a GLUT-1 que foi o primeiro membro identificado nesta família, originalmente presente em eritrócitos, mas é igualmente presente em muitos tecidos humanos. Concluiu que o exame de PetScan independe da expressão de GLUT-1 e GLUT-3 para a detecção de carcinomas da cabeça e pescoço e de ovário. Em carcinoma epidermóide bucal, a presença da expressão nuclear de GLUT-1 se associou com o maior consumo de álcool e pior sobrevida global. A presença da expressão de GLUT-1 ocorre mais frequentemente em carcinoma epidermóide da boca do que a GLUT-3. Pela detecção imunistoquímica de GLUT-3 e através das análises estatísticas, tanto na univariada quanto multivariada, ele é um fator de pior sobrevida global assim como GLUT-1 e embolização vascular.

GLUT-1 é provavelmente a responsável pela entrada constitutiva de glicose nas células em uma grande variabilidade de tumores. Apesar destas múltiplas isoformas de GLUT, a GLUT-1 é o “transportador-chefe” de glicose para as células tumorais, estando presente em diversas linhagens de células tumorais. A isoforma GLUT-3, referida como uma proteína transportadora de glicose neurônio-específica, foi originalmente clonada de uma biblioteca de cDNA de músculo humano fetal, sendo encontrada numa variedade de tecidos periféricos humanos. Estudos posteriores encontraram uma expressão mais restrita nesses tecidos, incluindo o cérebro e o testículo.

Embora as consequências metabólicas do aumento do transporte de glicose ainda não sejam compreendidas completamente, a expressão do transporte de glicose tem sido sugerida como de importância clínica por muitos tumores sólidos. É sabido que as células malignas necessitam de um aumento na captação de glicose. Esse aumento do consumo de glicose ajuda a manter a energia necessária para a rápida proliferação dessas células, e representa uma importante mudança adaptativa para superar as condições de adversidade existente no microambiente dos tumores. Por essa razão, mudanças metabólicas podem ser usadas para fornecer informações de diagnósticos e prognósticos.

A expressão de GLUT-1 foi demonstrada em pacientes com tumores de múltiplos sítios e origem histogenética, tais como: carcinoma pulmonar de pequenas células, adenocarcinoma colorretal, carcinoma gástrico, de ovário e de CECP (OLIVER et al. 2004).

Embora a expressão de GLUT-1 seja comum em pacientes com CECP, o valor prognóstico desse parâmetro não tem sido analisado sistematicamente para este tipo de tumor. O aumento da RNAm de GLUT-1 e de GLUT-3 são encontrados em tumores do cólon, do pâncreas e do cérebro. Já a expressão dessas proteínas é observada em cânceres de cabeça e pescoço, pulmão, mama, tireóide, bexiga, pâncreas e ovário. Em alguns estudos com tumores epiteliais de ovário encontraram um significativo aumento progressivo da expressão de GLUT-1 em tumores “*bordeline*” a tumores malignos, ainda encontraram que a intensidade da expressão de GLUT-1 foi 100% em tumores malignos de ovário, porém, não estava associada com as características do tumor nem com a sobrevida dos pacientes (RUDLOWSKI et al. 2004).

A GLUT-1 como um transportador facilitador de glicose é normalmente expresso por ubiquitinação em tecido normal e expresso em altas taxas em tecidos tumorais. Seu potencial como intrínscio marcador de hipóxia vem do seu duplo controle das condições de hipóxia por fosforilação oxidativa reduzida e como sinalizador de oxigênio dependente fator induzível de hipóxia (HIF-1), sendo que frente ao câncer cervical, estudos demonstraram que a ausência deste marcador indicava a possibilidade de uma taxa maior de sobrevida sem metástases, mas não influenciou a porcentagem de casos com recorrência tumoral ou sobrevida sem doença, mas nos casos onde houve forte presença deste biomarcador, a taxa de recorrência da doença foi significativamente maior (AIRLEY et al. 2001).

CHUNG et al. (2009) considerando que a hipóxia tumoral é um importante fator relacionado a resistência tumoral a radioterapia e quimioterapia, estudaram moléculas sintetizadas em células de câncer coloretal durante hipóxia para explorar sinalizadores capazes de detectar morte celular e sua relação com radioterapia ou quimioterapia. Analisando estas células em ambientes com tensão normal de oxigênio e em hipóxia, mediram a expressão relativa de GLUT1 em condições de hipóxia, por RT-PCR, enquanto também foram examinados os níveis de HIF-1 e HIF-2 para medição do grau desta hipóxia, e estes resultados comparados com níveis plasmáticos de HIF1, HIF2 e GLUT1. Acharam que lactato induzido por hipóxia esteve aumentado cerca de 3 vezes mais, da mesma forma que os níveis de HIF 1 e 2, e os genes relacionados ao GLUT1 se encontravam sobre expressos nos tecidos cancerosos, sendo que estes maiores níveis de expressão se relacionaram significativamente com o estádios tumorais piores, comparados com estádios tumorais menores, sugerindo que o GLUT1 pode ser empregado como indicador de hipóxia em pacientes portadores de câncer coloretal. Como vimos, o GLUT-1 pode ser então considerado um biomarcador na predição de progressão tumoral. Tumores hipóxicos são reconhecidos como sendo mais malignos, metastatizam mais rapidamente e tem um prognóstico sombrio, portanto um marcador que dê esta certeza abreviaria o tempo para a indicação de medidas mais radicais de tratamento frente a estes tumores.

Poucos são os estudos da expressão do GLUT-1 em CaP como biomarcador preditivo da evolução tumoral.

#### 1.7.4 Nitrotirosina

A Nitrotirosina, relacionada ao estresse oxidativo, é um produto da ação de nitração causada por radicais livres como o ânion peroxinitrito e dióxido de nitrogênio em resíduos de proteínas como a tirosina. É detectada em algumas condições patológicas, como no câncer, e é considerado como um marcador de estresse oxidativo dependente de NO.

A presença de 3-Nitrotirosina foi avaliada como biomarcador ligado ao CaP, medindo-se a função do stress oxidativo no desenvolvimento tumoral. Analisando 30 amostras de hiperplasia prostática benigna e 40 de CaP, e mantendo de forma standard as condições para detectar por meios imunistoquímicos a presença de 3-Nitrotirosina nos tecidos analisados, pesquisadores obtiveram como resultados que as porcentagens de área imunorreativa a 3-NT nos tecidos cancerosos foram na ordem de  $25,78\% \pm 15,37\%$  para câncer prostático contra  $4,43\% \pm 2,2\%$  nos tecidos com hiperplasia prostática benigna, concluindo que a formação de 3-Nitrotirosina sinaliza notórias modificações químicas que ocorrem durante o stress oxidativo e reativo, com liberação de ânions superóxidos e proteínas que participam da resposta celular na modulação do dano oxidativo, formando elementos como peroxinitrito e conseqüente nitração das proteínas, além da alteração do estado oxirredutor celular que pode promover alterações cancerosas celulares (FLORIANO-SANCHEZ et al. 2009a).

Procurando estabelecer uma relação entre biomarcadores avaliados por imunistoquímica, para estabelecer ou predizer prognósticos em pacientes portadores de condrossarcomas, NAKAGAWA et al. (2010)

sabendo que o óxido nítrico está associado com o desenvolvimento tumoral, estudou esta teoria que foi analisada indiretamente pela dosagem da nitrotirosina e pelo uso das enzimas sintases do óxido nítrico (NOS)1, NOS2 e NOS3. O óxido nítrico (NO) reage com anions superóxidos formando peroxinitrito que tem efeito tóxico sobre os genes pois após ter adicionado um grupo nitro ao anel benzeno da tirosina, formando nitrotirosina, o acúmulo deste, um produto estável nas células, indica a formação de peroxinitrito. Este NO estimula a produção de COX-2, que está associado à angiogênese tumoral. A neovascularização influencia o prognóstico tumoral, como foi demonstrado por este estudo imunoistoquímico usando o CD34, marcador endotelial celular, na microcirculação tumoral. Teve como resultados uma associação significativa entre níveis de expressão da nitrotirosina, COX-2 e CD34 com os graus histológicos, mas não com o prognóstico geral, sendo que a expressão positiva da NOS2 foi associada com menor taxa de sobrevida livre de doença local, e expressões positivas de NOS-1 e NOS-2 estiveram associados com menor taxa de sobrevida em todos índices, sendo considerados variáveis dependentes, e a expressão destas isoladamente ou em combinação, foi relacionada com baixos índices de sobrevida.

FLORIANO-SANCHEZ et al. (2009b) analisaram o papel de marcadores moleculares e de um marcador gênico em tecidos com CaP e com HPB: o gene da Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD) e sua proteína, o PSA e a 3-Nitrotirosina (3-NT), avaliando se existe alguma alteração na expressão do estresse oxidativo no CaP e na HPB, em 80 biópsias

prostáticas. Igualaram-se as condições para amplificar e avaliar a imunorreatividade do gene de interesse do estudo (Mn-SOD e 3-NT), a correlação entre o PSA e a imunorreatividade do Mn-SOD nos tecidos com CaP e com HPB, encontrando que a sobre expressão do gene e da imunorreatividade do Mn-SOD, assim como da 3-NT, nos tecidos cancerosos foi maior do que em relação ao HPB, não se observando correlação entre os níveis do PSA e a imunorreatividade do Mn-SOD, concluindo assim que existe um papel importante destes marcadores biológicos em biópsias suspeitas de câncer da próstata.

## 2 OBJETIVOS

1. Avaliar as expressões imunoistoquímicas de iNOS, COX-2, GLUT1, e Nitrotirosina através de um TMA construído a partir das áreas mais representativas do tumor em espécimes cirúrgicas de CaP, de pacientes submetidos à PR retropúbica, com margens cirúrgicas positivas, associando estas expressões com variáveis clínicas, anatomopatológicas, e dados da evolução destes pacientes
2. Avaliar se existe correlação entre os níveis de expressão dos biomarcadores estudados com taxas de sobrevida livre de RB, procurando assim qualificar estes biomarcadores se preditivos da progressão tumoral.



### **3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Foram avaliados retrospectivamente dados de 1256 pacientes portadores de CaP considerados clinicamente localizados, tratados através de PR retropúbica e linfadenectomia pélvica bilateral, com intenção curativa, entre janeiro de 1995 e junho de 2010, no Serviço de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center – São Paulo-SP.

Foram revisados prontuários do Serviço de Arquivo Médico do Centro de Tratamento e Pesquisa A.C.Camargo Cancer Center (SAME), prontuário eletrônico MV, banco de dados do Serviço de Urologia (Dr. Francisco Paulo da Fonseca) e os dados anotados em ficha apropriada (Anexo1).

Foram considerados critérios de inclusão para o estudo: pacientes portadores de CaP localizado, comprovado histologicamente por biópsia prostática prévia; estágio clínico T1-T2c após exames físicos (TR), laboratoriais (PSA), e de imagens (ultrassom ou TC); submetidos à PR retropúbica, linfadenectomia pélvica e obturatória bilateral e com margens cirúrgicas positivas (MCP); lâminas e blocos de parafina das amostras teciduais em boas condições para exames histológicos e imunoistoquímicos; seguimento clínico atualizado com resultados dos exames laboratoriais e de

imagens quando necessárias para confirmação dos casos de RB ou RC; com seguimento mínimo de 24 meses pós-PR.

Os critérios de exclusão foram: pacientes tratados em outros serviços; pacientes tratados por hormonioterapia neoadjuvante; pacientes submetidos à PR de resgate pós-radioterapia; presença de gânglios linfáticos ou vesículas seminais comprometidas; prontuários com dados incompletos ou com perda de seguimento; não localização das lâminas anatomopatológicas para reclassificação histológica e demarcação das áreas tumorais ou material arquivado em parafina em más condições para a elaboração de novos cortes para imunohistoquímica; tempo de seguimento inferior a dois anos ou aqueles que tenham abandonado o seguimento, desde que não se consiga informações ao seu respeito através de contato telefônico ou por escrito.

Respeitados os critérios de inclusão e exclusão, foram avaliados 110 casos com margens cirúrgicas positivas que formam a casuística do estudo.

Como grupo controle, analisamos 52 pacientes portadores de CaP nas mesmas condições do grupo principal, mas com margens cirúrgicas negativas (MCN), para comparação das expressões dos biomarcadores estudados com as variáveis clínicas, anatomopatológicas e da evolução.

Foram considerados para cálculos de sobrevida livre de recorrência bioquímica (RB) e recorrência clínica (RC) prazos de 05 e 10 anos pós-PR.

Esta tese teve sua aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente - A.C. Camargo Cancer Center, em 10 de agosto de 2010, sob número de registro: 1417/10

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos pacientes procuraram os ambulatórios do Departamento de Cirurgia Pélvica – Serviço de Urologia, do A.C.Camargo Cancer Center, onde após anamnese, toque retal, dosagem plasmática do PSA, e biópsias transretais da próstata dirigidas por ultrassom, ou revisão das lâminas se pacientes encaminhados de outros serviços, foi complementada a avaliação com TC, raio-x de tórax, CO nos casos sugestivos de doença de alto risco, para proceder a indicação do tratamento cirúrgico em pacientes com doença considerada localizada pela Classificação TNM, 7<sup>a</sup> edição, elaborada pela *American Joint Committee on Cancer-AJCC* (EDGE et al. 2010).

Foram então submetidos à PR mais linfadenectomia pélvica e obturatória bilateral, por acesso retropúbico, pela técnica descrita por WALSH (1992), pela equipe médica do Serviço de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center.

Todos os pacientes tiveram seguimento ambulatorial, sendo o primeiro retorno 30 dias após a cirurgia e após, a cada 4 meses pelos 2 anos subsequentes e após, duas vezes ao ano, sendo anotados nos prontuários os dados clínicos e laboratoriais pertinentes, principalmente a dosagem plasmática do PSA total. Pacientes que tenham mudado de cidade, ou tenham deixado de comparecer ao retorno por outras razões, foram acessados por via telefônica, atualizando-se a evolução clínica, bem como os níveis plasmáticos do PSA.

Foi considerada RB quando a dosagem plasmática do PSA atingiu níveis iguais a 0,2 ng/ml em dois exames consecutivos no seguimento, e em eventual estudo por imagens, não se encontrando evidências de doença clínica.

Neste estudo, os pacientes com RB foram submetidos a radioterapia externa sobre o leito prostático e pélvis, isoladamente, ou em conjunto com terapia antiandrogênica. Em caso da resposta satisfatória, manteve-se o controle a cada 4 meses por mais 2 anos, e depois a cada 6 meses.

A recidiva clínica refletiu a evolução tumoral, com elevações nos níveis do PSA, sintomas da disseminação tumoral como emagrecimento, metástases ósseas ou em outros órgãos, entre outras, e morte pelo tumor. Nos casos de progressão para recidiva clínica institui-se ou substitui-se a terapia de bloqueio androgênico, e continuaram seu seguimento a cada 4 meses ou num período menor em caso de intercorrências clínicas, ou quando da necessidade de hospitalização.

### **3.2.1 Exame Anatomopatológico**

Foram compilados os resultados dos exames anatomopatológicos, nos arquivos de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center, tanto os da congelação durante a cirurgia se solicitadas pelo cirurgião, ou dos espécimes cirúrgicos produtos da PR submetidas a exame macroscópico à época da cirurgia, sendo pesadas em gramas, suas medidas dimensionadas em centímetros nos seus três eixos, e estudada sua superfície com descrição da cor e textura, se cruenta ou não.

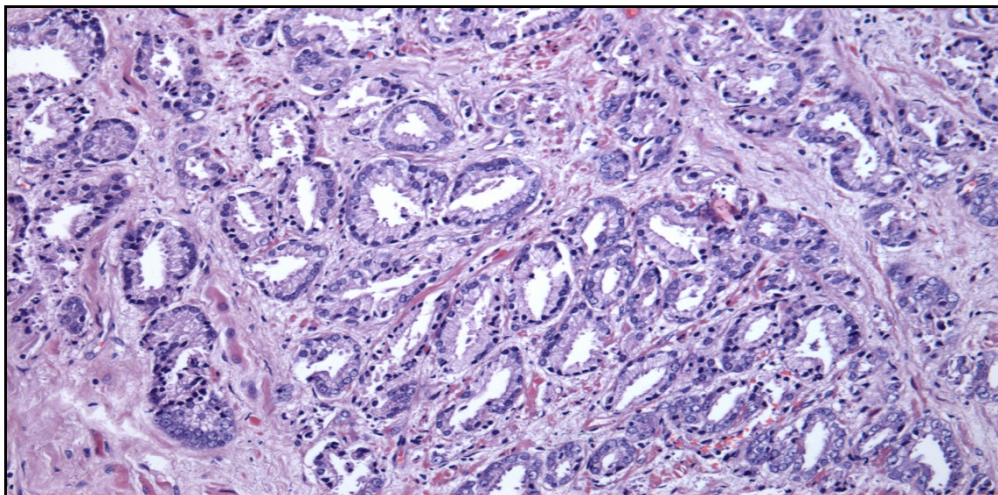
As superfícies foram pintadas com tinta Nanquim. As peças ao serem cortadas tiveram anotadas: o aspecto de suas superfícies, se nodulares, da sua coloração, presença de líquidos, bem como da descrição caso houvesse do local do achado de área de consistência mais firme, relatando-se seu aspecto, cor e dimensão.

Todos os casos foram submetidos ao mesmo protocolo de avaliação anatomopatológica, sendo a próstata analisada totalmente. Após a retirada das vesículas seminais, a próstata foi cortada em 4 quadrantes (anterior, posterior, direito e esquerdo) sendo cada quadrante cortada em 10 fatias (anterior para posterior) assim permitindo a reconstrução microscópica da peça cirúrgica. Para cada fatia foi obtida uma lâmina e para cada lâmina foi dada um porcentual de tumor presente, após análise de todas as lâminas foi feito uma média das porcentagens e desta forma calculado o volume tumoral.

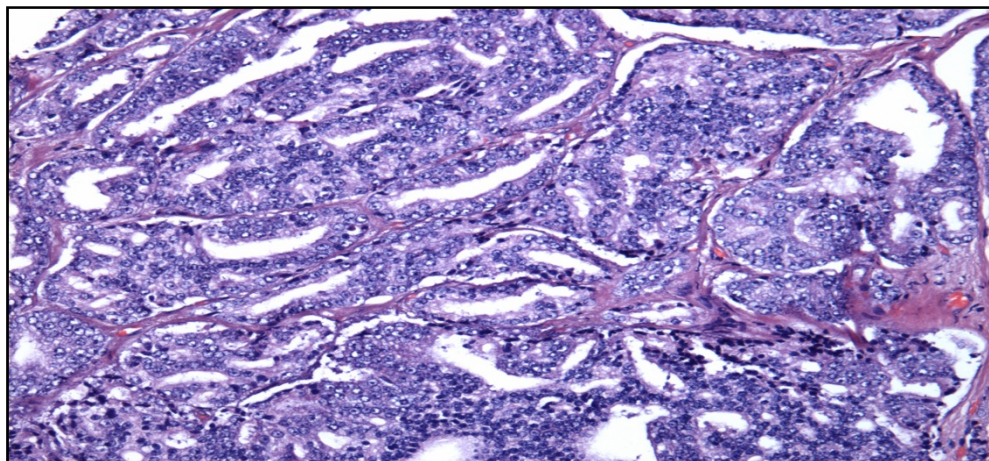
A invasão da cápsula prostática foi descrita quando à microscopia ótica constatada invasão tumoral na superfície prostática, classificada como invasão focal ou extensa extraprostática, de acordo com a extensão desta invasão. Esta extensão não foi dimensionada, assim como não foi avaliado o escore de Gleason destas margens, pois os relatórios anatomopatológicos à época das cirurgias, não incluíam estes dados apenas referindo invasão capsular como sendo focal ou extensa extraprostática. As margens uretral, vesical e circunferencial (prostática) foram relatadas como sendo MCP quando comprometidas ou margens cirúrgicas negativas (MCN) quando livres do comprometimento neoplásico.

Os canais deferentes, as vesículas seminais, e os gânglios linfáticos foram igualmente seccionados e estudados. A próstata teve em média 54 lâminas confeccionadas por caso. Exemplo do laudo anatomopatológico (Anexo 2).

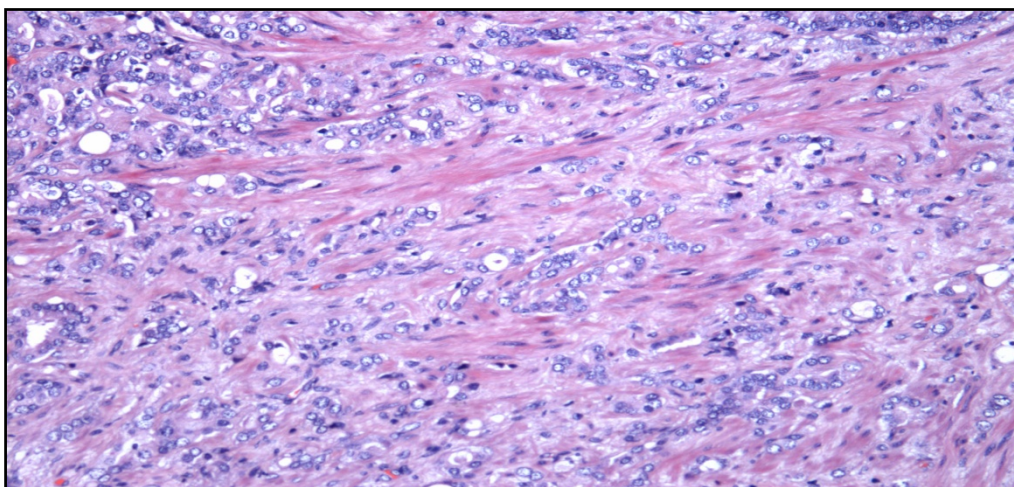
Foi realizada revisão de todas as lâminas encontradas correspondentes aos pacientes da nossa casuística, nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, revistas por duas patologistas (Prof. Dra. Isabela Werneck da Cunha e Dra. Stephania Martins Bezerra) para a reclassificação e graduação histológica das neoplasias de acordo com o consenso da ISUP (KOFF 2005), e graduação de Gleason para carcinomas de próstata, modificada por EPSTEIN (2010) (Figuras 4, 5, 6). Após esta revisão, foram selecionados os blocos de parafina guardados no Banco de Tecidos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center contendo fragmentos tumorais da peça operatória, correspondentes a cada lâmina escolhida, que tiveram as áreas mais representativas destes tumores demarcadas para perfuração e construção de um micro arranjo de tecido (TMA).



**Figura 4** - Adenocarcinoma da próstata - Padrão celular Gleason 3. Coloração Hematoxilina Eosina. Objetiva com aumento de 20x



**Figura 5** - Adenocarcinoma da próstata - Padrão celular Gleason 4. Coloração Hematoxilina Eosina. Objetiva com aumento de 20x



**Figura 6** - Adenocarcinoma da próstata - Padrão celular Gleason 5. Coloração Hematoxilina Eosina. Objetiva com aumento de 20x

### 3.2.2 Construção do Array de Tecido

O TMA foi construído utilizando-se o dispositivo técnico chamado “manual tissue microarrayer, Model MTA-I” (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, Wisconsin, EUA). A área identificada no bloco de parafina doador foi puncionada duas vezes com agulha de 1 mm e os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco de parafina receptor. Um mapa para identificação detalhada de cada cilindro foi construído em planilha de Excel®, permitindo a localização precisa de cada caso (Anexo 4).

Um caso foi definido como adequado quando o corte resultante ocupava pelo menos 25% da área total do cilindro. Foram realizados doze cortes sequenciais de 4 µm de espessura, que foram colhidos em lâminas da marca “*Star Frost*” com carga positiva, e deixados em estufa a 60° por 24 horas para melhor adesão. O controle do número de casos avaliáveis foi realizado pela coloração de uma lâmina no início do bloco e outra ao fim dos doze cortes sequenciais.

### 3.2.3 Imunoistoquímica

Os cortes obtidos foram submetidos à técnica imunoistoquímica para detecção dos marcadores listados no Quadro 3. Foram realizadas as reações em duplicata. Considerando-se que os casos foram alocados no TMA em duplicata, o mesmo caso foi analisado em seis secções diferentes garantindo a heterogeneidade do tumor. Embora não haja consenso sobre o número ideal de fragmentos amostrados, recomenda-se comumente a coleta de mais de um fragmento por caso, no intuito de menor perda de casos e



maior representatividade (HOOS et al. 2001). Optamos por duas amostras por paciente, pois é comprovado que a análise imunoistoquímica de duas amostras em TMA é comparável ao observado na secção tecidual em 95% das vezes (CAMP et al. 2000).

**Quadro 3** - Anticorpos, clones, origens e diluições utilizadas

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição	Controle
iNos/NosType II	policlonal	BD- Transduction	PA-pH6- 1/400	pulmão normal
COX-2	4H12	Novocastra	PA-pH6- 1/2000	COX-2
GLUT1	policlonal	Dako	PA- pH6- 1/500	Glut-1
Nitrotirosina	1A6	Cell Signaling	PA-pH6- 1/500	pâncreas

A desparafinização dos cortes foi realizada com três banhos sucessivos de Xilol por 5 minutos cada, em temperatura ambiente. A re-hidratação foi obtida em quatro banhos sucessivos de Etanol a 100%, a 95%, a 80% e a 70%, respectivamente, durante 30 segundos cada um. As lâminas foram enxaguadas em água corrente e destilada. A recuperação antigênica foi realizada por calor em banho-maria, com solução de EDTA/TRIS pH 9,0 a 96°C por 40 minutos, ou em panela de pressão elétrica, com solução de citrato pH 6,0 a 125°C por 10 minutos após-pressurização. Após resfriamento, as lâminas foram lavadas novamente em água corrente e destilada. A peroxidase endógena foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio a 10 vol), com três trocas de 10 minutos cada. Nova lavagem em água corrente destilada e na sequência um banho com solução salina tamponada com fosfatos (*PBS-Phosphate buffered saline*) 10 mM pH

7,4 por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente, com diluição prévia estabelecida para cada marcador. Após incubação, as lâminas foram lavadas com PBS, três trocas de 5 minutos cada.

Para detecção da reação antígeno-anticorpo, foi utilizado o sistema polimérico, livre de biotina (*Kit Novolink Max polymer* – Novocastra, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) com incubação de 30 minutos para o reagente pós-primário, seguido de lavagem em PBS, e incubação de 30 minutos com HRP-*polymer* em temperatura ambiente. Após incubação, foram realizadas lavagens em PBS. A revelação da reação foi realizada com incubação por 5 minutos em solução substrato com o cromógeno 3,3 Diaminobenzidine líquido (DAB – Dako, Glostrup, Denmark) seguida de lavagem em água corrente.

A Hematoxilina de Harris (Merck®) foi utilizada para contra-coloração por 5 minutos, retirado o excesso e lavada em água corrente. Na sequência, as lâminas foram desidratadas com banhos sucessivos de Etanol a 80%, a 95%, a 100%, por 30 segundos cada um, e em quatro banhos de Xilol de 30 segundos cada, montadas com filme no equipamento TissueTek (Sakura Finetek INC, USA).

A fidelidade das lâminas sempre foi atestada através de controles positivos em tecidos sabidamente positivos para os anticorpos estudados e de controle negativos, obtidos pela omissão dos anticorpos primários. A contagem foi realizada de forma manual, utilizando algoritmo pré-estabelecido. Este algoritmo classifica a reação em quatro graus, levando-se

em consideração a intensidade da reação observada no citoplasma, uma vez que houve homogeneidade da reação em todas as células tumorais, ou seja, a positividade, quando presente, estava em todas as células tumorais representadas na amostra. Quando não se observou reação alguma, pontuou-se 0 pontos; quando houve marcação fraca nas células neoplásicas, foi pontuado 1; a marcação moderada foi considerada 2; e a forte 3. Convencionamos em nossa tabela de pontuação da expressão, anotar a de maior valor, pelo fato de termos feito em duplicidade as lâminas a serem analisadas, obtendo portanto duas pontuações de diferentes valores em diferentes áreas representativas do tumor no mesmo caso. Em todos os casos foram analisadas as reações. Para procedermos às correlações das expressões imunoistoquímicas com as demais variáveis, e para equacionar a desigualdade entre os achados, devido a distribuição francamente positiva em relação à negativa da iNOS, GLUT1 e Nitrotirosina, consideramos todos os casos como tendo expressão negativa e positiva fraca ou com expressão positiva moderada e forte, inclusive na reação do COX-2.

#### **3.2.4 Dados Demográficos, Clínicos e Anatomopatológicos**

Dentre os 162 pacientes estudados, o grupo com margens cirúrgicas positivas (MCP) contabilizou 110 pacientes, onde a idade variou entre 43 e 78 anos (média 61,20); a dosagem plasmática do PSA pré-operatório apresentou índices entre 2,5 e 78,8 ng/ml (média 9,32 ng/ml); o peso da próstata variou entre 20 e 167 g (média 43,26 g); e o volume tumoral foi avaliado entre 0,5 e 80% do volume total da glândula prostática (média

15,77%). O escore de Gleason variou entre 4 a 9 sendo agrupado como <7 em 38 casos (35%); igual a 7 em 57 (52%); e >7 em 15 (13%).

Na admissão, foram considerados como pacientes em estágio clínico  $\leq T2$  64 pacientes (58%) e como  $\geq T2a/b$  46 (42%). O estágio patológico revelou sendo  $\leq T2b$  em 4 casos (4%) e  $\geq T2b$  em 106 (96%).

A invasão perineural foi relatada como presente em 77 casos (70%); presente e extensa em 10 (9%); e ausente em 23 (21%).

A invasão angiolinfática foi relatada como presente em 12 casos (11%) e ausente em 98 (89%).

A invasão da cápsula prostática foi relatada como focal em 50 casos (45%); extensa extracapsular em 24 (22%); e ausente em 36 (33%).

As margens cirúrgicas positivas únicas foram relatadas em localização prostática circunferencial em 51 casos (46,3%), uretral em 16 (14,5%), vesical em 6 (5,4%), e em musculatura estriada em 2 casos (1,8%). As margens cirúrgicas positivas múltiplas foram mais frequentes em localização uretral mais prostática com 13 casos (11,8%) (Tabela 1).

O seguimento destes pacientes teve um prazo mínimo de 23,72 meses, máximo de 196,45 e média de 72,77 meses.

RB ocorreu neste grupo em 43 casos (39%), e não ocorreu em 67 (61%) sendo que recidiva clínica ocorreu em 6 casos (5%).

O grupo controle, com margens cirúrgicas negativas (MCN) teve 52 casos, sendo que a idade variou entre 49 e 75 anos (média 61,29); a dosagem plasmática do PSA pré-cirúrgico apresentou índices entre 3,26 e 20,5 ng/ml (média 5,87 ng/ml); o peso da próstata variou entre 17,5 e 145 g

(média 40,25 g); o volume tumoral foi avaliado entre 1 e 12% do volume total da próstata (média 2,1%). O escore de Gleason variou entre 4 e 8 sendo agrupado como <7 em 27 casos (52%); 7 em 19 (37%) ; e >7 em 6 (12%).

Na admissão foram considerados como pacientes em estágio clínico  $\leq$  T2 38 pacientes (73%) e como  $\geq$ T2a/b 14 (27%). O estágio patológico revelou sendo <T2b em 47 casos (90%) e  $\geq$ T2b em 5 (10%). A invasão perineural foi relatada como presente em 20 casos (38%); presente e extensa em nenhum caso e ausente em 32 casos (62%).

**Tabela 1** - Distribuição das margens cirúrgicas

<b>Margens</b>	<b>Categorias</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Presença de margens	Não	52	32
	Sim	110	68
Local da margem	4	51	46,3
	4 – prostática	16	14,5
	7 - uretral	6	5,4
	8 – vesical	2	1,8
	9 – mm. estriado	13	11,8
		48	5
		49	3
		78	6
		478	5
		479	2
	789	1	
Número de margens	0	52	32
	1	75	46
	2	27	17
	3	8	5
Quantidade das margens	Nenhuma	52	100
	Única	75	68,2
	Múltiplas	35	31,8

A invasão angiolinfática foi relatada em presente em 1 casos (2%) e ausente em 51 (98%). Houve invasão focal da cápsula prostática em 4 casos (7,69%); extensa extracapsular em nenhum caso e ausente em 48 casos (92,3 %). O seguimento destes pacientes teve um prazo mínimo de 23,91 meses, máximo de 144,47 com média de 53,94 meses.

RB ocorreu em 4 casos (7,69%), e não ocorreu em 48 (92,3%), sendo que recidiva clínica não ocorreu em nenhum dos 52 casos (100% ) (Tabelas 2 e 3). As médias das variáveis quantitativas de todos os casos estudados estão expressas na Tabela 4.

**Tabela 2** - Distribuição das variáveis quantitativas de acordo com presença de MCP ou MCN (n=162)

Variável	Margens	N	Média	dp	Mín	Mediana	Máx
Idade (anos)	Não	52	61,29	7,22	49	59,5	75
	Sim	110	61,20	7,43	43	62	78
PSA (ng/ml)	Não	52	5,87	3,26	2,21	5,225	20,5
	Sim	110	9,32	8,97	2,5	6,53	78,8
Volume (% próstata)	Não	52	2,64	1,91	1	2,1	12
	Sim	110	15,77	14,01	0,5	12,35	80
Peso (g)	Não	52	49,76	23,03	17,5	42	144,5
	Sim	110	43,26	18,32	20	40,25	167
Seguimento (meses)	Não	52	53,94	26,60	23,91	45,92	144,47
	Sim	102	72,77	36,25	23,72	65,51	196,45

**Tabela 3** - Frequências absolutas e relativas das variáveis demográficas, clínicas e patológicas de acordo com presença de margens cirúrgicas positivas e negativas (n=162 casos)

Variáveis	Categorias	Margens		Total
		negativas n (%)	positivas n (%)	
Idade (anos)	<50	2 (4)	11 (10)	13
	50-60	27 (52)	37 (34)	64
	60-70	16 (31)	48 (44)	64
	>70	7 (13)	14 (13)	21
Peso (g)	<20	1 (2)	1 (1)	2
	20-40	21 (40)	54 (49)	75
	40-60	20 (38)	45 (41)	65
	>60	10 (19)	10 (9)	20
Escore de Gleason	<7	27 (52)	38 (35)	65
	7	19 (37)	57 (52)	76
	>7	6 (12)	15 (14)	21
PSA (ng/ml)	<10	48 (92)	81 (74)	129
	10-20	3 (6)	20 (18)	23
	>20	1 (2)	9 (8)	10
Volume tumoral (% vol. próstata)	<10	51 (98)	50 (45)	101
	10-30	1 (2)	47 (43)	48
	>30	0 (0)	13 (12)	13
Estádio patológico	≥pT2b	5 (10)	106 (96)	111
	≤pT2a	47 (90)	4 (4)	51
Estádio clínico	≤T2b	38 (73)	64 (58)	102
	≥T2b	14 (27)	46 (42)	60
Invasão perineural	Não	32 (62)	23 (21)	55
	Sim	20 (38)	77 (70)	97
	Extensa	0 (0)	10 (9)	10
Invasão angiolinfática	Não	51 (98)	98 (89)	149
	Sim	1 (2)	12 (11)	13
Invasão capsular	Não	48 (92)	36 (33)	84
	Focal	4 (8)	50 (45)	54
	Extensa	0 (0)	24 (22)	24
Recidiva bioquímica	Não	48 (92)	67 (61)	115
	Sim	4 (8)	43 (39)	47
Recidiva clínica	Não	52 (100)	104 (95)	156
	Sim	0 (0)	6 (5)	6

**Tabela 4** - Médias das variáveis quantitativas (MCP+MCN) (n=162)

<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>dp</b>	<b>Mín</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máx</b>
Idade (anos)	162	61,23	7,34	43	61	78
PSA (ng/ml)	162	8,22	7,77	2,21	6,08	78,8
Volume (%vol t)	162	11,55	13,11	0,5	6,95	80
Peso (g)	162	45,35	20,11	17,5	41,5	167
Seguimento(m)	154	66,41	34,39	23,72	59,36	196,45

Como a RC só ocorreu em 6 casos (5%) nos pacientes com margens positivas, e em nenhum caso em pacientes com margens negativas, optamos por considerar somente as sobrevidas livres de RB como válidas para as correlações e análises estatísticas.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis serão apresentadas em tabelas com as respectivas distribuições de frequências ou com as principais medidas resumo. A associação entre as variáveis clínicas ou das variáveis anatomopatológicas com a presença ou ausência de margens será verificada com teste qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher.

Para estudar os tempos de sobrevida global e os tempos de RB, recidiva clínica, e sobrevida livre de doença utilizou-se o estimador de Kaplan-Meier como ferramenta para estimar a probabilidade de um paciente com CaP não apresentar recidiva até o instante de tempo considerado. Para a comparação das curvas utilizou-se o teste não paramétrico de LogRank . O nível de significância adotado foi o de 5% e os cálculos, gráficos e testes



foram construídos com o auxílio do software estatístico livre R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org))

A regressão logística múltipla será empregada para a avaliação dos fatores preditivos para a recorrência bioquímica ou clínica do CaP.

O modelo de riscos proporcionais de Cox será utilizado para avaliar quais fatores afetam os tempos de sobrevida livre de RB e clínica. O risco para recorrência será estimado através do “*hazard ratio*” obtido do modelo de Cox. Eventuais adaptações nos testes estatísticos poderão ser consideradas na análise final dos resultados.

## **4 RESULTADOS**

Nos 110 pacientes com margens cirúrgicas positivas o período de seguimento variou de 24 a 196 meses, com média de 73 e mediana de 65 meses. Ao final, 43 (39%) pacientes tiveram RB, enquanto que 67 (61%) pacientes permaneceram vivos sem doença, 6 (5,45%) apresentaram recidiva clínica, 2 (1,82%) morreram em decorrência da neoplasia, e 6 (5,45%) morreram de outras causas.

Nos 52 pacientes com margens cirúrgicas negativas, o período de seguimento variou de 24 a 144 meses, com média de 54 e mediana de 46 meses. Ao final, 4 (7,69%) pacientes tiveram RB, enquanto que 48 (92,3%) permaneceram vivos sem doença e nenhum apresentou recidiva clínica.

### **4.1 IMUNOISTOQUÍMICA**

As reações imunoistoquímicas foram classificadas de acordo com a interpretação das patologistas, como negativas ou positivas fraca, moderada ou de forte intensidade em todos os casos estudados.

Observamos que a imunorreatividade da iNOS foi negativa em 13 casos (8%), positiva fraca em 79 (49%), moderada em 51 (31%) e forte em 16 (10%), não sendo avaliável em 3 casos (2%). (Figura 7)

Para o COX-2 foi negativa em 82 casos (51%), positiva fraca em 57 (35%), moderada em 14 (9%), e forte em 2 (1%), não sendo avaliável em 7 casos (4%). (Figura 8)

Para a GLUT 1 foi negativa em 2 casos (3%), positiva fraca em 71 (44%), moderada em 61 (38%), e forte em 22 (14%), não sendo avaliável em 6 casos (4%). (Figura 9)

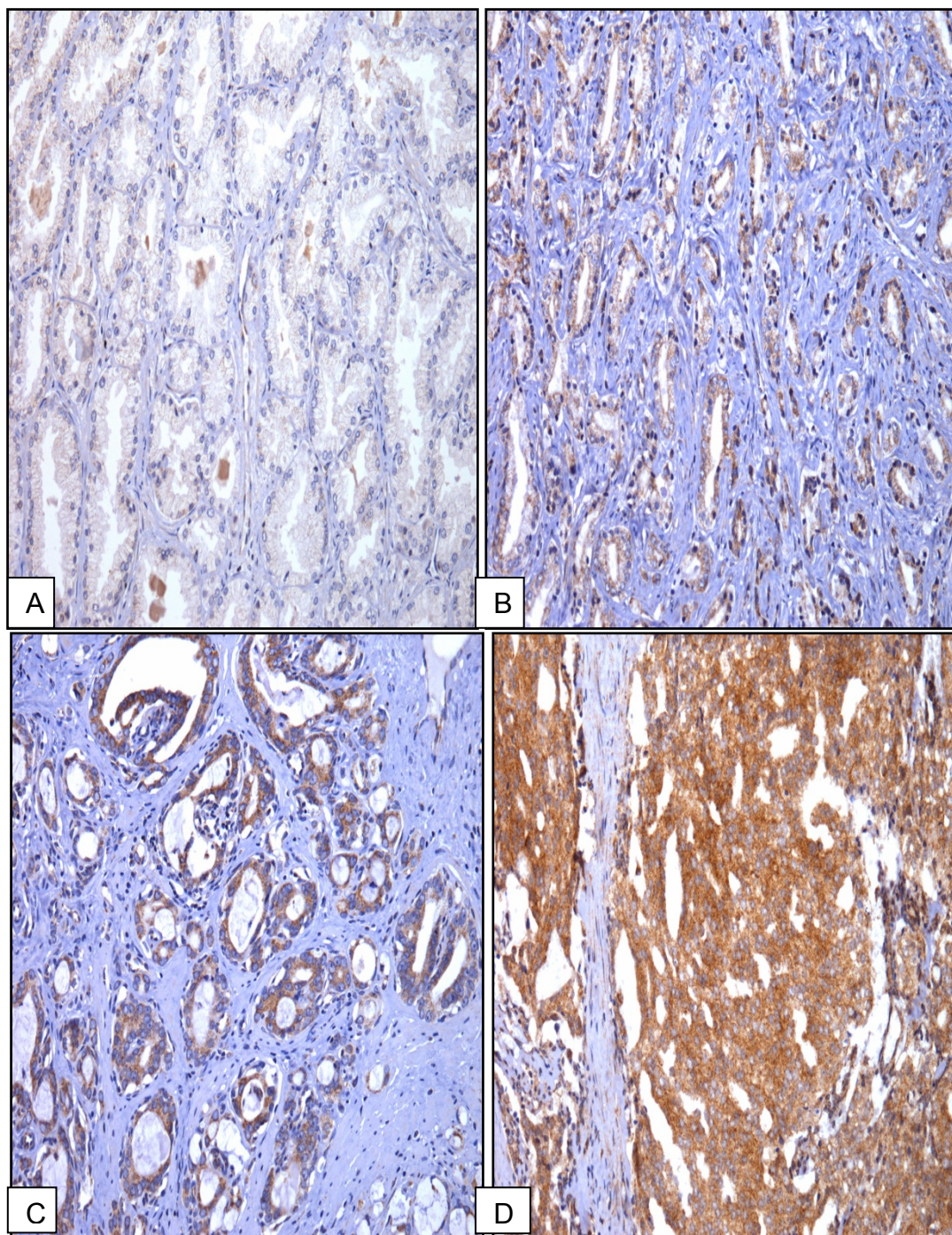
Para a Nitrotirosina, observamos que foi negativa em 5 casos (3%), positiva fraca em 83 (51%), moderada em 58 (36%), e forte em 12 (7%), não sendo avaliável em 4 casos (2%).(Figura 10)

Em todos os casos as positivities das expressões ocorreram no citoplasma e estão representadas na Tabela 5.

**Tabela 5** - Reações imunoistoquímicas nas amostras de CaP (n=162)

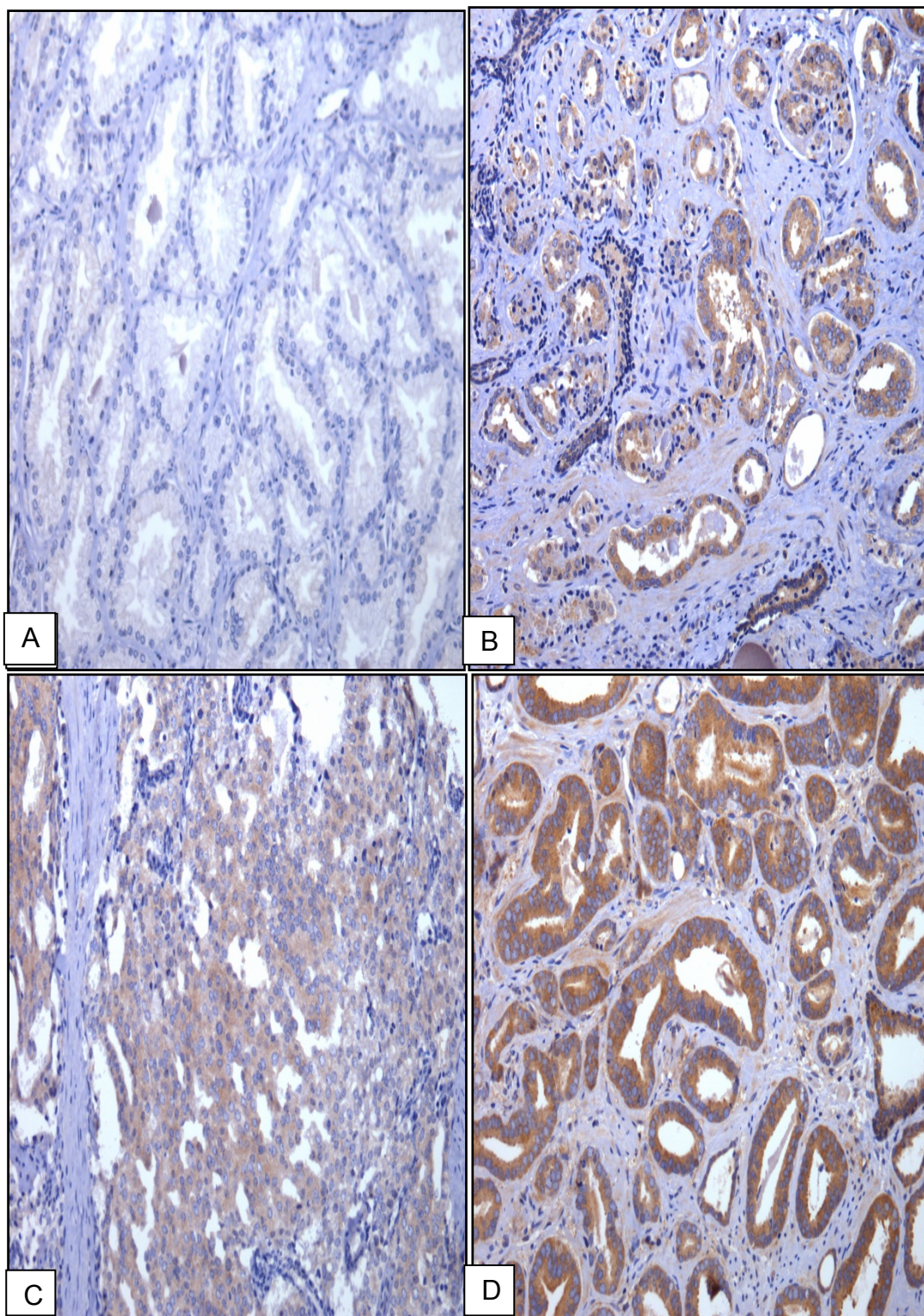
<b>Marcador</b>	<b>Negativa</b> N(%)	<b>Positiva fraca</b> N(%)	<b>Positiva moderada</b> N(%)	<b>Positiva forte</b> N(%)	<b>Não avaliados</b> N(%)
iNOS	13 (8)	79(49)	51 (31)	16(10)	3 (2)
COX-2	82 (51)	57 (35)	14 (9)	2 (1)	7 (4)
GLUT1	2 (1)	71 (44)	61 (38)	22 (14)	6 (4)
Nitrotirosina	5 (3)	83 (51)	58 (36)	12 (7)	4 (2)

Como observamos nas expressões de iNOS, GLUT 1 e Nitrotirosina, elevado número de casos positivos, 92%, 98% e 95% respectivamente, para a análise estatística convencionamos então agrupar as imunorreatividades dos quatro biomarcadores em 2 categorias: negativa/fraca positiva; e positiva moderada/forte.



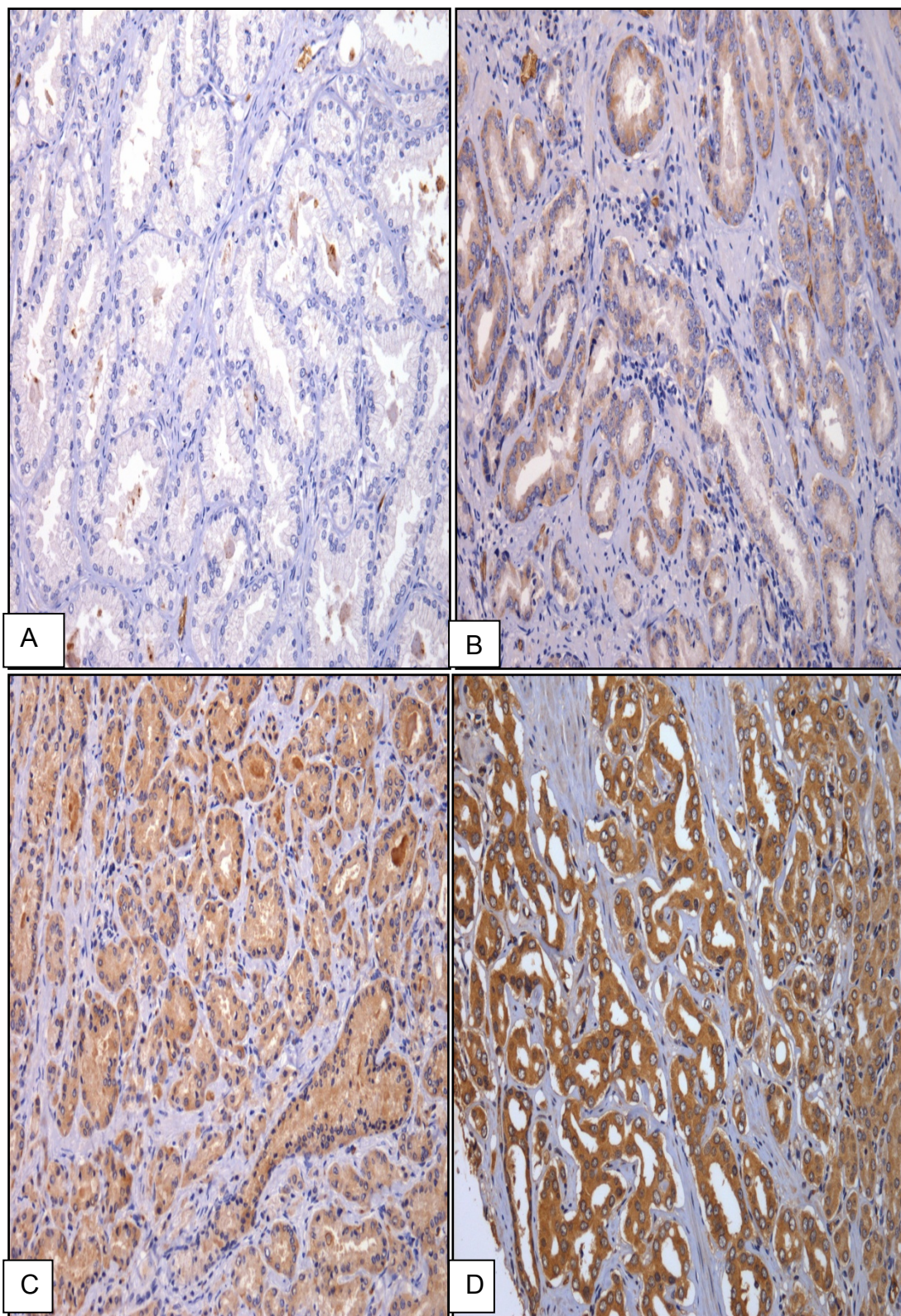
**Figura 7** - Expressão da iNOS. Negativa (A), e positiva com intensidade fraca (B), moderada (C), e forte (D) no citoplasma das células de CaP. Objetiva com aumento de 20x





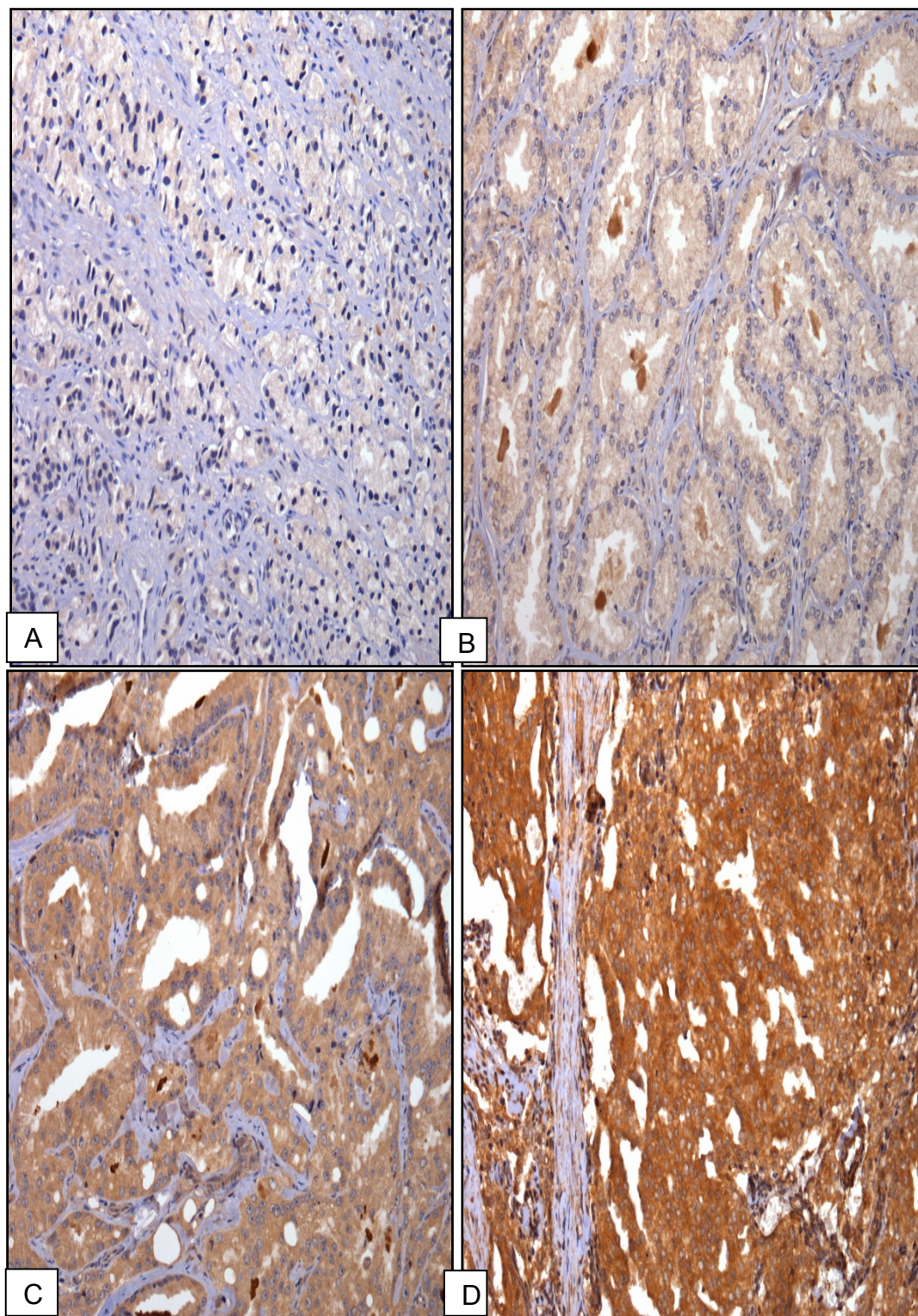
**Figura 8** - Expressão da COX-2. negativa (A), e positiva com intensidade fraca (B), moderada (C), e forte (D) no citoplasma das células de CaP. Objetiva com aumento de 20x





**Figura 9** - Expressão da GLUT1. Negativa (A), e positiva com intensidade fraca (B), moderada (C), e forte (D) no citoplasma das células de CaP. Objetiva com aumento de 20x





**Figura 10** - Expressão de Nitrotirosina. Negativa (A), e positiva com intensidade fraca (B), moderada (C), e forte (D) no citoplasma das células de CaP. Objetiva com aumento de 20x.

## 4.2 ANÁLISE DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE INOS, COX-2, GLUT1 E NITROTIROSINA E RECIDIVA BIOQUÍMICA EM PACIENTES COM MARGENS CIRÚRGICAS POSITIVAS

As imunoexpressões da iNOS, COX-2, GLUT1, e Nitrotirosina não apresentaram associação com RB em pacientes com margens cirúrgicas positivas ( $p=0,3646$ ;  $p=0,1457$ ;  $p=0,4414$  e  $p=0,0806$ , respectivamente) (Tabela 6). Para expressões da COX-2 pela diferença na amostragem, em análise separada, as reatividades foram agrupadas em: negativos e positivos, sendo que os resultados também não demonstraram associação com a RB.

**Tabela 6** - Associação da imunoexpressão de iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina e RB em CaP com MCP (n=110)

Marcador	Expressão	Recidiva bioquímica		Total	p
		Não N(%)	Sim N(%)		
iNOS	Negativo/fraco	41 (61)	22 (52)	63	0,3646
	Moderado/forte	26 (39)	20 (48)	46	
COX-2	Negativo/fraco	61 (94)	35 (85)	96	0,1457
	Moderado/forte	4 (6)	6 (15)	10	
GLUT1	Negativo/fraco	31 (48)	16 (40)	47	0,4414
	Moderado/forte	34 (52)	24 (60)	58	
Nitrotirosina	Negativo/fraco	36 (55)	16 (38)	52	0,0806
	Moderado/forte	29 (45)	26 (62)	55	



### 4.3 ANÁLISE DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE EXPRESSÕES DA iNOS, COX-2, GLUT1 E NITROTIROSINA E RECIDIVA BIOQUÍMICA EM PACIENTES COM MARGENS CIRÚRGICAS NEGATIVAS

As expressões da iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina não apresentaram associação com RB em 52 pacientes com margens cirúrgicas negativas ( $p=0,8492$ ;  $p=0,987$ ;  $p=0,6312$ ;  $p=0,7115$ , respectivamente) (Tabela 7).

**Tabela 7** - Associação da imunoexpressão de iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina e RB em CaP com MCN (n=52)

Marcador	Expressão	Recidiva bioquímica		Total	p
		Não N(%)	Sim N(%)		
iNOS	Negativo/fraco	27 (59)	2 (50)	29	0,8492
	Moderado/forte	19 (41)	2 (50)	21	
COX-2	Negativo/fraco	39 (87)	4 (100)	43	0,987
	Moderado/forte	6 (13)	0 (0)	6	
GLUT1	Negativo/fraco	24 (51)	2 (50)	26	0,6312
	Moderado/forte	23 (49)	2 (50)	25	
Nitrotirosina	Negativo/fraco	34 (72)	2 (50)	36	0,7115
	Moderado/forte	13 (28)	2 (50)	15	

#### 4.4 ANÁLISE DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE INOS, COX-2, GLUT1 E NITROTIROSINA; GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DE GLEASON; E RECIDIVA BIOQUÍMICA NOS 162 PACIENTES (MCP+MCN)

Pela importância do fator do escore de Gleason no prognóstico da evolução tumoral, relacionamos as imunexpressões da iNOS, COX-2, Glut 1 e Nitrotirosina com os diversos graus do escore de Gleason do CaP e recidiva bioquímica em todos os 162 casos.

Observamos que não houve associação das expressões dos biomarcadores com o grau histológico do tumor.

Associação significativa foi observada entre escore de Gleason e a RB, sendo que quanto maior este escore, maior a ocorrência de RB (Tabela 8).

**Tabela 8** - Análise das expressões da iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina e RB pelo escore de Gleason (n=162 casos)

Variável	Categoria	Escore de Gleason				Total	p
		≤6 N(%)	7 (3+4) N(%)	7 (4+3) N(%)	≥8 N(%)		
Recidiva bioq.	Não	57 (88)	26 (74)	25 (61)	7 (33)	115	<0,001
	Sim	8 (12)	9 (26)	16 (39)	14 (67)	47	
iNOS	Negativo/fraco	41 (65)	19 (54)	21 (52)	11 (52)	92	0,5202
	Moderado/forte	22 (35)	16 (46)	19 (48)	10 (48)	67	
COX-2	Negativo/fraco	56 (90)	31 (91)	34 (85)	18 (95)	139	0,6637
	Moderado/forte	6 (10)	3 (9)	6 (15)	1 (5)	16	
GLUT1	Negativo/fraco	29 (47)	13 (38)	19 (48)	12 (60)	73	0,4919
	Moderado/forte	33 (53)	21 (62)	21 (52)	8 (40)	83	
Nitrotirosina	Negativo/fraco	41 (64)	19 (56)	16 (40)	12 (60)	88	0,1136
	Moderado/forte	23 (36)	15 (44)	24 (60)	8 (40)	70	

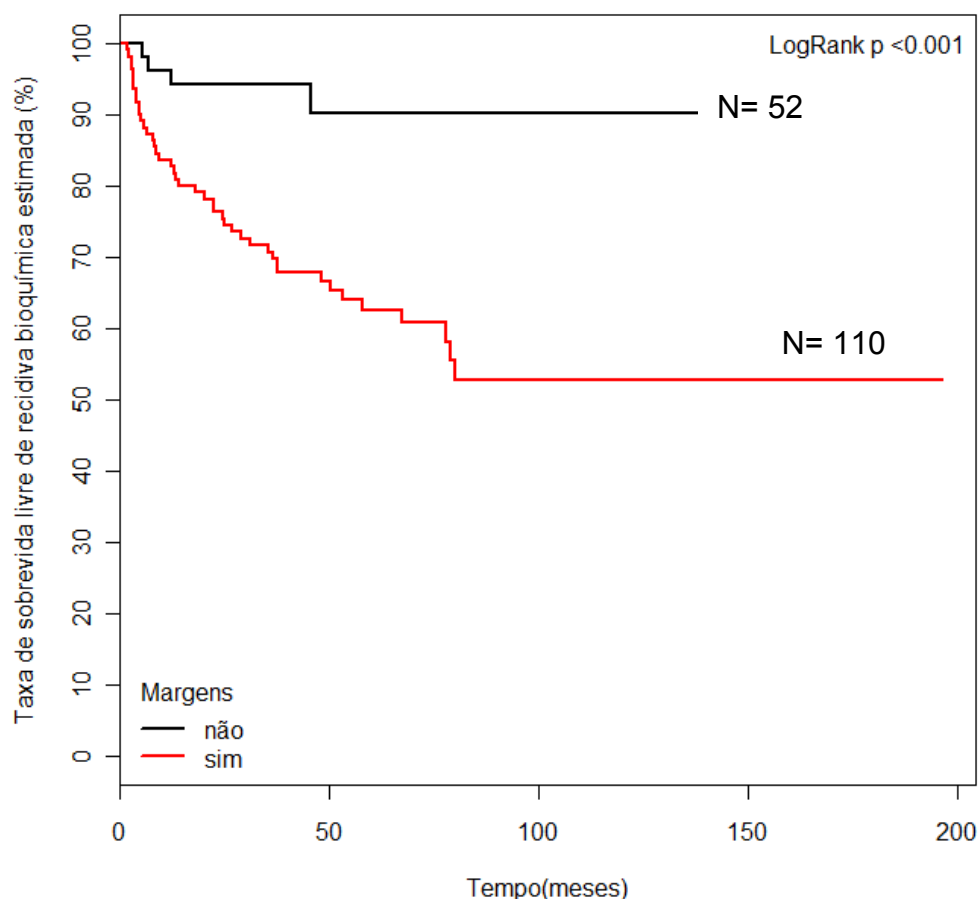
#### 4.5 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA BIOQUÍMICA AOS 5 E 10 ANOS DE SEGUIMENTO EM TODOS CASOS (MCP+MCN)

Relacionamos as taxas de sobrevida livre de RB aos 5 e 10 anos de seguimento nos 162 casos com as variáveis clínicas, cirúrgicas, anatomopatológicas e imunoistoquímicas para análise uni e multivariada (Tabela 9).

**Tabela 9** - Taxas de sobrevida livre de RB de todos os pacientes (MCP+MCN) relacionadas com todas variáveis (n=162)

Variável	Categoria	N	SLRB – 5 anos (%)	SLRB – 10 anos (%)
Peso (g)	15-40	77	68	54
	40-60	65	73	73
	>60	20	71	71
Escore de Gleason	<7	65	92	76
	7	76	62	62
	>7	21	38	19
PSA (ng/ml)	≤10	129	78	67
	10-20	23	52	52
	≥20	10	20	20
Volume (%vol tumoral)	≤10	101	83	74
	10-30	48	57	48
	>30	13	31	31
Estádio patológico	pT2a	51	92	92
	≥pT2b	111	62	52
Invasão perineural	Não	55	89	89
	Sim	107	62	50
Invasão angiolinfática	Não	149	73	64
	Sim	13	46	46
Invasão capsular	Não	84	86	86
	Sim	78	56	44
Margens	Não	52	90	90
	Sim	110	63	53
iNOS	Negativo/fraco	92	71	60
	Moderado/forte	67	70	63
COX-2	Negativo/fraco	139	71	64
	Moderado/forte	16	68	51
GLUT1	Negativo/fraco	73	73	61
	Moderado/forte	83	71	62
Nitrotirosina	Negativo/fraco	88	79	64
	Moderado/forte	70	62	56

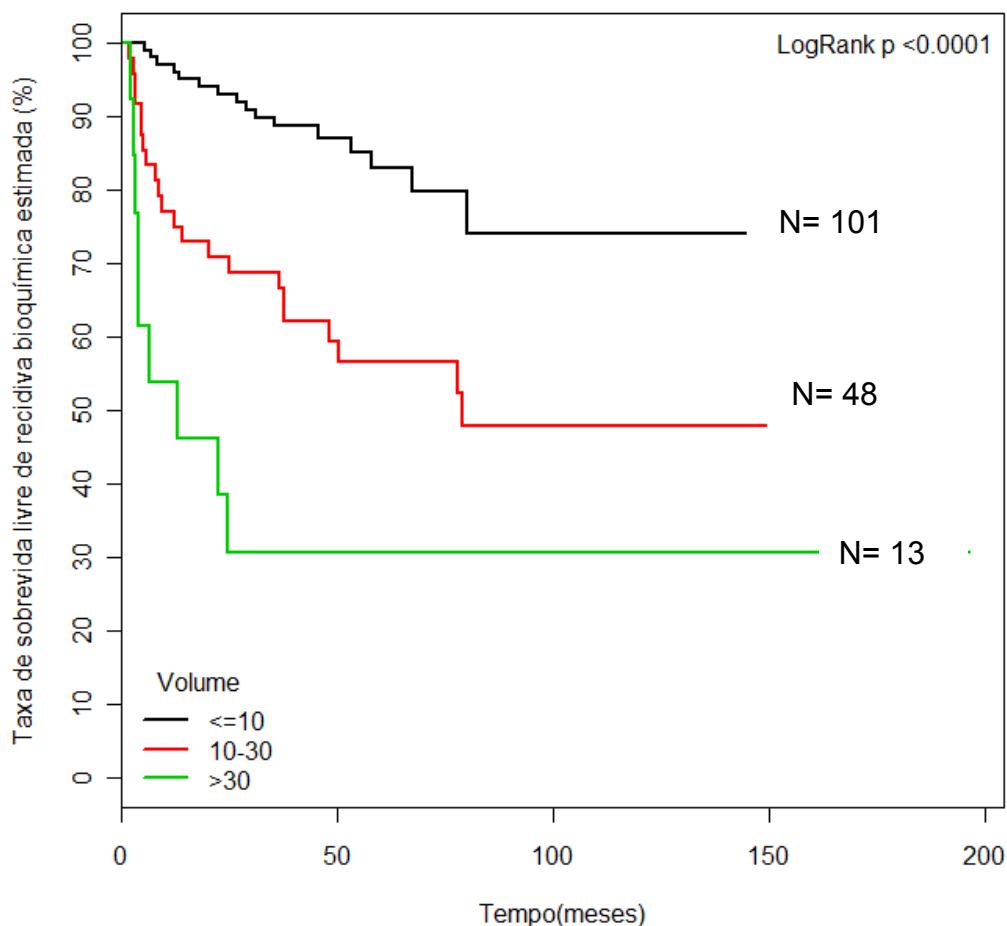
De acordo com as margens cirúrgicas, as taxas de sobrevida livre de RB quando as margens estavam negativas foram 90% aos 5 e 10 anos. E quando estavam positivas foram 63% e 53%, respectivamente (Figura 11).



**Figura 11** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com as margens cirúrgicas em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata

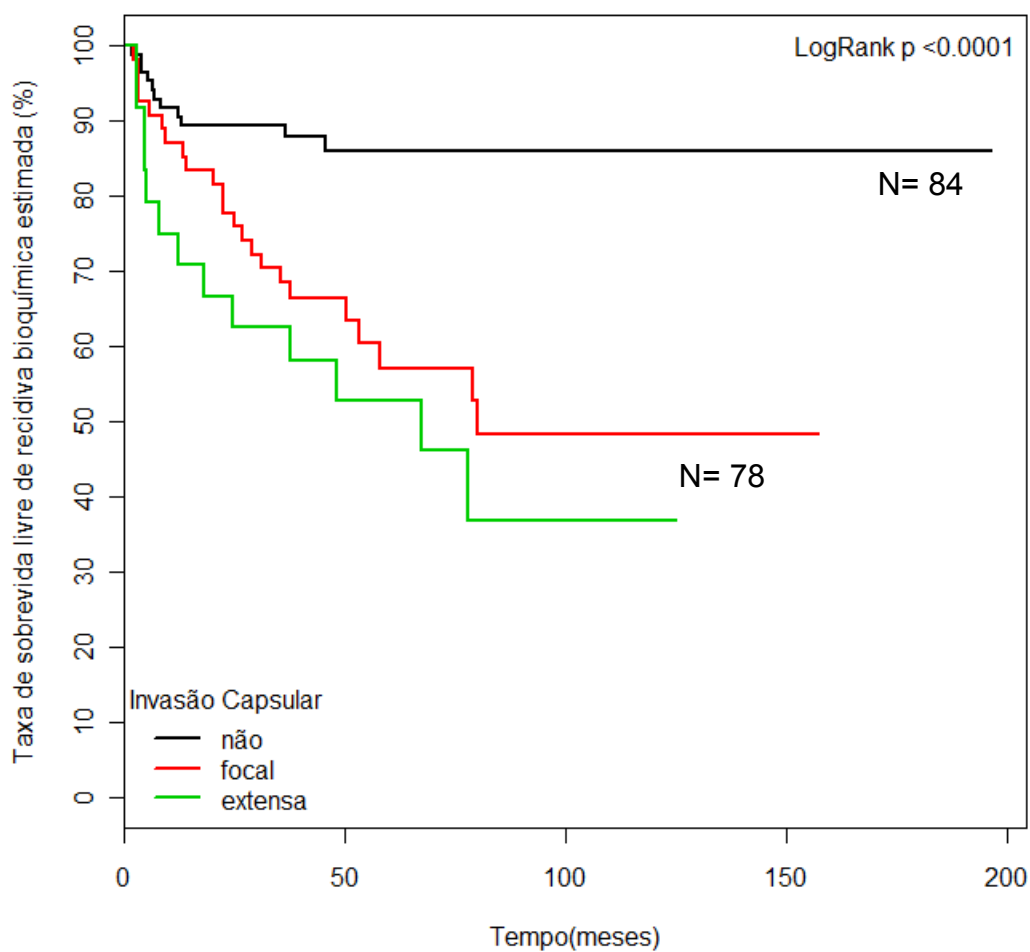
De acordo com o volume do tumor, quando este foi estimado em <10% do volume total do espécime, as taxas de sobrevida livres de RB aos 5 e 10 anos foram 83% e 73%, respectivamente. Quando entre 10 e 30% foi

57% e 48%, e quando maior que 30% do volume prostático foi 31% em 5 e 10 anos, respectivamente (Figura 12).



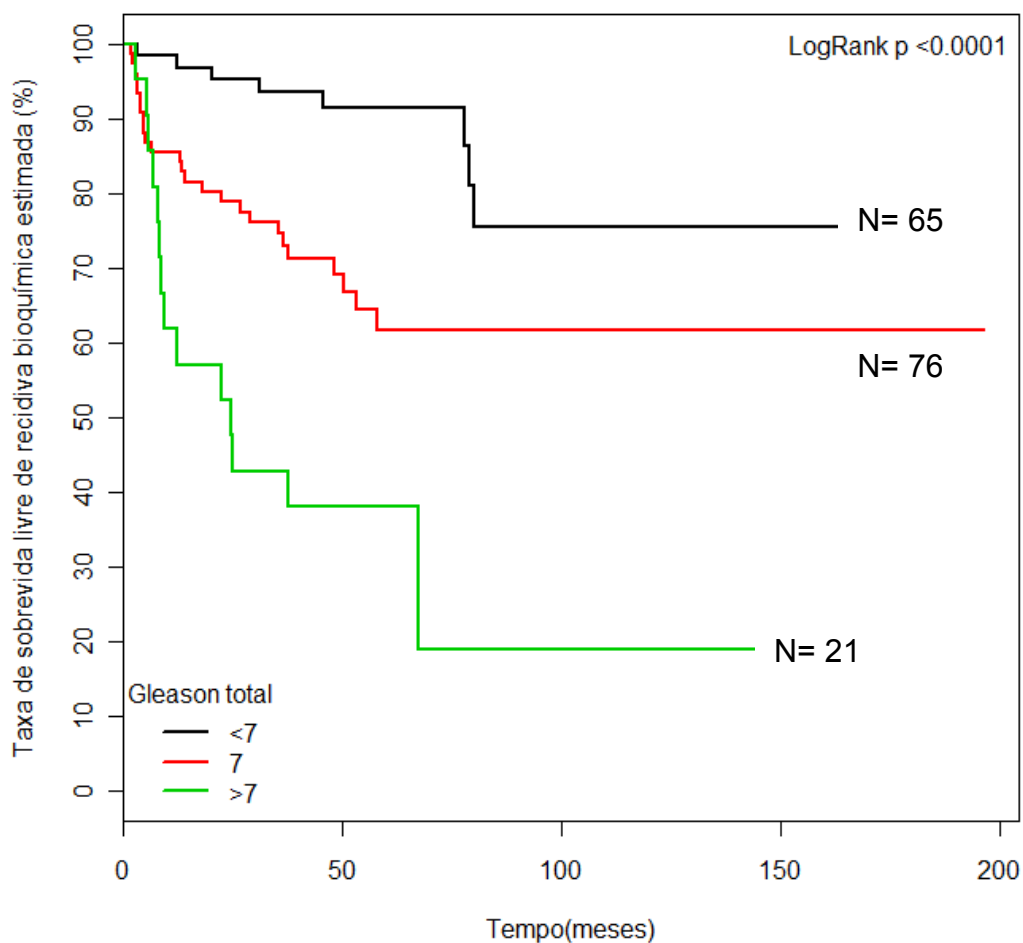
**Figura 12** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com o volume tumoral em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.

De acordo com a invasão da cápsula prostática, quando negativa as taxas de sobrevida livre de RB foram 86% aos 5 e aos 10 anos; quando presentes e focais foram 63% e 56%; e quando presentes e extensas foram 52% e 38%, respectivamente (Figura 13).



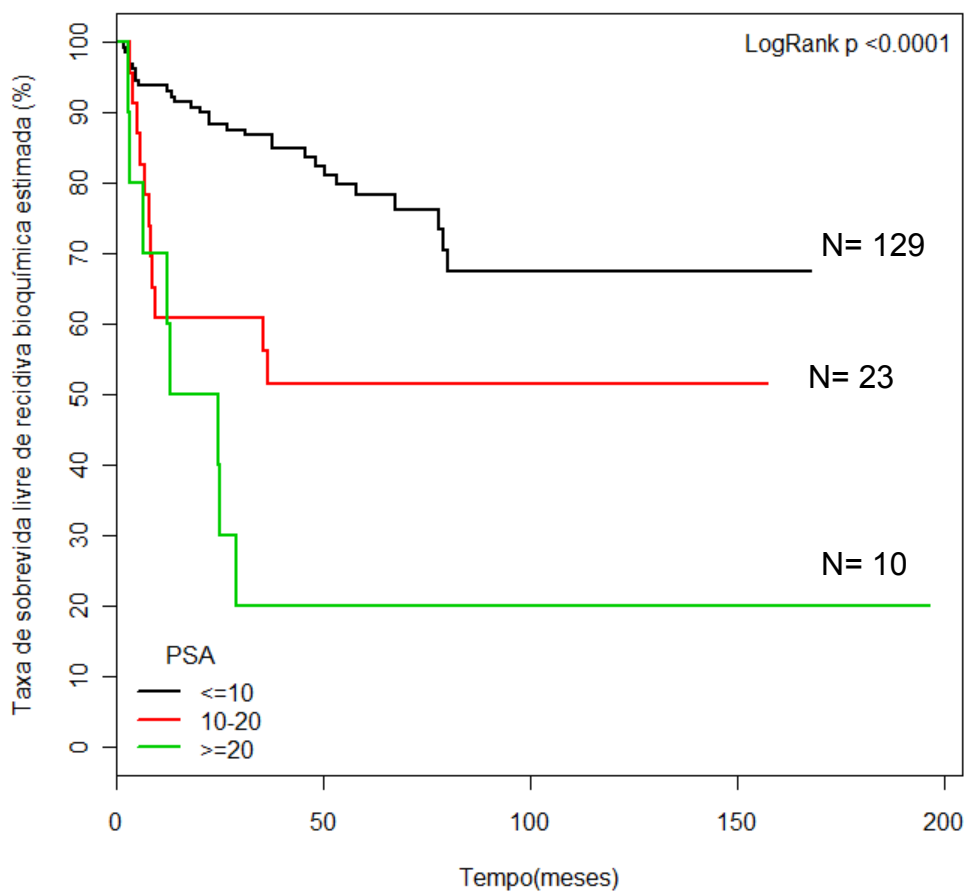
**Figura 13** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com a invasão da cápsula prostática em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.

De acordo com o escore de Gleason, quando menor que 7 as taxas de sobrevida livre de RB foram 92% e 76%, quando iguais a 7 (3+4 e 4+3) foram 62% e quando maiores que 7 foram 38% e 19% aos 5 e aos 10 anos, respectivamente (Figura 14).



**Figura 14** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com o escore de Gleason em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.

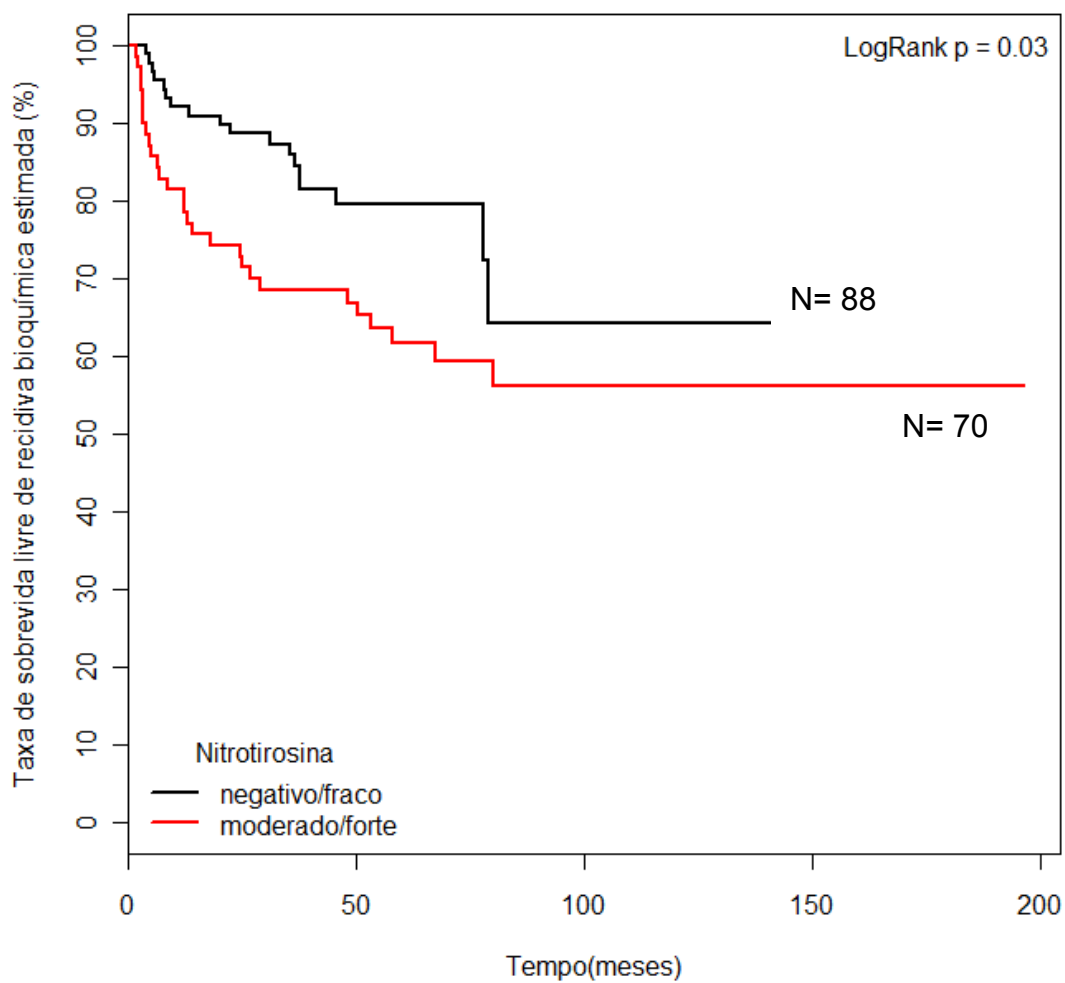
De acordo com a dosagem plasmática do PSA, quando  $\leq 10$  ng/ml as taxas de sobrevida livre de RB foram 78% e 67%; quando entre 10 e 20 ng/ml foram 52%; e quando  $\geq 20$  ng/ml foram 20% aos 5 e aos 10 anos, respectivamente (Figura 15).



**Figura 15** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com a dosagem plasmática do PSA em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.

De acordo com a Nitrotirosina, as taxas de sobrevida livre de RB aos 5 e aos 10 anos foram 79% e 64% quando sua expressão era negativa ou positiva fraca; e 62% aos 5 anos e 56% aos 10 anos, quando sua expressão foi positiva moderada ou forte. (Figura 16)





**Figura 16** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com a expressão imunohistoquímica da Nitrotirosina em 162 pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata

#### **4.6 ANÁLISE UNIVARIADA DA SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA BIOQUÍMICA DE ACORDO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS, CIRÚRGICAS, ANATOMOPATOLÓGICAS, E IMUNOISTOQUÍMICAS EM TODOS OS CASOS (MCP+MCN) (N=162 CASOS)**

Dentre as variáveis clínicas, cirúrgicas, anatomopatológicas e expressões dos biomarcadores, a análise univariada em todos os 162 casos estudados demonstrou que o escore de Gleason; o nível do PSA; o volume tumoral; o estágio patológico, a invasão capsular; e margens cirúrgicas positivas tiveram associação significativa com taxas de sobrevida livre de recidiva bioquímica ( $p < 0,001$ ). A expressão positiva da Nitrotirosina; a invasão angiolímfática; e a invasão perineural também tiveram significância, porém menor ( $p = 0,032$ ;  $0,017$ ;  $0,01$ , respectivamente) (Tabela 10).

**Tabela 10** - Análise univariada das taxas de sobrevida livre de RB de acordo com variáveis clínicas, cirúrgicas, anatomopatológicas e imunoistoquímicas (MCP+MCN) (n=162)

Variável	Categoria	N	RR	IC(95%)		p
Peso (g)	15-40	77	1(Ref)			
	40-60	65	0,71	0,38	1,32	0,531
	>60	20	0,76	0,29	1,99	
Escore de Gleason	<7	65	1(Ref)			
	7	76	3,36	1,51	7,47	<0,001
	>7	21	9,33	3,87	22,53	
PSA (ng/ml)	≤10	129	1(Ref)			
	10-20	23	2,93	1,46	5,90	<0,001
	≥20	10	5,69	2,57	12,57	
Volume (%vol tumoral)	≤10	101	1(Ref)			
	out/30	48	3,21	1,68	6,13	<0,001
	>30	13	7,17	3,15	16,34	
Estádio patológico	pT2a	51	1(Ref)			
	≥pT2b	111	7,20	2,24	23,22	<0,001
Invasão perineural	Não	55	1(Ref)			
	Sim	107	3,89	1,65	9,16	0,001
Invasão angiolinfática	Não	149	1(Ref)			
	Sim	13	2,58	1,15	5,78	0,017
Invasão capsular	Não	84	1(Ref)			
	Sim	78	3,76	1,91	7,39	<0,001
Margens	Não	52	1(Ref)			
	Sim	110	5,29	1,90	14,74	<0,001
iNOS	Negativo/fraco	92	1(Ref)			
	Moderado/forte	67	1,18	0,66	2,11	0,577
COX-2	Negativo/fraco	139	1(Ref)			
	Moderado/forte	16	1,21	0,51	2,86	0,667
GLUT1	Negativo/fraco	73	1(Ref)			
	Moderado/forte	83	1,11	0,60	2,04	0,742
Nitrotirosina	Negativo/fraco	88	1(Ref)			
	Moderado/forte	70	1,90	1,05	3,46	0,032

A análise multivariada evidenciou que o volume tumoral e a invasão capsular foram variáveis independentes associadas significativamente com menor sobrevida livre de RB. Nenhum dos biomarcadores estudados teve valor preditivo desta recorrência (Tabela 11).

**Tabela 11** - Análise multivariada da sobrevida livre de RB (MCP+MCN) (n=162).

Variável	Categoria	RR	IC(95%)		p
Volume tumoral	≤10	1(Ref)			
	10-30	2,0647	0,9659	4,413	0,06141
	>30	12,1551	4,5705	32,326	<0,001
Invasão capsular	não	1(Ref)			
	sim	2,7576	1,2923	5,884	0,00871
iNOS	Negativo/fraco	1(Ref)			
	Moderado/forte	1,1066	0,5639	2,172	0,77
COX-2	Negativo/fraco	1(Ref)			
	Moderado/forte	0,8664	0,3083	2,434	0,79
GLUT1	Negativo/fraco	1(Ref)			
	Moderado/forte	1,0653	0,5458	2,079	0,85
Nitrotirosina	Negativo/fraco	1(Ref)			
	Moderado/forte	1,6647	0,8199	3,38	0,16

#### **4.7 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA BIOQUÍMICA DE ACORDO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS, CIRÚRGICAS, ANATOMOPATOLÓGICAS E IMUNOISTOQUÍMICAS NOS 110 CASOS COM MARGENS CIRÚRGICAS POSITIVAS**

As taxas de sobrevida livre de recidiva bioquímica nos 110 pacientes com margens cirúrgicas positivas, aos 5 e 10 anos foram de 63% e 53%,

respectivamente. Constatou-se na análise univariada associação do maior risco de ocorrer RB com as seguintes variáveis: escore de Gleason ( $p<0,001$ ); dosagem do PSA ( $p<0,001$ ); volume tumoral ( $p<0,001$ ); invasão perineural ( $p=0,008$ ); e invasão capsular ( $p=0,014$ ). Não houve associação entre as expressões dos biomarcadores com a evolução tumoral neste grupo de pacientes (Tabela 12).

**Tabela 12** - Análise univariada da sobrevida livre de RB em pacientes com MCP (n=110)

Variável	Categoria	N	R R	IC(95%)		p
Peso (g)	15-40	55	1(Ref)			
	40-60	45	0,60	0,31	1,15	0,261
	>60	10	0,60	0,18	2,00	
Escore de Gleason	<7	38	1(Ref)			
	7	57	3,78	1,55	9,24	<0,001
	>7	15	10,57	3,86	28,96	
PSA (ng/ml)	<10	81	1(Ref)			
	10-20	20	2,14	1,03	4,48	<0,001
	>20	9	5,39	2,39	12,14	
Volume (% vol. total da peça)	<10	50	1(Ref)			
	10-30	47	2,22	1,10	4,50	0,001
	>30	13	4,84	2,02	11,57	
Estádio patológico	pT2a	4	1(Ref)			
	≥pT2b	106	2,10 <sup>6</sup>	0,00	Inf	0,203
Invasão perineural	Não	23	1(Ref)			
	Sim	87	4,27	1,32	13,81	0,008
Invasão angiolímfática	Não	98	1(Ref)			
	Sim	12	2,09	0,93	4,72	0,069
Invasão capsular	Não	36	1(Ref)			
	Sim (focal ou ext)	74	2,65	1,18	5,97	0,014
INOS	Negativo/fraco	63	1(Ref)			
	Moderado/forte	46	1,26	0,69	2,31	0,455
COX-2	Negativo/fraco	96	1(Ref)			
	Moderado/forte	10	1,62	0,68	3,85	0,274
GLUT1	Negativo/fraco	47	1(Ref)			
	Moderado/forte	58	1,14	0,60	2,16	0,684
Nitrotirosina	Negativo/fraco	52	1(Ref)			
	Moderado/forte	55	1,59	0,85	2,97	0,144

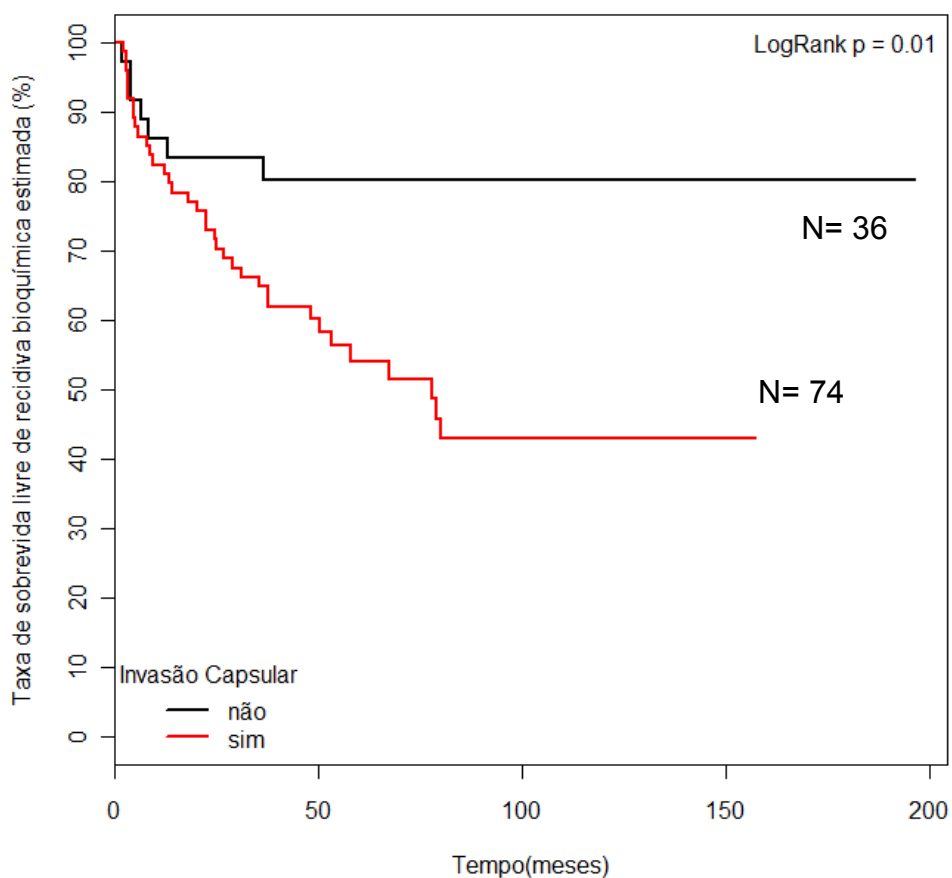
A análise multivariada das variáveis clínicas, cirúrgicas, anatomopatológicas e imunoistoquímicas nos 110 pacientes com MCP, resultou que o volume tumoral no espécime e a invasão capsular mostraram-se fatores prognósticos independentes para ocorrência de RB do CaP (Tabela 13).

**Tabela 13** - Análise multivariada para sobrevida livre de recorrência bioquímica em pacientes com MCP (n=110)

Variável	Categoria	RR	IC (95%)		p
Volume tumoral (%vol. próstata)	≤10	1 (Ref.)			
	10-30	2,013	0,889	4,557	0,0934
	>30	12,13	4,2082	34,965	<0,001
Invasão capsular	Não	1 (Ref.)			
	Sim (focal / ext)	3,016	1,2499	7,277	0,014
INOS	Negativo/fraco	1 (Ref.)			
	Moderado/forte	1,07	0,5175	2,213	0,8547
COX-2	Negativo/fraco	1 (Ref.)			
	Moderado/forte	1,133	0,3853	3,329	0,821
GLUT1	Negativo/fraco	1 (Ref.)			
	Moderado/forte	1,121	0,5506	2,281	0,7531
Nitrotirosina	Negativo/fraco	1 (Ref.)			
	Moderado/forte	1,598	0,7503	3,405	0,2242

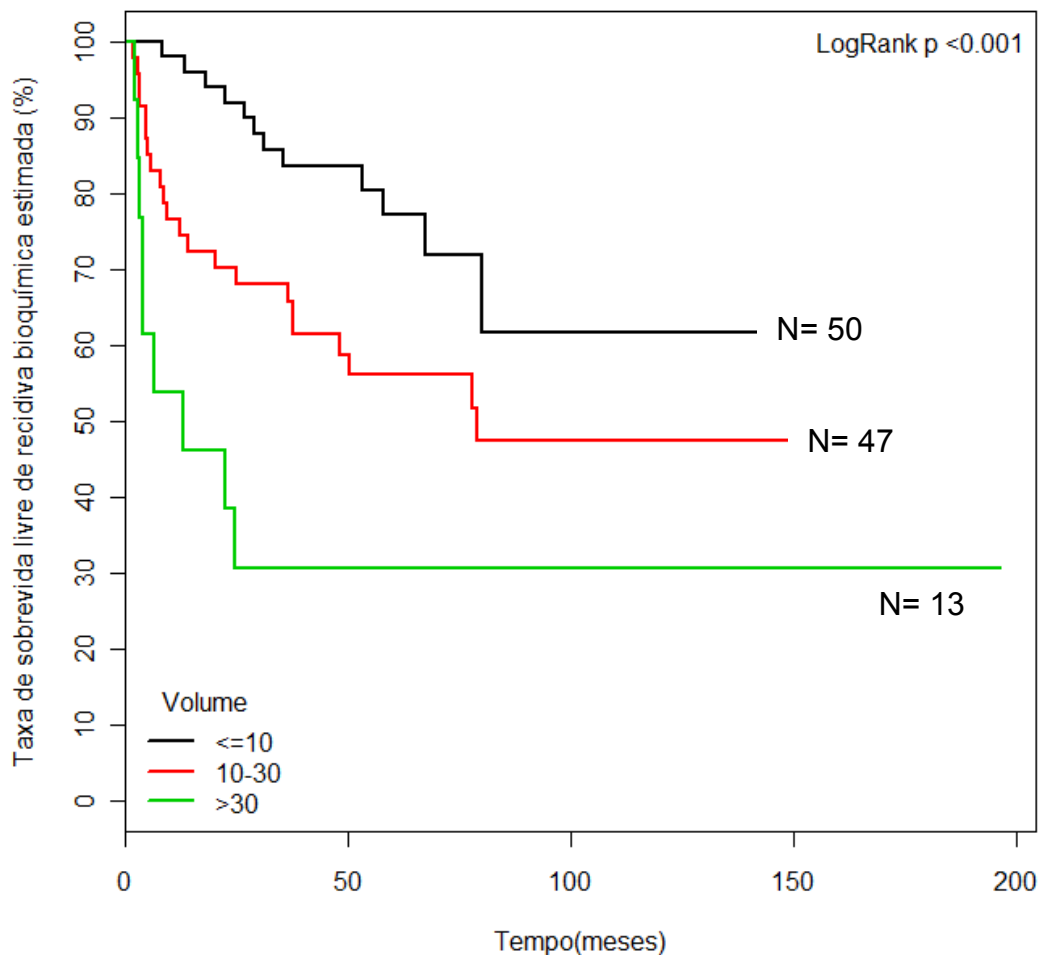
O risco de RB quando o volume tumoral é maior que 10% do volume do espécime cirúrgico, duplica quando comparado a volume menor do que 10% e é muito mais significativo quando maior que 30%.

A presença de invasão capsular nos 110 pacientes com margens cirúrgicas positivas associou-se de forma significativa ( $p=0,014$ ) com a RB do CaP ao longo do estudo (Figura 17).



**Figura 17** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com a invasão capsular em 110 pacientes com margens cirúrgicas positivas

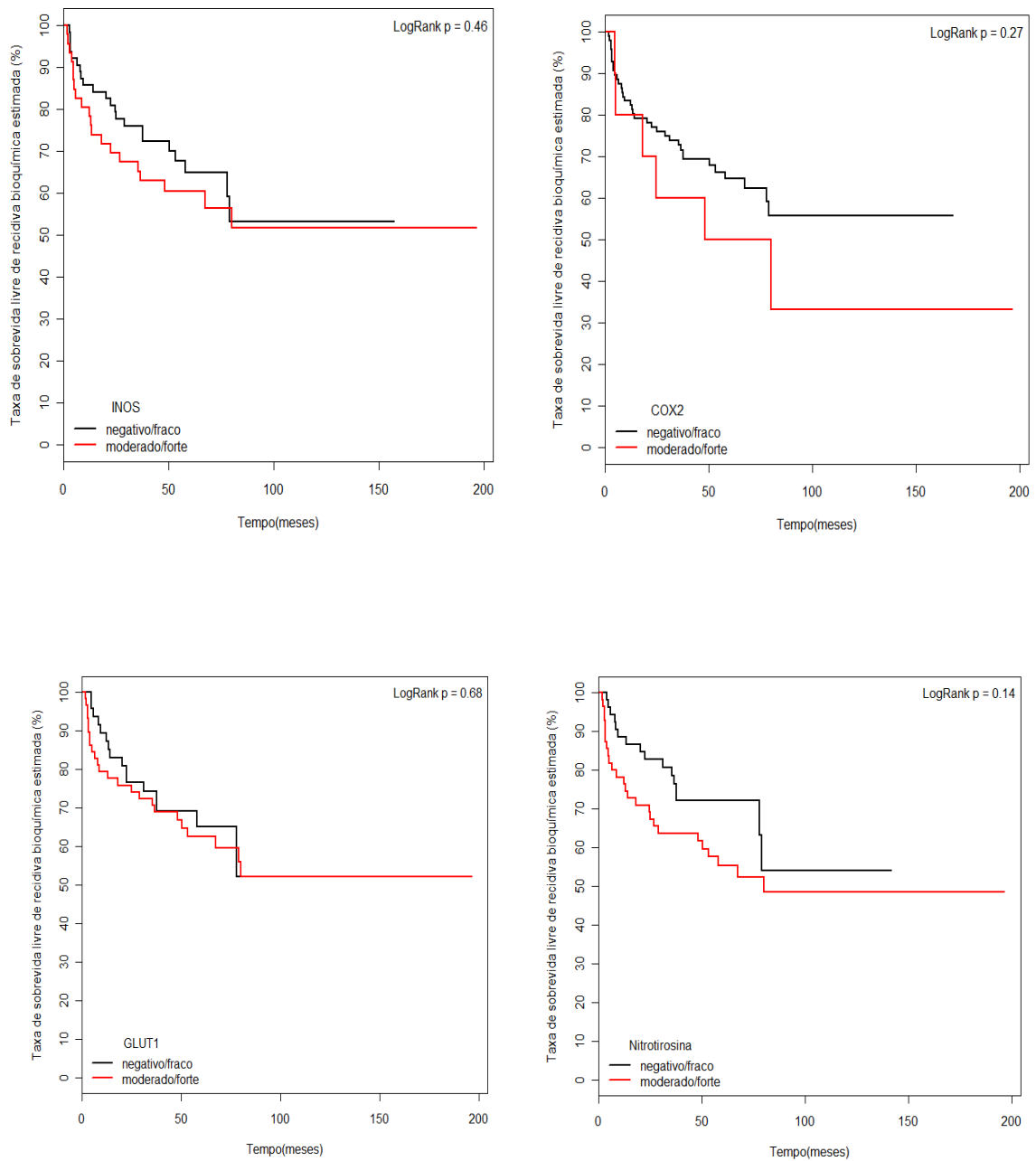
O volume tumoral relacionou-se com RB do CaP de forma significativa ao longo do estudo sendo observado que quanto maior este volume, menor o tempo de sobrevida livre de recidiva. Volume tumoral maior do que 30% foi muito associado à RB ( $p < 0,001$ ) (Figura 18), sendo que pacientes neste grupo, apresentaram 12 vezes maior risco de RB do que aqueles com volume tumoral menor do que 10% do volume do espécime cirúrgico.



**Figura 18** - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de RB de acordo com o volume tumoral no espécime cirúrgico em 110 pacientes com margens cirúrgicas positivas.

As imunoexpressões da iNOS, COX-2, GLUT 1 e Nitrotirosina não se correlacionaram com a maior ou menor sobrevida livre de recorrência bioquímica no seguimento de 110 pacientes portadores de CaP submetidos a PR e que permaneceram com MCP (Figura 19).





**Figura 19** - Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de recorrência bioquímica de acordo com a expressão da iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotyrosina em 110 pacientes com MCP

## 5 DISCUSSÃO

Apesar de todo cuidado e da habilidade do cirurgião, MCPs podem ocorrer, representando uma preocupação quanto à maior possibilidade da progressão tumoral, embora apenas 17 a 40% destes pacientes evoluam em média de intervalo de 24 meses para recidiva tumoral (HAN et al. 2003; KIM et al. 2010).

Entre as variáveis utilizadas, num nomograma para estimativa da probabilidade do risco de recidiva pós-PR, encontramos o escore de Gleason nas biópsias e no espécime cirúrgico, o estadiamento clínico e o patológico, o valor do PSA pré-operatório, ou a duplicação do valor do PSA ou velocidade do PSA maior que 0,75 ng/ml entre as dosagens, em 10 meses, após a prostatectomia radical. Também são relevantes a doença estar órgão-confinada, o comprometimento das margens cirúrgicas, a extensão e o grau do escore de Gleason destas margens, a invasão da cápsula prostática, o acometimento dos feixes vâsculo-nervosos, o volume tumoral, e o acometimento tumoral dos gânglios linfáticos e das vesículas seminais. Estas variáveis foram inseridas em diversos nomogramas que tentam prever a evolução tumoral local ou à distância, metastática (SADI et al. 2006).

O PSA pré-operatório é considerado por muitos autores como um importante fator preditivo de RB (KUPELIAN et al. 1997). Em análise multivariada, estes autores definiram como fatores independentes que

predisseram RB: a dosagem pré-operatória do PSA, o escore de Gleason do espécime cirúrgico e a presença de margens cirúrgicas positivas, sendo este último considerado fator independente preditor de recidiva local do tumor. Concluem que o PSA pré-operatório é o mais potente fator clínico independente preditor de RB, sendo que quando as margens cirúrgicas são negativas, e os níveis do PSA inicial estão abaixo de 20 ng/ml, até em doenças localmente avançadas, os resultados de sobrevida são melhores.

Em nosso estudo também se confirmou, na análise univariada a significância do PSA pré-operatório quando acima de 10 ng/ml ( $p < 0,001$ ) em relação à menor sobrevida livre de RB, embora isto não tenha se confirmado na análise multivariada.

Em nosso estudo, correlacionando variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas, com a sobrevida livre de RB em 110 pacientes submetidos a PR por CaP e com MCPs, encontramos em análise univariada como significativas, o escore de Gleason do espécime cirúrgico, o valor do PSA, e o volume tumoral, mas na análise multivariável, apenas o volume tumoral maior que 30% do espécime cirúrgico e a invasão da cápsula prostática focal e extensa extraprostática foram fatores prognósticos independentes significativos da RB.

Corroborando nossos achados, encontramos dados na literatura, em que o volume tumoral do CaP no espécime, foi considerado como um preditor independente do escore patológico de Gleason, da extensão extraprostática, e de margens cirúrgicas positivas em análises de regressão logística, e que quando calculado por planimetria na secção

anatomopatológica para análise em bloco inteiro da peça, é um preditor significativo de RB (THOMPSON et al. 2011). O volume tumoral como fator prognóstico foi estudado em tumores apresentando mais do que 20% de escore de Gleason padrão 4, mediana do volume de 25% do volume total do espécime, onde estes apresentaram maior chance de progressão metastática refletindo a importância de ambos parâmetros na determinação prognóstica (LEITE et al. 2005). Quanto a presença de invasão da cápsula prostática, focal ou extensa extracapsular, mais a presença de margens cirúrgica positivas, estas foram correlacionadas com a predição de recidiva tumoral (BILLIS et al. 2012), sendo que quando se apresentava extensão difusa extracapsular, em análise univariada, e margens cirúrgicas positivas em análises uni e multivariada, estes foram preditores significativos de recorrência bioquímica num tempo menor após a PR.

A decisão de indicar um tratamento adjuvante radioterápico sobre o leito prostático pode reduzir as taxas desta recidiva, mas por outro lado, pode acarretar aos pacientes complicações actínicas como cistite, retite, impotência sexual naqueles cuja potência foi conservada, ou incontinência urinária naqueles que já tenham restabelecido a continência (TYLDESLEY et al. 2012). Esta decisão, hoje na grande maioria dos casos, baseia-se nos resultados dos diversos nomogramas preditivos como descritos, mas que carecem de boa assertividade já que vimos que nem todos pacientes com margens positivas vão apresentar RB. Recentemente, no sentido de incrementar esta assertividade, COOPERBERG et al. (2011), acrescentaram a um validado escore de estimativa do risco no CaP (Cancer of Prostate Risk

Assessment-CAPRA), que já contava com dados pré-operatórios, variáveis anatomopatológicas, a qual denominaram como escore CAPRA-S. A média de sobrevida livre de RB em 5 anos foi de 78% dentre os casos estudados, sendo que pontuaram com até 3 pontos a mais os índices já estabelecidos de importância da significância destas variáveis na recidiva como o PSA; o escore de Gleason; um ponto a mais pela descrição de extensão extraprostática ou linfonodo acometido; e dois pontos a mais quando descritos margens cirúrgicas positivas ou infiltração nas vesículas seminais. O resultado foi um incremento de 2,4 vezes mais no risco para cada aumento de dois pontos no escore, transformando este escore numa ferramenta mais precisa e de melhores resultados tanto na calibração como na análise das curvas de decisão.

Devido a significativa heterogeneidade clínica desta doença estes fatores clínicos e anatomopatológicos em seus nomogramas de risco, estão distantes em identificar com acurácia os pacientes em alto risco de progressão e a caracterização de novos biomarcadores preditores da RB, bem como o desenvolvimento de terapias alvo para o CaP são de grande importância.

Para a pesquisa na identificação destes biomarcadores foram criadas diretrizes - projeto REMARK do NCI-EORTC (Instituto Nacional do Câncer da América do Norte e Organização Européia para Pesquisa e Tratamento do Câncer) referidas por McSHANE et al. (2005) que procuram estabelecer critérios na elaboração das teses, padronização dos testes, na interpretação,

na análise e divulgação dos estudos, diretrizes estas que foram seguidas por nós.

COOPERBERG et al. (2013), apresentou seus resultados com a utilização de um teste prognóstico DECIPHER® (Genome Dx, Biosciences, San Diego, CA, USA) que mede o grau de expressão de múltiplos marcadores associados ao câncer agressivo da próstata no espécime cirúrgico e avalia o risco biológico de um câncer ser potencialmente letal independente do PSA ou de outros fatores de risco conhecidos. Em pacientes submetidos a PR considerados de alto risco pelos nomogramas clássicos e pelo escore CAPRA-S, anteriormente citado, e pelo novo escore de classificação percentual de classificação genômica do teste Decipher® (DGC), ambos demonstraram valor como preditores da mortalidade câncer específica. Entretanto o Decipher® foi capaz de reduzir o risco em mais de 50% dos homens estratificados como sendo de alto risco pelo escore de CAPRA-S, modificando as decisões de tratamento adjuvante no pós-operatório, sendo então considerado ferramenta para informação prognóstica independente de importância. A importância da interpretação das expressões de biomarcadores preditivos da evolução tumoral foi também relatada por GHADDESSI et al. (2013), num estudo clínico prospectivo de pacientes considerados de alto risco e que após a PR, pelos resultados do Decipher®, 72% destes foram reclassificados como sendo de baixo risco e tiveram menos que 3% de incidência de metástases após 5 anos de seguimento. Aqueles classificados como de alto risco tiveram aproximadamente 10 vezes maior risco de desenvolver metástases aos 5

anos de seguimento. A recomendação de tratamento adjuvante nos casos de alto risco após a interpretação do teste Decipher®, segundo apresentação de BADANI et al. (2013), mudou em 43 a 53% das vezes, sendo significativo que este teste tenha alterado a conduta de radioterapia adjuvante para observação vigilante em 31% das vezes.

Estes estudos demonstram a importância de avaliar marcadores moleculares preditivos da agressividade e recorrência tumoral do CaP para que possamos melhor planejar as opções terapêuticas no pós-operatório de pacientes com margens cirúrgicas comprometidas.

Interessou-nos a pesquisa da expressão de marcadores moleculares envolvidos com a hipóxia celular, a angiogênese tumoral, e o transporte de glicose nas células de adenocarcinoma da próstata, particularmente o iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina, se preditivos da evolução tumoral.

O óxido nítrico (NO) é um regulador pleiotrópico, crítico a numerosos processos biológicos incluindo vasodilatação, neurotransmissão e imunidade mediada por macrófagos. A família das sintases do óxido nítrico compreende a NOS induzível (iNOS), a endotelial e a neuronal, sendo que estas isoformas podem promover ou inibir a etiologia do câncer, associadas ao grau tumoral, velocidade de proliferação e na expressão de importantes vias de sinalização do desenvolvimento do câncer como os receptores de estrogênio. Parece que altos níveis na expressão da NOS gerados por macrófagos ativados podem ser citostáticos ou citotóxicos para células tumorais, enquanto que baixos níveis têm efeito oposto promovendo o

crescimento tumoral. Paradoxalmente NO e suas espécies nitrogênio reativas podem ter tanto propriedades genotóxicas como angiogênicas.

Portanto, o conhecimento ao nível molecular do papel do NO no câncer pode trazer implicações terapêuticas importantes no diagnóstico e tratamento da doença. Estudos evidenciaram que a iNOS não só está expressa em células do estroma e de macrófagos no tumor, mas também nas células tumorais, sendo observado atividade em média em 50% destas, e que quando tanto a iNOS estromal quanto tumoral estavam presentes, maior o índice de apoptose e maior o índice de densidade da microcirculação. Relatam que lesões benignas quase não apresentaram positividade para a iNOS, enquanto que carcinomas *“in situ”* e lesões invasivas expressaram em 67% e 61% dos casos, respectivamente (XU et al. 2002).

Polimorfismo nos genes produtores da NOS são fatores de risco para o câncer de próstata, especialmente naqueles de comportamento agressivo.

COULTER et al. (2008) salientam o papel da NO envolvida em múltiplas vias de sinalização intra e inter celular, sendo que em tumores heterogêneos uma variedade de respostas foram observadas segundo modificação dos níveis da NO. Expressões constitutivas certamente por eNOS e provavelmente também pela iNOS tem importante participação na característica tendência do tumor invadir tecidos vizinhos, disseminar para sítios distantes, e induzir uma maior dilatação do suporte sanguíneo, sendo que quando em modestas concentrações estes efeitos podem ser caracterizados como pró-malignos. Em altas concentrações, entretanto, NO



age como potente agente anticâncer promovendo apoptose, necrose e inibindo a angiogênese. Estas características quando da hiperexpressão da NO foi observada em modelos pré-clínicos onde foi constatada redução do crescimento tumoral e aumento na eficácia tanto da quimioterapia quanto da radioterapia.

KLOTZ et al. (1998) demonstraram que células de carcinoma prostático tem alta expressão da iNOS, enquanto que tecidos benignos não evidenciaram esta expressão, considerando então a iNOS como marcador imunohistoquímico específico para este câncer, além de teorizar que a produção da NO pela iNOS desempenha múltiplas ações no desenvolvimento desta doença, mas não correlacionaram estas expressões com a evolução tumoral.

Inversamente, FLORIANO-SANCHEZ et al. (2010), em 39 amostras de HPB e em 42 casos de CaP procuraram detectar por imunohistoquímica a presença da iNOS, a encontrando em  $15,89\% \pm 7,1\%$  nos tecidos cancerosos, e em  $23,2\% \pm 8,8\%$  na hiperplasia benigna, concluindo que os dados da densitometria da imunoreatividade da iNOS no tecido glandular em câncer de próstata foram menores que os obtidos em tecido similar de hiperplasia benigna prostática, sugerindo que a determinação da iNOS pode ser utilizada como marcador de oncogênese.

ZAFIRELLIS et al. (2010), demonstraram no estudo de 132 pacientes operados de câncer coloretal a relevância prognóstica da expressão da sintetase induzível da NOS, a correlacionando com variáveis clínico-patológicas e de sobrevida. Imunoreatividade da iNOS foi observada no

citoplasma das células epiteliais do tumor em 60 pacientes (45,5%), e positivamente correlacionada com invasão linfonodal. Não foi encontrada correlação significativa entre a expressão da iNOs com as variáveis idade, sexo, localização tumoral, tamanho do tumor, grau tumoral, e estágio TNM. A análise de sobrevida mostrou correlação significativa entre os tumores iNOS positivos e pobre sobrevida doença específica como fator significativo independente de prognóstico em análise multivariada (HR=4,42;  $p<0,001$ ). Pacientes com doença em estágio II e tumores iNOS positivos apresentaram sobrevida pior doença específica quando comparados com aqueles que apresentavam tumores iNOS negativos ( $p<0,001$ ), o mesmo ocorrendo com pacientes com estágio III da doença. Concluíram que a positividade da iNOS nestes tecidos tumorais, pode prever a evolução destes pacientes de forma independente a outros fatores conhecidos, podendo pois ser considerado um novo marcador molecular com significativa utilização na clínica.

AALTOMAA et al. (2000) avaliaram o valor prognóstico da imunoexpressão da iNOS em 82 pacientes portadores de CaP localizado submetidos à PR. A média do seguimento desta série foi de 3,3 anos. A expressão da NOS2, com localização citoplasmática, foi graduada de acordo com a intensidade da coloração como ausente, fraca e forte. A expressão fraca e forte da iNOS foi observada em 25 (31%) e 56 (68%) pacientes, respectivamente. A expressão forte da iNOS foi relacionada com o nível de PSA no pré-operatório ( $p=0,006$ ) e estágio patológico T da classificação TNM ( $p<0,001$ ) e sem outras associações anatomopatológicas ou clínicas.

Os autores relataram que a expressão da iNOS não foi um fator preditivo para a falha bioquímica destes pacientes operados.

Os mesmos autores, AALTOMAA et al. (2001) avaliaram em outro estudo retrospectivo com média de seguimento de 12,9 anos, 198 pacientes tratados por castração (n=103), cirurgia radical e radioterapia (n=6) ou seguimento (n=89). Estes pacientes não representam as opções de tratamento atualmente indicadas na clínica, como se pode observar pelo alto número de orquiectomias e baixo número de tratamentos radicais. Os espécimes foram obtidos em 47 biópsias prostáticas e de 158 ressecções endoscópicas de próstata e portanto pacientes pertencentes ao estágio clínico T1a e T1b (n=158). A expressão da iNOS foi quantificada pela intensidade da coloração citoplasmática em negativa, fraca e forte. Os tecidos prostáticos normais e com hiperplasia prostática adjacentes ao tumor foram considerados com positividade negativa ou fracamente positiva para iNOS. Nas áreas com carcinoma, a expressão foi considerada negativa, fraca e forte em 22%, 43% e 35%, respectivamente. A expressão da iNOS nas células tumorais relacionou-se com o fator T da classificação TNM, escore de Gleason e ploidia do DNA e a presença de infiltração. Em relação a expressão da iNOS com escore de Gleason 2-4, 5-7 e 8-10, a positividade 7%, 26% e 52%, respectivamente. Em análise univariada, a expressão forte de iNOS foi um significativo fator preditivo para sobrevida dos pacientes ( $p = 0,002$ ) e inclusive quando avaliados apenas os pacientes do estudo sem metástases. Entretanto, quando avaliado a sobrevida em análise

multivariada pelo método de Cox, a expressão de iNOS não foi fator preditivo independente para sobrevida.

Em tese de doutorado, FONSECA (2002) estudou a expressão imunistoquímica da NOS2 avaliada em 58 pacientes pós-PR e que se correlacionou fortemente com a faixa do PSA pré-operatório, escore de Gleason pós-operatório agrupado, estágio patológico N, invasão perineural, invasão angiolinfática, invasão de vesícula seminal, tratamento adjuvante e situação clínica dos pacientes no final do estudo e foi marginalmente significativa com o estágio patológico T ( $p=0,098$ ). Portanto, baseado nestes resultados, a expressão imunistoquímica da NOS2 acena para a correlação com o grau de diferenciação celular (escore de Gleason) e com o estágio patológico do câncer localizado de próstata. Nos pacientes com RB, 4 (13,33%) e 13 (46,43%) apresentaram reação para NOS2 negativa e positiva, respectivamente. A média do tempo de seguimento da coorte foi de 75 meses (DP 25,5). A média do tempo para a falha bioquímica foi de 18,6 meses (DP 22,5). A sobrevida livre de RB foi 49,3%. Na análise multivariada, os fatores preditivos independentes para a RB foram: a expressão da NOS induzida, escore de Gleason patológico, e invasão da vesícula seminal.

A associação do NOS2 com a situação clínica dos pacientes no seguimento final do estudo foi muito significativa. Ao que parece, os resultados indicam fortemente que a imunoreação de NOS2 pode exercer papel prognóstico para os pacientes submetidos à cirurgia radical da próstata.

Nossos resultados nas amostras dos 162 pacientes com e sem margens positivas, revelaram expressão da iNOS em números absolutos como negativa em 8% dos casos e positiva (fraca 49%, moderada 31% e forte 10%) em 90% dos casos, mas nas análises univariada e multivariada, não houve correlação entre as expressões da iNOS e a sobrevida livre de RB do CaP nos pacientes com MCPs.

Apoptose diminuída, aumento na angiogênese e supressão da imunidade são algumas das sequelas da hiperexpressão da COX-2 e cada um destes fatores tem importante papel na formação e progressão tumoral.

Prostaglandinas, especialmente a PGE<sub>2</sub>, tem sua importância na patogênese do câncer por que pode afetar a mitogênese, a adesão celular, a invasão, a apoptose, e a imunidade celular. O metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxigenases (COXs) inicia a formação das prostaglandinas, sendo que a COX-1 é expressa normalmente em muitos tecidos, enquanto que a COX-2 usualmente não é detectável mas é induzida como resposta a estímulos como citocinas, oncogenes e promotores tumorais. Em tumores vesicais, DIAMANTOPOULOU et al. (2005) demonstraram a relação entre a expressão da COX-2 com a evolução tumoral, sendo que na análise multivariada a imunopositividade da COX-2 foi independentemente associada com um pior prognóstico em pacientes com a doença não músculo invasiva, e que quando a COX-2 se encontrava hiperexpressa com subsequente ativação da apoptose estava associada a uma piora nas taxas de sobrevida geral dos pacientes em estágio pTa-T1.

RUBIO et al. (2005) avaliaram a expressão da COX-2 em produtos de biópsias prostáticas, encontrando positividade em 67% dos casos e este resultado foi relacionado em análise univariada a uma maior sobrevida livre de recorrência. Nos espécimes cirúrgicos de prostatectomias radicais a positividade nas expressões do COX-2 foi de 79,1%, mas não foi mantida sua independência como fator prognóstico de sobrevida livre de tumor em análise multivariada.

A associação da COX-2 e a expressão de HER2 (um receptor tirosina quinase) foi bem demonstrada em câncer coloretal, onde a ativação da HER2 induz ativação dos promotores da COX-2, como também este estímulo pode ser regulado pela ativação da proteína de ativação mitogênica da cascata da cadeia quinase (MAP), como ocorre nos tumores de mama. Tumores prostáticos de alto grau estão relacionados com níveis elevados de expressão de COX-2, influenciando a progressão e desenvolvimento tumoral através da neoangiogênese e resistência aumentada à apoptose. Estas células expressando COX-2 estimulam a produção VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial). Em estudos "*in vivo*" inibidores de COX-2 bloqueiam a produção de VEGF e com isto diminuem a densidade dos microvasos no câncer prostático. Por outro lado, expressão aumentada de COX-2 correlaciona-se com uma diminuição da apoptose, portanto os mesmos inibidores da COX-2 podem induzir apoptose (EDWARDS et al. 2004).

Estes autores pesquisando esta associação em 89 casos portadores de CaP e 28 casos de HPB, analisando nos tecidos a amplificação de HER2

por fluorescência em hibridização “in situ”, e a expressão protéica de HER2 e COX-2 por imunistoquímica tiveram como resultados que todos tumores expressaram COX-2 num nível muito mais significativo do que nos tecidos benignos ( $p=0,041$ ). Baixos índices de amplificação gênica de HER2 (8%, 7/89) e de expressão da proteína HER2 (12%, 11/89) foram observadas. Mesmo que neste estudo HER2 não tenha levado a uma expressão maior de COX - 2, identificou-se altos índices da expressão deste último, em pacientes portadores de CaP localmente avançado, sugerindo que ele possa ser um potencial alvo terapêutico, sendo que estudos estão sendo desenvolvidos observando-se a resposta tumoral aos inibidores da COX - 2.

CHENG et al. (2007), sabendo da ação das drogas antiinflamatórias não esteróides na inibição da ativação enzimática da COX-2, e com as referências que o uso prolongado destes aparentemente de forma modesta diminuem o risco do aparecimento do CaP, investigaram as variações comuns genéticas do COX-2 e o risco de CaP avançado. Genotiparam 9 SNPs (nucleotídeos únicos polimórficos) do COX-2 em 1012 homens portadores desta doença. Tiveram como resultados que 3 SNPs demonstraram significância estatística com o risco deste câncer, sendo que aqueles com os mais evidentes polimorfismos se associaram com um menor risco da doença (36% a menos), e também avaliaram que o uso de drogas antiinflamatórias não esteróides esteve associado a um risco menor de ter a doença de que quando não se usou estas drogas. Seus achados sugerem que variações do COX - 2 estão associadas ao risco de CaP.

RICHARDSEN et al. (2010) demonstraram que em pacientes com CaP metastático, os tumores primários apresentavam expressão forte da COX-2, TGF-beta e Ki67, nas células epiteliais tumorais e nas áreas do estroma tumoral comparadas com os casos não metastáticos. A forte intensidade na expressão da COX-2 nas áreas tumorais foi em alto grau associado com a morte pelo CaP em análise univariada. Na análise multivariada a associação foi forte, mas não significativa.

Da mesma forma, BIN et al. (2011) observaram a positividade da expressão da COX-2 no citoplasma de células de CaP. Expressão forte foi correlacionada com escore de Gleason, estágio patológico e acometimento linfonodal. Pacientes com forte expressão da COX-2 mostraram sobrevida menor livre de tumor, e menor sobrevida global em relação aqueles com expressão fraca. Análise univariada e multivariada sugeriram que a determinação da expressão proteica de COX-2 foi um indicador independente de prognóstico para a sobrevida destes pacientes

De forma contrária, nossos resultados nas amostras dos 162 pacientes com e sem margens positivas revelaram expressão da COX-2 em números absolutos como negativa em 51% dos casos e positiva (fraca 35%, moderada 9%, forte 1%) em 45% dos casos. Nas análises univariada e multivariada, não houve correlação entre as expressões da COX-2 e sobrevida livre de RB do CaP nos pacientes com MCPs.

NUALART et al. (2009) descreveram que células cancerosas como também muitas células de vários mamíferos, dependem de suporte contínuo de glicose, não apenas como precursor de glicoproteínas, triglicérides e



glicogênio, mas também como importante fonte de energia. Isto leva a rever as expressões de transportadores GLUT em tecidos normais e cancerosos com receptores de hormônios esteróides sexuais como existentes na próstata, no útero, na mama, no ovário, nos testículos entre outros, dada a importância da ação do estrógeno, da progesterona e dos hormônios andrógenos na carcinogênese destes tecidos, bem como na sobrevivência e propagação destes tumores.

Conforme as células se dividem e crescem a demanda por oxigênio aumenta, e estas células usam oxigênio para metabolizar glicose e outros substratos através da fosforilação oxidativa. Enquanto tumores induzem a angiogênese para a chegada de nutrientes, esta nova formação de vasos não acompanha a velocidade da proliferação das células neoplásicas, resultando em áreas hipóxicas dentro do tumor. Para a formação de uma massa tumoral, as células devem adaptar seu metabolismo para sobreviver e crescer em condições de isquemia e hipóxia, e nestas áreas, estas células não são mortas pela ação de radiação ionizante que depende de oxigênio, ou por drogas quimioterápicas, que não alcançam estas regiões. Uma característica destas áreas isquêmicas é a produção de grandes quantidades de ácido láctico derivado da glicólise, na presença de reduzidas concentrações de oxigênio. Isto vem acompanhado pelo aumento na taxa dos transportadores de glicose. É possível que o ácido lactato formado nestes tumores esteja envolvido na translocação de GLUTs para a membrana plasmática, que por sua vez facilitaria um aumento na utilização da glicose nestas células.

Existem 12 tipos da proteína GLUT, mas apenas GLUT 1 e a GLUT 12, expressam em tecido prostático neoplásico (CHANDLER et al. 2003). Em relação a GLUT-1, JANS et al. (2010) estudando o papel da hipóxia no desenvolvimento do CaP em 71 pacientes submetidos a PR, focaram a via do fator induzido por hipóxia (HIF-1 alfa) nos tecidos dos espécimes cirúrgicos, analisando as expressões das proteínas envolvidas nesta via num TMA, e correlacionaram com dados clínicos incluindo tempo para ocorrência de RB. Expressão da GLUT-1 correlacionou significativamente com menor tempo para a recorrência bioquímica após a PR e foi fator independente para o escore de Gleason e estágio patológico do tumor. Também pela primeira vez, demonstraram que o acúmulo de prolyl-4-hidroxilase 1, especialmente no núcleo, é um significativo indicador de pior prognóstico.

De forma contrária, nossos resultados nas amostras dos 162 pacientes com e sem margens positivas revelaram expressão da GLUT-1 em números absolutos como negativa em 1%, e positiva (fraca 44%, moderada 38%, forte 14%) em 96% dos casos. Nas análises univariada e multivariada, não houve correlação entre as expressões da GLUT-1 e sobrevida livre de RB do CaP nos pacientes com MCPs.

O papel crítico do dano oxidativo foi recentemente associado com várias anomalias clínicas, incluindo doenças malignas. Espécies oxigênio reativas podem causar oxidação no DNA e dano protéico, aos genes supressores de tumor e aumento na expressão de proto-oncogenes.

A relação da via angiogênica com isquemia foi demonstrada por LICKS et al. (2010), no estudo da via de liberação de NO no

desenvolvimento da hipertensão portal que pode estar relacionada a presença de VEGF e demonstra o seu envolvimento na formação de estresse nitrosativo, devido a alteração dos níveis de nitrotirosina na mucosa gástrica, sugerindo esta via como um dos componentes neste desarranjo hemodinâmico. Na imunistoquímica identificou-se a presença de nitrotirosina, que atua como substrato para a formação de peroxinitrito e também observou-se a imunorreatividade ao VEGF na mucosa gástrica dos animais submetidos a ligação parcial da veia porta em relação aos do grupo controle sem ligadura da veia.

No câncer se demonstra mudanças pro-oxidativas no estado de redução da oxidação.

FLORIANO-SÁNCHEZ et al. (2009a) observaram imunexpressão aumentada de 3-Nitrotirosina em CaP comparado à tecido prostático com hiperplasia benigna, ressaltando que na literatura já foi descrito alterações tanto no NO, espécie reativa relacionada com a nitração proteica e seus metabólitos, como em nitritos e nitrotirosina que estão aumentados em neoplasias. A expressão da eNOS parece também ter importância na carcinogênese, pois produzindo NO, promove a progressão tumoral, regulando a proliferação seletiva das células tumorais mediante estímulo angiogênico no órgão. Descrevem o achado de níveis de concentração diferenciada nas células, já que ocorre maior nitração nas células endoteliais que em outras áreas do tecido tumoral, sendo que a 3-NT é de seis a oito vezes mais frequente no CaP do que na HPB.

Poucos estudos relacionaram a expressão da Nitrotirosina com agressividade tumoral e a evolução neoplásica.

CRONAUER et al. (2007) reforçam que inflamação crônica aumenta o risco de câncer, incluindo o CaP, o qual pode surgir em áreas destas inflamações. A sintase do óxido nítrico induzida (iNOS) é enzima predominantemente expressa nestas reações inflamatórias como também em doenças auto-imunes e na tumorigênese. Analisando biópsias prostáticas por imunistoquímica encontraram proteína iNOS expressa em células tumorais fortemente associada a presença da Nitrotirosina, sugerindo que a iNOS estava muito ativa. “In vitro”, demonstrou-se que NO inibe o promotor dos receptores andrógeno-dependente, a produção do PSA, como também a capacidade de ligação do DNA ao receptor de androgênios, ação esta dependente da sua concentração. Como a NO inibe a proliferação destes receptores androgênios-positivos mais eficientemente do que a proliferação dos receptores androgênio-negativos nas células cancerosas, os autores concluem que a atividade da iNOS intratumoral favorece ativamente o desenvolvimento das células cancerosas do CaP, proliferando receptores androgênicos de forma independente, promovendo assim a progressão do tumor.

NAKAGAWA (2005), analisando a expressão da Nitrotirosina em condrossarcomas, concluiu que estes tumores a expressam, bem como expressam NOS1, NOS2, NOS3, COX-2 e CD34, sendo que as NOS estão relacionadas com a expressão da Nitrotirosina, todas as anteriores estão relacionadas nos condrossarcomas com a expressão de CD34 e portanto

com a microcirculação. Também concluiu que a expressão da Nitrotirosina estava relacionada com o grau histológico, mas não refere associação desta com a recidiva ou evolução do tumor.

Nos 162 pacientes com e sem margens positivas a expressão da Nitrotirosina foi negativa em 3%, e quando positiva (fraca 51%, moderada 36%, forte 7%) em 94% dos casos, apresentou correlação com menor sobrevida livre de recidiva bioquímica ( $p=0,032$ ).

Entretanto nos 110 pacientes com margens cirúrgicas positivas, as análises univariada e multivariada não mostraram correlação entre as expressões da Nitrotirosina e sobrevida livre de RB.

Em nosso estudo, as expressões da iNOS, GLUT1, Nitrotirosina foram positivas em mais de 90% de todas amostras, enquanto que a COX-2 o foi em 50% das vezes quando analisadas em sua expressão plena ou seja, negativa ou positiva (fraca, moderada e forte), assim evidenciando serem os três primeiros excelentes marcadores imunoistoquímicos da presença de neoplasia no tecido prostático, mas como todos não se correlacionaram com a ocorrência de RB, não podem ser considerados marcadores preditivos desta.

## 6 CONCLUSÕES

- Margens cirúrgicas positivas foi fator significativo para ocorrer recidiva bioquímica. Entre os 162 casos pacientes submetidos à PR, nos 110 casos com MCP, 43 pacientes (39%) evoluíram com RB, e 6 pacientes (5,45%) apresentaram RC, durante o seguimento. Nos 52 casos com margens cirúrgicas negativas, 4 pacientes (7,69%) evoluíram com RB.
- Nos 110 casos com margens cirúrgicas positivas as expressões imunohistoquímicas da iNOS, COX-2, GLUT1 e Nitrotirosina não foram preditivos da ocorrência de recidiva bioquímica.
- A análise multivariada nos 110 pacientes com margens cirúrgicas positivas evidenciou que volume tumoral superior a 30% do espécime e a presença de invasão capsular focal ou extensa foram fatores prognósticos independentes para ocorrência de RB.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaltomaa SH, Lipponen PK, Viitanen J, Kankkunen JP, Ala-Opas MY, Kosma VM. The prognostic value of inducible nitric oxide synthase in local prostate cancer. **BJU Int** 2000; 86:234-9.

Aaltomaa SH, Lipponen PK, Kosma VM. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. **Anticancer Res** 2001; 21:3101-6.

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

Airley R, Loncaster R, Davidson S, et al. Glucose Transporter Glut1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. **Clin Cancer Res** 2001; 7:928-34.

Algaba F. Pitfalls of pathologic staging in prostate cancer. **Eur Urol Suppl** 2008; 7:6-14.

Alkhateeb S, Alibhai S, Fleshner N, et al. Impact of positive surgical margins after radical prostatectomy differs by disease risk group. **J Urol** 2010; 183:145-50.

Ayala FRR. **Análise da expressão das proteínas transportadoras de glicose (GLUT-1 e GLUT-3): relação com os achados do PetSacn (câncer de cabeça e pescoço e ovário) e associação com fatores clínico-patológicos em carcinoma epidermóide bucal.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Badani KK, Thompson DJS, Mitra AP, et al. Evaluation of a genomic-based prognostic test for metastasis in high-risk post-prostatectomy patients: Does it impact physician decision making? [abstract 196]. **J Clin Oncol** 2013; 31(Suppl 6). [Presented at the Genitourinary Cancers Symposium; 2013 feb 14-16; Orlando (Flórida)].

Bedolla R, Prihoda TJ, Kreisberg JI, et al. Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. **Clin Cancer Res** 2007; 13:3860-7.

Bianco FJ Jr, Vickers AJ, Cronin AM, et al. Variations among experienced surgeons in cancer control after open radical prostatectomy. **J Urol** 2010; 183:977-83.

Billis A, Meirelles L, Freitas LL, Magna LA, Ferreira U, Reis LO. Tumor extent in radical prostatectomy specimens: is it an independent prognostic factor for biochemical (PSA) progression following surgery? **Int Urol Nephrol** 2011; 43:417-22.

Billis A, Meirelles LL, Freitas LL, Magna LA, Reis LO, Ferreira U. Influence of focal and diffuse extraprostatic extension and positive surgical margins on biochemical progression following radical prostatectomy. **Int Braz J Urol** 2012; 38:175-84.

Bin W, He W, Feng Z, et al. Prognostic relevance of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in Chinese patients with prostate cancer. **Acta Histochem** 2011; 113:131-6.

Boccon-Gibod L, Djavan WB, Hammerer P, et al. Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: a European Consensus. **Int J Clin Pract** 2004; 58:382-90.



Bondy CA, Lee W-H, Zhou J. Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. **Mol Cell Neurosci** 1992; 3:305-14.

Boorjian SA, Karnes RJ, Crispen PL, et al. The impact of positive surgical margins on mortality following radical prostatectomy during the prostate specific antigen era. **J Urol** 2010; 183:1003-9.

Brimo F, Partin AW, Epstein JI. Tumor grade at margins of resection in radical prostatectomy specimens is an independent predictor of prognosis. **Urology** 2010; 76:1206-9.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Lab Invest** 2000; 80:1943-9.

Chandler JD, Williams ED, Slavin JL, Best JD, Rogers S. Expression and localization of GLUT1 and GLUT12 in prostate carcinoma. **Cancer** 2003; 97:2035-42.

Cheng I, Liu X, Plummer SJ, Krumroy LM, Casey G, Witte JS. COX-2 genetic variation, NSAIDs, and advanced prostate cancer risk. **Br J Cancer** 2007; 97:557-61.

Cheng L, Darson MF, Bergstralh EJ, Slezak J, Myers RP, Bostwick DG. Correlation of margin status and extraprostatic extension with progression of prostate carcinoma. **Cancer** 1999; 86:1775-82.

Chung FY, Huang MY, Yeh CS, et al. GLUT1 gene is a potential hypoxic marker in colorectal cancer patients. **BMC Cancer** 2009; 9:241-52.

Cookson MS, Aus G, Burnett AL, 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** 2007; 177:540-5.

Cooperberg MR, Hilton JF, Carroll PR. The CAPRA-S score: a straightforward tool for improved prediction of outcomes after radical prostatectomy. **Cancer** 2011; 117:5039-46.

Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, et al. Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. **J Clin Oncol** 2013; 31:1428-34.

Cordon-Cardo C, Kotsianti A, Verbel DA, et al. Improved prediction of prostate cancer recurrence through systems pathology. **J Clin Invest** 2007; 117:1876-83.

Corradi CE, Campos F, Carvalhal G, et al. **Diretriz de tratamento do câncer urológico**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Urologia; 2009.

Corrêa LA, Bendhack ML, Souza AAO, Sabaneeff J. **Câncer de próstata: fatores prognósticos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Urologia; 2006.

Coulter JA, McCarthy HO, Xiang J, et al. Nitric oxide - a novel therapeutic for cancer. **Nitric Oxide** 2008; 19:192-8.

Cronauer MV, Ince Y, Engers R, et al. Nitric oxide-mediated inhibition of androgen receptor activity: possible implications for prostate cancer progression. **Oncogene** 2007; 26:1875-84.

Cronin AM, Godoy G, Vickers AJ. Definition of biochemical recurrence after radical prostatectomy does not substantially impact prognostic factor estimates. **J Urol** 2010; 183:984-9.

Damião R, Aguinaga SD, Pompeo ACL. História natural do câncer de próstata. In: I Consenso Brasileiro do Câncer de Próstata. Rio de Janeiro: Editora BG Cultural; 1998. p.1-12.

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.

Dall'Oglio MF, Crippa A, Ferreira E, et al. **Diretrizes de câncer de próstata**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Urologia; 2011.

Diamantopoulou K, Lazaris A, Mylona E, et al. Cyclooxygenase-2 protein expression in relation to apoptotic potential and its prognostic significance in bladder urothelial carcinoma. **Anticancer Res** 2005; 25:4543-50.

Dunn TA, Chen S, Faith DA, et al. A novel role of myosin VI in human prostate cancer. **Am J Pathol** 2006; 169:1843-54.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab** 2003; 39:343-50.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7<sup>a</sup> ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Prostate; p.457-68.

Edwards J, Mukherjee R, Munro AF, Wells AC, Almushatat A, Bartlett JMS. HER2 and COX-2 expression in human prostate cancer. **Eur J Cancer** 2004; 40:50-5.

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

Felin IPD, Grivicich I, Felin CR, Regner A, Rocha AB. Expressão de P53, P16 e COX-2 em carcinoma escamoso do esôfago e associação histopatológica. **Arq Gastroenterol** 2008; 45:308-12.

Ferreira U, Netto Jr NR, Koff WJ, et al. Câncer da próstata localizado - melhores evidências para decisão clínica. In: **V Reunião do CoBEU**, 2005 fev 18; Belo Horizonte, MG.

Ferreira U, Sasse AD. **Diretrizes baseadas em evidências em tumores urológicos**. São Paulo: Dendrix Edição e Design: 2007. Câncer de próstata; p.11-20.

Floriano-Sanchez E, Cardenas-Rodrigues N, Castro-Marín M, et al. Determinación de 3 - nitrotirosina (3-NT) los tejidos con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. **Rev Mex Urol** 2009a; 69:224-30.

Floriano-Sánchez E, Cárdenas-Rodríguez N, Castro-Marín M, Zapata-Villalba MA, Flores-Terraza JE, Torres-Salazar JJ. Marcadores moleculares relacionados con cáncer de próstata: 3-Nitrotirosina y expresión génica y protéica de la Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD). **Arch Esp Urol** 2009b; 62:702-11.

Floriano-Sánchez E, Torres-Salazar J, Cárdenas-Rodríguez N, et al. Determinación de la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) en tejidos con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. **Rev Mex Urol** 2010; 70:341-6.

Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. **EXS** 1997; 79:1-8.

Fonseca FP. **Detecção imuno-histoquímica das sintases de óxido nítrico e VEGF como fatores prognósticos em portadores de adenocarcinoma localizado da próstata submetidos à prostatectomia radical retropúbica**. São Paulo; 2002. [Tese de Doutorado-Universidade de São Paulo].

Fonseca RP, Fernandes Junior AS, Lima VS, et al. Recidiva bioquímica em câncer de próstata: artigo de revisão. **Rev Bras Cancerol** 2007; 53:167-72.

Garg S, Fortling B, Chadwick D, Robinson MC, Hamdy FC. Staging of prostate cancer using 3-dimensional transrectal ultrasound images: a pilot study. **J Urol** 1999; 162:1318-21.

Geng YU, Blanco FJ, Cornelisson M, Lotz M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. **J Immunol** 1995; 155:796-801.

Ghadessi M, Bergstralh EJ, Erho N, et al. Validation of a genomic classifier that predicts metastatic disease progression in men with high risk pathological features post-prostatectomy. [abstract 36]. **J Clin Oncol** 2013; 31(Suppl 6). [Presented at the Genitourinary Cancers Symposium; 2013 feb 14-16; Orlando (Flórida)].

Guimarães GC, Ferreira FO, Lopes A. **Padronização de condutas e rotinas terapêuticas do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo**. 2ª ed. São Paulo: FAP; 2010.

Han M, Partin AWM, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Biochemical (Prostate Specific Antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. **J Urol** 2003; 169:517-23.

Hashimoto K, Masumori N, Takei F, et al. Prognostic value of surgical margin status for biochemical recurrence following radical prostatectomy. **Jpn J Clin Oncol** 2008; 38:31-5.

Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localized disease. **Eur Urol** 2011; 59:61-71.

Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. **Am J Pathol** 2001; 158:1245-51.

Huh J, Liepins A, Zielonka J, Andrekopoulos C, Kalyanaraman B, Sorokin A. Cyclooxygenase-2 rescues LNCaP prostate cancer cells from sanguinarine-induced apoptosis by a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase activity. **Cancer Res** 2006; 66:3726-36.

Jans J, van Dijk JH, van Schelven S, et al. Expression and localization of hypoxia proteins in prostate cancer: prognostic implications after radical prostatectomy. **Urology** 2010; 75:786-92.

JenkinsDC, CharlesIG, Thomsen LL, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995; 92:4392-6.

Kasper HU, Kern MA, Drebber U, Wolf HK, Kern MA. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic adenocarcinoma: correlation with microvessel density. **World J Gastroenterol** 2004; 10:1918-22.

Khan MA, Partin AW. Surgical margin status after radical retropubic prostatectomy. **BJU Int** 2005; 9:281-4.

Kim SC, Jeong I, Song C, Hong JH, Kim CS, Ahn H. Biochemical recurrence-free and cancer-specific survival after radical prostatectomy at a single institution. **Korean J Urol** 2010; 51:836-42.

Klotz T, Block W, Volberg C, Engelmann U, Addicks K. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. **Cancer** 1998; 82:1897-903.

Koff WJ, Pompeo ACL, Damião F, Carrerette FB. **Diretrizes em Uro-Oncologia**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Urologia; 2005.

Kummer CL, Coelho TCRB. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Rev Bras Anesthesiol** 2002; 52:498-512.

Kupelian PA, Katcher J, Levin HS, Klein EA. Stage T1-2 prostate cancer: a multivariate analysis of factors affecting biochemical and clinical failures after radical prostatectomy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1997; 37:1043-52.

Kupelian PA, Elshaikh M, Reddy CA, Zippe C, Klein EA. Comparison of the efficacy of local therapies for localized prostate cancer in the prostate-specific antigen era: a large single- institution experience with radical prostatectomy and external-beam radiotherapy. **J Clin Oncol** 2002; 20:3376-85.

Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci** 1996; 93:15069-74.

Leite KRM, Srougi M, Kauffman JR, et al. O padrão 4 de Gleason e o volume tumoral no prognóstico do carcinoma da próstata. **Rev Assoc Med Bras** 2005; 51:329-33.

Li M, Song J, Shikhanov S, et al. **The status of positive surgical margin at radical prostatectomy and risk of biochemical recurrence: a single institution experience.** 2009. Available from: <URL:<http://www.pathology.bsd.uchicago.edu/research/posters/LiProstateMargin>> [2011 jul 12].

Licks F, Marques CAM, Borges B, Ferraz AC, Marroni NAP. O Efeito modulatório do VEGF na liberação de NO e seu papel como via no desenvolvimento de estresse oxidativo em ratos com hipertensão portal. In: **XI Salão de Iniciação Científica**; 2010 ago 9-12; Porto Alegre (RS).

Lucia MS, Torkko KC. Inflammation as a target for prostate cancer chemoprevention: pathological and laboratory rationale. **J Urol** 2004; 171:S30-5.

Mazzucchelli R, Montironi R, Santinelli A, Lucarini G, Pugnali A, Biagini G. Vascular endothelial growth factor expression and capillary architecture in high-grade PIN and prostate cancer in untreated and androgen-ablated patients. **Prostate** 2000; 45:72-9.

McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). **Br J Cancer** 2005; 93:387-91.



Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa2012 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOS) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. **Cancer Lett** 1995; 93:17-48.

Montironi R, Cheng L, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A. Pathological definition and difficulties in assessing positive margins in radical prostatectomy specimens. **BJU Int** 2009; 103:286-8.

Nakagawa AS. **Estudo das expressões das sintases do óxido nítrico, nitrotirosina, ciclooxigenase-2 e CD34; e suas relações com o prognóstico nos pacientes portadores de condrossarcoma**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Nakagawa AS, Lopes A, Lopes de Carvalho A, et al. Nitric oxide synthases, cyclooxygenase-2, nitrotyrosine, and angiogenesis in chondrosarcoma and their relation to prognosis. **J Bone Joint Surg Am** 2010; 92:1738-46.

[NCCN] Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Prostate cancer**. 2007. Available from: <URL:[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/prostate.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/prostate.pdf)> [2011 junho 12].

Nualart F, Los Angeles García M, Medina RA, Owen GI. Glucose transporters in sex steroid hormone related cancer. **Curr Vasc Pharmacol** 2009; 7:534-48.

O'Brien BA, Cohen RJ, Wheeler TM, Moorin RE. A post-radical-prostatectomy nomogram incorporating new pathological variables and interaction terms for improved prognosis. **BJU Int** 2011; 107:389-95.

Ohuri M, Kattan M, Scardino PT, Wheeler TM. Radical prostatectomy for carcinoma of the prostate. **Mod Pathol** 2004; 17:349-59.

Oliver RJ, Woodward RT, Sloan P, Thakker NS, Stratford IJ, Airley RE. Prognostic value of facilitative glucose transporter GLUT-1 in oral squamouscell carcinomas treated by surgical resection; results of EORTC Translational Research Fund studies. **Eur J Cancer** 2004; 40:503-7.

Palayoor ST, Tofilon PJ, Coleman CN. Ibuprofen-mediated reduction of hypoxia-inducible factors HIF-1 and HIF-2 in prostate cancer cells. **Clin Cancer Res** 2003; 9:3150-7.

Partin AW, Kattan MW, Subong EN, et al. Combination of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason to predict pathological stage of prostate cancer. A multi institucional up date. **JAMA** 1997; 277:1445-51.

Partin AW, Feneley MR. Indicators of pathologic stage of prostate cancer and their use in clinical practice. **Urol Clin North Am** 2001; 28:443-58.

Pins MR, Fiadjoe JE, Korley F, et al. Clusterin as a possible predictor for biochemical recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy with intermediate Gleason escores. **Prostate Cancer Prostatic Dis** 2004; 7:243-8.

Potters L, Klein EA, Kattan MW, et al. Monotherapy for stage T1-T2 prostate cancer: radical prostatectomy, external beam radiotherapy, or permanent seed implantation. **Radiother Oncol** 2004; 71:29-33.

Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. **JAMA** 1999; 281:1591-7.

Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL. Molecular markers of prostate cancer outcome. **Eur J Cancer** 2005; 41:858-87.

Reid AHM, Attard G, Ambrosine L, et al. Molecular characterization of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. **Br J Cancer** 2010; 102:678-84.

Renda A, Bertrand T, Axel F, Reinier O, FranGois W, Van Cangh P. Prognostic significance of intraprostatic positive margins in organ confined (ptz) prostate cancer. **Eur Urol Suppl** 2002; (1):67.

Rhoden EL, Averbek MA. Câncer de próstata localizado. **Rev AMRIGS** 2010; 54:92-9.

Richardsen E, Uglehus RD, Due J, Busch C, Busund LT. COX-2 is overexpressed in primary prostate cancer with metastatic potential and may predict survival: a comparison study between COX-2, TGF-beta, IL-10 and Ki67. **Cancer Epidemiol** 2010; 34:316-22.

Roach M 3rd, Hanks G, Thames H Jr, et al. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2006; 65:965-74.

Rubio J, Ramos D, López-Guerrero JA, et al. Immunohistochemical expression of Ki-67, COX-2, and Bax/Bcl-2 in prostate cancer; prognostic value in biopsies and radical prostatectomy specimens. **Eur Urol** 2005; 48:745-51.

Rudlowski C, Moser M, Becker AJ, et al. GLUT1 mRNA and protein expression in ovarian borderline tumors and cancer. **Oncology** 2004; 66:404-10.

Sadi MV, Wroclawski ER, Fonseca CEC, Fonseca Filho LL, Billis A. **Câncer de próstata localizado: progressão bioquímica (PSA) após tratamento.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Urologia; 2006.

Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer - list of candidate biomarkers for prostate cancer and their possible clinical utility – prostate cancer biomarkers. **Clin Chem Rev** 2008, 54:1951-60.

Sardana G, Diamandis EP. Biomarkers for the diagnosis of new and recurrent prostate cancer. **Biomark Med** 2012; 6:587-96.

Sauvain JL, Palascak P, Bourscheid D, et al. Value of power doppler and 3D vascular sonography as a method for diagnosis and staging of prostate cancer. **Eur Urol** 2003; 44:21-30.

Shariat SF, Karam JA, Walz J, et al. Improved prediction of disease relapse after radical prostatectomy through a panel of preoperative blood-based biomarkers. **Clin Cancer Res** 2008; 14:3785-91.

Shikanov S, Song J, Royce C, et al. Length of positive surgical margin after radical prostatectomy as a predictor of biochemical recurrence. **J Urol** 2009; 182:139-44.

Sobin LH, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos.** [tradução de A L M Eisenberg]. 6ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Próstata; p.190-3.

Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, et al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. **J Clin Oncol** 2006a; 24: 3973-8.

Stephenson AJ, Scardino PT, Eastman JA, et al. Preoperative nomogram predicting the 10 -year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. **J Natl Cancer Inst** 2006b; 98:715-7.

Stokkel MP, Linthorst MF, Borm JJ, Taminiau AH, Pauwels EK. A reassessment of bone scintigraphy and commonly tested pretreatment biochemical parameters in newly diagnosed osteosarcoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2002; 128:393-9.

Thompson I, Thrasher JB, Aus G, et al. Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 Update. **J Urol** 2007; 177:2106-31.

Thompson III IM, Salem S, Chang SS, et al. Tumor volume as a predictor of adverse pathologic features and biochemical recurrence (BCR) in radical prostatectomy specimens: A tale of two methods. **World J Urol** 2011; 29:15-20.

Thurairaja R, Osborn J, McFarlane J, Bahal A, Persad R. Radical prostatectomy with positive surgical margins: how are patients managed? **BJU Int** 2006; 97:445-50.

Tyldesley S, Peacock M, Morris JW, et al. The need for, and utilization of prostate-bed radiotherapy after radical prostatectomy for patients with prostate cancer in British Columbia. **Can Urol Assoc J** 2012; 6:89-94.

Van der Kwast TH, Collette L, Van Poppel H, et al. Impact of pathology review of stage and margin status of radical prostatectomy specimens (EORTC trial 22911). **Virchows Arch** 2006; 449:428-34.

Verhagen PCMS, Tilanus MGJ, de Weger RA, van Moorselaar RJA, van den Tweel JG, Bonn TA. Prognostic factors in localised prostate cancer with emphasis on the application of molecular techniques. **Eur Urol** 2002; 41:363-71.

Vickers A, Bianco F, Cronin A, et al. The learning curve for surgical margins after open radical prostatectomy: implications for margins status as an oncological end point. **J Urol** 2010; 183:1360-5.

Wagner W, Westphal J, Anheuser P, Raush A. Radical prostatectomy – extraperitoneal laparoscopic approach as standard procedure with a steep training curve: experiences from 220 cases between August 2003 and March 2005. **Urology** 2005; 66:8.

Walsh PC. Radical retropubic prostatectomy. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED, editors. **Campbels textbook of urology**. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p.2865-86.

Wang Y, Walden M. Laparoscopic radical prostatectomy: our experience of 180 operations. **Urology** 2005; 66:9.

Wieder JA, Soloway MS. Incidence, etiology, location, prevention and reatment of positive surgical margins after radical prostatectomy for prostate cancer. **J Urol** 1998; 160:299-315.

Wink DA, Dodovotz Y, Laval LJ, Laval F, Dewhrist MW, Mitchell JB. The multifacer roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis** 1998; 19:711-21.

Wright JL, Lange PH. Newer potential biomarkers in prostate cancer. **Rev Urol** 2007; 9:207-13.

Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IC. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Res** 2002; 12:311-20.

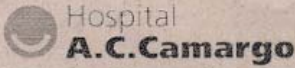


Zafirellis K, Zachaki A, Agrogiannis G, Gravani K. Inducible nitric oxide synthase expression and its prognostic significance in colorectal cancer. **APMIS** 2010; 118:115-24.

***ANEXOS***

---



## Anexo 1 - Exemplo de Laudo Anatomopatológico

 Hospital <b>A.C. Camargo</b> <small>Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer</small>	 660929172
Prontuario: 9055180 	<b>Atendimento: 1044853 I</b>
Paciente: <input type="text"/>	<b>Pedido de Exame: 353059</b>
Convênio: SUL AMERICA SERVIÇOS MEDICOS S/A	Laudo Interno: 929172
Médico Solicitante: STENIO DE CASSIO ZEQUI	Data: 14/07/2009 11:31:42
Setor: U.T.I - ADULTO	Página: 1 de 3 Digitador:

**EXAME ANATOMOPATOLÓGICO**

**MACROSCOPIA**

**MATERIAL RECEBIDO: PRODUTO DE PROSTATOVESICULECTOMIA:**

O material recebido para exame consta de produto de prostatectomia radical, pesando 58,5 gramas e medindo em seus maiores eixos 6,0x4,0x4,0 cm, previamente seccionada para exame de congelação. A superfície externa é fasciculada, acastanhada e firme. Na seqüência dos cortes realizados, a superfície é compacta, castanho-acinzentada, lobulada e opaca. Vesículas seminais bilaterais, sem alterações, medindo em média 3,0x2,5x1,5 cm. A superfície é multiloculada, com conteúdo viscoso acastanhado.

O órgão foi totalmente seccionado e processado para exame histológico no sentido margem vesical para a margem uretral.

Lobo direito, porção anterior:

AA (1F/1C)	AB (1F/1C)	AC (1F/1C)	AD (1F/1C)
AE (1F/1C)	AF (1F/1C)	AG (1F/1C)	AH (1F/1C)
AI - Margem vesical 3F			
AJ - Margem uretral 3F			

Lobo direito, porção posterior

AK (2F/1C)	AL (1F/1C)	AM (1F/1C)	AN (1F/1C)
AO (1F/1C)	AP (1F/1C)	AQ (1F/1C)	AR (1F/1C)
AS - Margem vesical 3F			
AT - Margem uretral 3F			

Lobo esquerdo, porção anterior

AU (1F/1C)	AV (1F/1C)	AW (1F/1C)	AX (1F/1C)
AY (1F/1C)	AZ (1F/1C)	BA (1F/1C)	BB (1F/1C)
BC - Margem vesical 3F			
BD - Margem uretral 3F			

Lobo esquerdo, porção posterior

BE (2F/1C)	BF (1F/1C)	BG (1F/1C)	BH (1F/1C)
BI (1F/1C)	BJ (1F/1C)	BK (1F/1C)	BL (1F/1C)
BM - Margem vesical 3F			
BN - Margem uretral 3F			

---

R. Professor Antonio Prudente, 211 - São Paulo - Liberdade - CEP 01509-010 - Tel (11) 2189-5000

## Continuação exemplo laudo anatomopatológico

Lobo direito, porção posterior  
B1 (2F/1C) B2 (1F/1C) B3 (1F/1C) B4 (1F/1C)  
B5 (1F/1C) B6 (1F/1C) B7 (1F/1C) B8 (1F/1C)  
B9 - Margem vesical 2F  
B10 - Margem uretral 2F

Lobo esquerdo, porção anterior  
C1 (1F/1C) C2 (1F/1C) C3 (1F/1C) C4 (1F/1C)  
C5 (1F/1C) C6 (1F/1C) C7 (1F/1C) C8 (1F/1C)  
C9 - Margem vesical 2F  
C10 - Margem uretral 2F

Lobo esquerdo, porção posterior  
D1 (2F/1C) D2 (1F/1C) D3 (1F/1C) D4 (1F/1C)  
D5 (1F/1C) D6 (1F/1C) D7 (1F/1C) D8 (1F/1C)  
D9 - Margem vesical 2F  
D10 - Margem uretral 2F

Vesícula seminal e canal deferente direito  
E1 - proximal (2F/1C) E2 - medial (2F/1C) E3 - distal (2F/1C)

Vesícula seminal e canal deferente esquerdo  
F1 - proximal (2F/1C) F2 - medial (2F/1C) F3 - distal (2F/1C)

G- Linfadenectomia iliaca direita: 1F  
H- Linfadenectomia iliaca esquerda: 1F  
I- 1ª congelação: 2F  
J- 2ª congelação: 1F  
K- 3ª congelação: 1F  
L- 4ª congelação: 1F  
M- 5ª congelação: 1F  
N- 6ª congelação: 1F  
O- 7ª congelação: 1F  
P- 8ª congelação: 1F  
Q- 9ª congelação: 1F  
R- 10ª congelação: 2F  
S- sobras de banco: 2F

v.em

### Conclusão:

Próstata (Prostatectomia radical):

\* ADENOCARCINOMA ACINAR USUAL.

Gradação histológica: Gleason 4+3 - Total - 7

Localização: predominantemente em porção posterior de lobo esquerdo e focos na porção posterior do lobo direito.

Volume da neoplasia: 15,25% do órgão acometido.

Invasão angiolinfática: presente.

Invasão perineural: presente.

Multicentricidade: ausente.

Invasão capsular: presente e focal.

Extensão extra prostática:

Em feixe vasculo-nervoso: não detectada.

Em tecido adiposo perprostático: não detectada.

Em musculatura estriada: não detectada.

Em tecidos moles ao redor da vesícula seminal: não detectada.

Em vesículas seminais: presentes nas porções medial e distal à direita, além de proximal e medial à esquerda.

Em ductos deferentes: ausência de neoplasia.

Margens cirúrgicas

Margem prostática: coincidente com a neoplasia, focalmente.

Margem vesical: livre de neoplasia.

Margem uretral: livre de neoplasia.

Tecido prostático adjacente à neoplasia:

Extensas áreas de neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (PIN).

Atrofia glandular.

Hiperplasia miofibroglandular.

Prostatite crônica focal.

Linfonodos:

Foram dissecados e examinados 2 linfonodos, os quais estão livres de comprometimento neoplásico (0/2), assim distribuídos:

iliaca direita: 0/1

iliaca esquerda: 0/1

Paredes posterior da uretra, anterior da uretra, lateral direita da uretra, lateral esquerda da uretra, anterior do colo vesical, posterior do colo vesical, parede lateral direita do colo vesical, parede lateral esquerda do colo vesical, parede posterior da uretra (ampliação I) e ampliação da parede posterior da uretra II: Livres de neoplasia.

NOTA: O presente espécime foi submetido a 10 exames de congelação intra-operatórios com controle por inclusão do material.

## Anexo 2 - Banco de dados dos 162 pacientes (MCP+MCN)

### Abreviações e categorias

- Id – identificação do caso
- Lâmina – numeração do laudo anatomopatológico
- iNOS – expressão da iNOS
- COX-2 – expressão da COX-2
- GLUT 1 – expressão da GLUT 1
- Nitro – expressão da Nitrotirosina
- Gle 1 – escore de Gleason primário
- Gle 2 – escore de Gleason secundário
- Gleason – escore de Gleason final
- Idade – idade dos pacientes
- PSA – dosagem plasmática do PSA em ng/ml antes da cirurgia
- Estadiamento clínico pré-operatório
- Estadiamento patológico
  - 1 – T2a
  - 2 – T2b
  - 3 – T3a
  - 4 – T3b
  - 5 – T4a
  - 6 – T4b
  - 1 – T1a
  - 2 – T1b
  - 3 – T1c
  - 4 – T2a
  - 5 – T2b
  - 6 – T3
- Volume tumoral – percentagem do volume total do espécime
- Invasão perineural
  - 0 – ausente
  - 1 – presente
  - 2 - extensa
- Invasão angiolinfática – 0 – ausente; 1 presente
- Invasão cápsula prostática
  - 0 – ausente
  - 1 - focal
  - 2 - extensa extracapsular
- Localização das margens cirúrgicas
  - 0 – nenhuma
  - 4 – prostática circunferencial
  - 7 - uretral
  - 8 – vesical
  - 9 – músculo estriado
- Peso da próstata em gramas
- RB e RC – Recidivas bioquímica e clínica: 0 – não; 1- sim
- Status no final do seguimento: 1 – vivo assintomático; 2 – vivo RB; 3 - vivo RC; 4 – morte pelo câncer; 5 – óbito por outras causas

Anexo 3 - Planilha do banco de dados dos 162 pacientes (MCP+MCN)

id	Lâmina	INDS	CDX2	GLUT1	Nitro	Gle1	Gle2	Gleason	Idade	PSA	Est. Cla	Est. Pat.	Vol. Tn	Inv_Perf	Inv_Angio	Inv_Caps	Locs_Marg	Peso Prost	RB	RC	DATAULT	STATUS
4	318764	3	1	3	3	4	3	7	65	33,8	3	3	55	1	0	0	4	43	1	0	04/06/06	5
5	320169	2	0	2	3	3	4	7	61	6	3	3	40	1	0	1	478	38	1	0	02/02/08	1
6	322974	1	1	3	3	3	3	6	63	9,3	3	3	40	1	0	1	48	70	1	0	01/01/08	5
8	323034	3	2	3	3	4	3	7	71	20,3	3	3	60	0	0	0	8	43	0	0	26/02/12	1
15	b97 04030	3	1	2	1	4	3	7	50	4,4	3	3	40	1	0	0	78	27	1	0	31/05/12	2
16	b97-05789	1	1	3	3	4	3	7	66	29,8	3	3	40	1	0	0	8	50	1	0	28/07/02	5
18	b97-08425	1	0	2	2	4	3	7	55	13	2	3	50	0	0	0	7	29	1	0	28/03/12	2
107	ba03-11509	2	1	2	2	3	4	7	62	8,1	5	3	30	1	0	1	8	39	0	0	19/03/09	5
19	b97-08577	2	0	1	2	3	3	6	71	5,3	3	3	80	1	0	0	78	31	0	0	26/02/12	1
21	b99-01804	1	0	2	2	3	4	7	63	17,6	3	3	35	0	0	1	78	40	0	0	15/03/12	1
46	ba0-03863	2	0	3	2	4	3	7	60	6,9	4	3	15	1	0	1	47	68	0	0	05/05/12	1
32	b99-01266	1	0	2	1	3	3	6	49	9,7	3	3	13	1	0	1	4	29	1	0	24/01/12	2
40	b99-09429	2	0	1	1	3	4	7	67	11,3	4	3	19	1	0	1	4	24	0	0	02/01/08	1
42	ba0-00362	3	0	3	2	4	5	9	57	5,95	2	1	3	0	0	0	0	38	0	0	14/06/12	1
51	ba0-6235	3	2	3	3	3	4	7	64	20,5	3	1	2,5	1	0	0	0	25	0	0	02/05/12	1
47	ba0 04546	0	0	1	0	3	3	6	67	3,4	2	3	10	1	0	0	7	45	0	0	10/09/12	1
60	ba0 09894	1	0	2	1	3	4	7	72	9,24	4	3	25,6	2	1	2	4	46	0	0	17/02/11	5
67	ba1-02081	1	0	3	2	3	3	6	74	9,12	4	3	15	1	0	0	4	23	0	0	17/02/12	1
215	A-710830	1	N	N	N	3	3	6	58	5,5	3	3	18	1	0	2	4	35	0	0	12/08/12	1
71	ba1-07210	1	0	2	1	3	3	6	61	6,6	4	3	7	1	0	1	4	43	0	0	23/07/12	1
79	ba02-002574	2	0	2	3	3	3	6	62	6,53	4	3	15	1	0	1	4	35	0	1	26/02/12	3
272	825394	1	0	1	2	4	3	7	55	9,74	4	3	7,5	1	0	1	4	28	1	0	26/02/12	2
179	ba06-007126	2	0	2	2	3	3	6	52	8	3	1	1	0	0	0	0	70	0	0	26/02/12	1
92	ba02-009303	2	0	1	1	5	4	9	58	6,48	4	3	35	1	0	1	4	40	1	1	15/04/11	4
96	ba02-01695	2	1	2	2	4	4	8	68	5,1	4	3	9,2	1	0	2	4	34	1	0	28/08/12	2
95	BA02-01696	1	0	N	2	3	4	7	61	17,8	3	2	20,5	1	0	1	7	46	1	0	19/04/12	2
102	ba03-004752	2	0	2	1	3	4	7	66	3,5	4	3	20,25	1	0	2	47	28	0	0	05/03/12	1
144	ba05-006502	0	0	1	1	3	3	6	54	4,6	4	3	16,75	1	0	2	4	27	1	0	09/04/12	2
234	A-723538	1	0	2	1	4	3	7	68	4,22	3	3	14,5	1	0	1	8	22	0	0	19/04/12	1
109	ba04-00894	2	0	2	2	4	3	7	73	5,6	4	1	1	0	0	0	0	35	0	0	24/02/12	1
106	BA03-01072	1	0	1	2	4	3	7	56	8,3	4	2	11	1	0	1	4	21	1	0	21/03/12	2
110	ba04-001935	2	2	3	2	4	3	7	55	4,3	4	2	13	1	0	0	478	57	0	0	15/05/12	1
111	ba04-002920	1	0	2	1	3	3	6	67	5,65	4	1	1	0	0	0	0	32	0	0	30/07/12	1
125	ba04-010527	1	0	3	2	3	3	6	57	5,59	3	3	7,5	0	0	1	4	93	0	0	25/02/12	1
118	ba04-007688	2	1	2	1	3	3	6	66	6,62	4	1	4,25	1	0	0	0	50	0	0	28/04/12	1
119	ba04-008968	2	1	1	2	4	3	7	62	6,1	3	3	11	1	0	1	4	35	0	0	17/04/12	1
121	ba04-9175	1	0	2	2	4	3	7	61	6,06	5	3	9	2	0	1	4	35	1	0	31/05/12	2
138	ba05-002168	1	1	N	2	3	3	6	52	5,4	3	3	3,5	0	0	1	4	47	0	0	20/07/12	1
120	ba04-9034	2	1	2	2	3	3	6	66	5	3	3	3,75	0	0	0	7	50	0	0	20/04/12	1
127	ba04-011257	1	1	3	2	4	3	7	62	20,28	3	3	10	1	0	1	7	33	1	0	03/04/12	2
131	ba05-000228	3	1	3	2	3	3	6	66	4,41	3	1	3,5	0	0	0	0	50	0	0	24/02/12	1
133	BA05-00047	2	2	2	2	3	3	6	64	2,96	3	1	8	1	0	1	4	40	1	0	04/08/12	2



Continuação planilha do banco de dados

Lâmina	IMOS	COV2	GLUT1	Mitro	Gle1	Gle2	Gleason	Idade	PSA	Est. Clm	Est. Pat.	Vol. Te	Inr. Per	Inr. Ataqio	Inr. Caps	Local	Mud	Peso	Prost.	PB	RC	DATA	AUTLIC	STATUS
134	ba05-001877	1	N	2	1	3	3	6	63	3,8	3	3	13,6	1	1	2	49	43	0	0	0	0	09/02/12	1
175	ba06-006553	1	0	1	2	3	3	6	62	4,57	3	3	7	0	0	2	48	61	0	0	0	0	12/02/12	1
140	ba05-005455	2	N	2	4	3	3	7	67	3,24	4	3	1,25	0	0	1	4	40	1	1	1	1	30/08/12	3
139	ba05-005288	2	1	3	2	3	3	6	57	5,62	4	3	6,5	0	0	2	7	40	0	0	0	0	25/08/12	1
164	ba06-003608	1	N	1	N	3	4	7	63	5,52	2	3	5,8	1	1	1	4	50	1	0	0	0	24/03/12	2
246	A-805440	1	0	1	1	3	3	6	59	6,48	4	1	3,5	0	0	0	0	54	0	0	0	0	25/05/12	1
148	ba06-006916	2	2	2	2	3	3	6	59	2,21	3	2	1	0	0	0	0	30	0	0	0	0	17/05/12	1
161	ba05-005011	2	1	1	1	3	3	6	56	11,28	3	3	6,2	1	0	0	4	58	0	0	0	0	24/02/12	1
160	ba05-003056	1	1	2	2	4	3	7	71	4,7	4	3	12	2	0	0	9	43	0	0	0	0	25/02/12	1
162	ba05-011695	3	1	3	2	3	3	6	62	4,94	3	3	4	0	0	0	4	43	0	0	0	0	27/02/12	1
183	ba06-009008	1	0	1	1	3	3	6	66	11,29	2	3	6,6	0	0	0	47	50	0	0	0	0	10/02/12	1
163	ba05-001770	2	1	1	1	3	5	8	53	15,89	4	3	23,25	2	0	1	4	20	1	0	0	0	24/02/12	2
165	ba05-011877	0	1	1	1	4	3	7	61	8,89	4	3	25,6	1	0	2	4	39	1	0	0	0	08/05/12	2
169	ba06-001749	3	1	3	2	4	5	9	60	12	3	3	30	2	0	1	7	33	1	0	0	0	24/02/12	2
163	ba06-003533	0	0	2	1	3	3	6	57	11,32	3	3	3,5	0	0	0	4	56	0	0	0	0	03/07/12	1
166	ba06-004211	1	0	1	1	4	3	7	50	5,28	3	3	7,25	1	0	2	4	44	0	0	0	0	17/04/12	1
162	ba06-003486	2	0	2	2	2	2	4	70	4,48	3	1	3,25	0	0	0	0	65	1	0	0	0	10/04/12	2
168	ba06-004536	1	1	1	1	4	3	7	62	6,53	4	3	13,25	1	0	0	47	43	0	0	0	0	10/05/12	1
173	ba06-006159	0	0	1	1	3	3	6	57	6,79	4	1	2	2	0	0	4	85	0	0	0	0	28/02/12	1
164	ba06-009018	3	1	2	2	4	3	7	56	6,1	4	3	16	2	0	0	7	40	1	1	0	0	02/02/12	2
170	ba06-005822	1	1	3	1	3	3	6	55	5,69	4	3	6	1	0	0	4	43	0	0	0	0	09/02/12	1
174	ba06-006344	2	2	2	2	3	3	6	60	6,71	2	1	2	1	0	0	0	40	0	0	0	0	03/04/12	1
162	ba06-007842	1	0	3	2	4	3	7	50	23,9	5	3	12,7	1	0	1	479	45	1	0	0	0	26/03/12	2
178	ba06-006739	3	1	2	2	4	3	7	57	9,61	3	3	25	1	1	2	7	41	1	1	0	0	09/03/11	4
171	ba06-006949	1	1	2	2	3	4	7	63	9,1	4	3	17,5	1	0	1	478	51	1	0	0	0	09/05/12	2
161	ba06-003064	1	2	N	2	4	5	9	43	78,8	1	3	56,5	1	0	2	43	50	1	0	0	0	30/08/12	2
172	ba06-006039	3	3	1	3	4	3	7	64	9,65	4	3	14,5	1	0	2	4	25	1	1	0	0	03/05/12	3
180	ba06-007272	1	1	2	1	3	3	6	60	2,95	4	1	2,75	1	0	0	0	35	0	0	0	0	08/05/12	1
188	ba06-011738	2	2	3	3	3	3	6	54	4,3	3	1	2	0	0	0	0	57	0	0	0	0	04/05/12	1
168	ba06-009751	2	1	3	3	4	3	7	57	4,8	3	3	25	1	0	2	478	35	0	0	0	0	09/05/12	1
168	ba06-012420	1	1	1	2	3	4	7	74	5,25	3	3	16	1	0	0	47	45	0	0	0	0	12/05/12	1
190	ba06-012857	1	0	2	1	3	3	6	64	4,75	4	3	15	0	0	0	7	54	0	0	0	0	05/08/12	1
169	ba07-002395	2	2	2	3	4	3	7	50	10,6	4	3	10,5	1	1	2	49	30	1	0	0	0	10/05/12	2
193	ba07-000666	2	1	1	1	3	3	6	76	6,5	3	2	5,2	0	0	1	4	60	0	0	0	0	10/11/10	5
195	ba07-001033	2	1	3	2	3	4	7	68	7	3	2	6,1	1	0	0	78	35	0	0	0	0	09/04/12	1
202	ba07-003517	2	1	1	2	4	5	9	72	12	2	1	15	0	0	0	0	52	1	0	0	0	05/05/12	2
204	ba07-004744	1	2	1	2	3	3	6	75	5,3	2	1	2	0	0	1	0	55	0	0	0	0	10/03/12	1
211	A-708921	2	1	2	1	3	3	6	53	3,2	4	1	4	1	0	0	0	42	0	0	0	0	08/06/12	1
216	A-7099	3	2	2	2	4	3	7	68	6	3	2	6,5	1	0	0	7	43	0	0	0	0	05/03/12	1
200	ba07-002521	2	2	1	3	3	3	6	47	10,14	3	3	16	2	0	1	9	30	0	0	0	0	10/03/12	1
232	A-722810	1	0	1	1	3	3	6	68	6,21	3	3	1,25	0	0	0	8	45	0	0	0	0	10/03/12	1
207	A-706371	1	1	1	1	3	3	6	55	4,5	2	1	5	1	0	0	0	43	0	0	0	0	10/03/12	1

Continuação planilha do banco de dados

d	Lâmina	INDS	COX2	GLUT1	Mitro	Gle1	Gle2	Gleason	Idade	PSA	Est. Clin	Est. Pat.	Vol. Tc	Inv. Per	Inv. Anqio	Inv. Caps	Local_Misd	Peso Prost	RB	RC	DATAUTC	STATUS	
217	A-71449	2	2	2	2	2	3	4	7	54	3,5	3	3	22	1	0	2	789	48	1	0	17/03/12	2
218	A-71396	2	1	1	2	4	3	7	66	8,6	3	3	3	3,5	1	0	0	8	93	0	0	10/09/12	1
219	A-70959	3	1	1	2	3	3	6	49	8,72	2	2	10	1	0	0	48	55	0	0	31/07/12	1	
220	A-714374	3	0	1	1	3	4	7	65	4,3	1	1	1,75	1	0	0	0	55	0	0	25/05/12	1	
219	A-71843	1	0	1	2	3	4	7	65	6,3	4	3	15	0	1	1	4	42	0	0	29/03/12	1	
263	818182	1	0	2	1	4	3	7	67	3,3	3	3	6,9	1	0	1	4	40	0	0	10/09/12	1	
228	A-718343	1	0	2	2	3	4	7	69	6,46	3	1	2,8	1	0	1	4	50	0	0	10/09/12	1	
230	A-720202	1	1	2	1	3	4	7	57	5	4	1	2,5	0	0	0	0	35	0	0	10/09/12	1	
257	811664	2	1	2	2	3	4	7	67	7,19	2	3	8	0	0	1	47	65	0	0	10/09/12	1	
231	A-721238	2	1	2	1	3	4	7	71	12,19	3	3	2,5	0	0	1	4	60	0	0	20/03/12	1	
80	ba02-003229	3	1	2	2	3	3	6	62	4,57	3	1	4,2	1	1	0	0	28	0	0	03/04/12	1	
206	A-706392	2	1	1	2	3	5	8	59	24	3	3	30	1	0	2	48	45	1	0	12/06/12	2	
236	A-723863	2	0	1	1	4	4	8	75	2,37	4	1	2,2	0	0	0	30	0	0	0	10/09/12	1	
233	A-723328	1	0	1	1	3	3	6	68	4,84	3	3	16	1	0	2	47	38	0	0	10/09/12	1	
235	A-723548	2	0	2	1	3	3	6	54	6,17	3	1	1,5	0	0	0	0	64	0	0	21/01/12	1	
243	A-802520	1	1	2	1	3	4	7	69	3,63	2	1	1	0	0	0	0	35	0	0	27/06/12	1	
242	A-802405	0	0	2	1	3	3	6	66	5,29	4	1	2,5	1	0	0	0	100	1	0	0	06/07/12	2
244	A-804827	1	0	1	1	3	3	6	51	6,8	3	3	6	1	0	0	7	33	0	0	06/03/12	1	
209	A-706840	2	1	2	1	3	3	6	48	3,68	3	3	6	1	0	1	4	33,5	0	0	02/02/12	1	
304	924323 N	0	1	1	1	3	3	6	65	4,37	4	2	7,74	1	0	1	4	49	1	0	22/03/12	2	
251	A-809852	2	0	2	1	4	3	7	54	5,55	3	1	2	1	0	0	0	42	0	0	02/02/12	1	
260	812833	2	0	1	1	4	3	7	65	7,59	3	2	2	0	0	1	47	39	1	0	04/01/12	2	
249	A-808189	1	0	1	2	3	3	6	50	7,42	3	3	20	1	0	0	4	36	0	0	28/02/12	1	
248	A-807609	2	0	1	2	4	3	7	78	10,2	3	3	30	1	1	2	4	46,5	0	0	05/05/12	1	
255	810862	1	0	1	1	3	3	6	53	4,24	4	3	11,25	1	0	1	4	24	1	0	21/05/12	2	
262	815873	1	0	1	1	4	4	8	57	11,81	4	2	10	1	0	0	4	30,5	1	0	06/07/12	2	
266	811081	1	1	2	2	5	3	8	75	24	4	3	25	1	0	1	47	71	1	0	20/08/12	2	
261	815419	0	0	2	1	5	4	9	63	14	3	3	16	1	0	2	4	29,5	1	0	04/04/12	2	
259	812473	0	0	2	1	5	3	8	72	5,8	3	3	6	1	0	1	47	44	0	0	17/07/12	1	
270	823347	0	0	1	1	3	5	8	72	5,5	4	2	15	1	0	1	4	28,5	1	0	10/09/12	2	
286	836798	1	1	2	1	3	4	7	52	2,77	3	3	3,4	1	0	0	4	29,5	0	0	20/08/12	1	
266	821953	1	1	1	1	4	4	8	77	7,14	3	3	7	1	0	1	4	40,5	0	0	15/08/12	1	
268	901914	1	0	2	1	3	4	7	57	8,6	3	1	1,6	0	0	0	0	31,5	0	0	10/09/12	1	
268	822586	2	1	2	1	3	4	7	58	17,06	5	3	17	1	0	0	47	46,5	1	0	10/09/12	2	
281	831177	1	0	1	1	3	3	6	46	2,5	3	3	5	0	0	2	4	34	0	0	20/05/12	2	
264	835261 N	0	1	1	1	4	3	7	59	3,8	3	1	2	0	0	0	0	38,5	0	0	10/09/12	1	
269	822870	1	0	1	1	4	3	7	62	8,52	3	1	5	1	0	0	0	34,5	0	0	28/07/12	1	
271	825371	1	1	1	1	3	3	6	54	3,72	3	1	1	0	0	0	0	39	0	0	27/07/12	1	
276	827702	1	1	2	1	4	3	7	61	13,3	4	3	21,75	2	1	1	7	33,5	0	0	17/04/12	1	
274	827037	1	N	1	1	4	4	8	72	9,29	4	1	1	1	0	0	0	102,5	0	0	10/09/12	1	
279	830103	2	0	3	1	3	4	7	65	18,54	5	3	9	1	1	1	4	42	1	0	28/05/12	2	
282	832744	2	1	2	1	3	4	7	69	7,48	2	1	2	0	0	0	0	42	0	0	18/04/12	1	



**Anexo 4 - Planilha dos 162 pacientes portadores de CaP com e sem margens comprometidas para identificação nas lâminas do TMA em duplicata (nº do laudo anatomopatológico e da lâmina com fragmento mais representativo do tumor)**

*Nitrostatina*

mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	mm
0																	0
1	319754 A(4)	319754 B(3)	320169 B(3)	320169 B(4)	322974 C(2)	322974 C(3)	329034 A(4)	329034 C(3)	B97-4030 A(4)	B97-4030 A(3)	B97-5769 A(3)	B97-5769 C(1)	B97-8425 A(4)	B97-8425 A(4)	B97-8425 B(3)	B97-8425 A(3)	18.0
1.2	B97-8577 A(4)	B98-1804 A(3)	B99-1256 B(3)	B99-1256 B(4)	B99-9429 D(1)	B99-9429 D(3)	BA0-352 B(3)	BA0-352 B(1)	BA0-3683 B(2)	BA0-3683 B(4)	BA0-6235 D(3)	BA0-6235 D(4)	BA0-9894 B(3)	BA0-9894 B(3)	BA0-9894 A(3)	BA1-2081 A(3)	1.2
2	BA1-2081 A(4)	BA1-7210 A(3)	BA1-7210 B(3)	BA2-2574 A(3)	BA2-2574 A(7)	BA2-3229 D(3)	BA2-3229 B(3)	BA2-3303 B(3)	BA2-11695 C(8)	BA2-11695 D(8)	BA2-11696 B(7)	BA2-11696 D(3)	BA3-4752 A(2)	BA3-4752 A(5)	BA3-10724 A(3)	BA3-10724 A(4)	2.4
3	BA3-10724 D(2)	BA3-11509 D(8)	BA3-11509 A(8)	BA4-884 D(1)	BA4-884 D(1)	BA4-1935 B(2)	BA4-2820 C(4)	BA4-2820 C(4)	BA4-7688 B(4)	BA4-7688 B(5)	BA4-8868 B(5)	BA4-9034 C(7)	BA4-9034 A(4)	BA4-9034 A(4)	BA4-9175 A(4)	BA4-9175 A(4)	3.6
4	BA4-9175 D(2)	BA4-10527 D(3)	BA4-10527 D(7)	BA4-11257 A(8)	BA5-226 D(3)	BA5-226 D(4)	BA5-478 A(2)	BA5-478 A(3)	BA5-1177 B(6)	BA5-1177 D(7)	BA5-2168 D(8)	BA5-2168 D(8)	BA5-10601 D(2)	BA5-10601 D(2)	BA5-10356 D(2)	BA5-10356 D(2)	4.8
5	BA5-10356 A(5)	BA5-3591 D(3)	BA5-3591 D(5)	BA5-5288 C(5)	BA5-5288 O(3)	BA5-5455 A(8)	BA5-5455 C(7)	BA5-6502 A(3)	BA5-6502 B(4)	BA5-8916 C(3)	BA5-11695 B(8)	BA5-11695 B(8)	BA5-11770 B(7)	BA5-11770 B(8)	BA5-11977 B(5)	BA5-11977 B(5)	6.0
6	BA5-11977 B(5)	BA6-1749 B(3)	BA6-1749 B(5)	BA6-3064 A(6)	BA6-3064 A(6)	BA6-3486 D(5)	BA6-3486 D(8)	BA6-5344 B(6)	BA6-5344 D(5)	BA6-6553 A(7)	BA6-6553 D(3)	BA6-6739 D(6)	BA6-6739 D(6)	BA6-4536 B(8)	BA6-5822 C(2)	BA6-5822 C(2)	7.2
7	BA6-5822 C(5)	BA6-5949 A(4)	BA6-5949 B(6)	BA6-6039 B(1)	BA6-6039 B(2)	BA6-6159 A(2)	BA6-6159 B(7)	BA6-6344 B(8)	BA6-6344 D(5)	BA6-6553 D(6)	BA6-6739 A(2)	BA6-6739 A(3)	BA6-7126 B(8)	BA6-7126 B(8)	BA6-7272 D(4)	BA6-7272 D(4)	8.4
8	BA6-7272 D(6)	BA6-7842 C(8)	BA6-7842 Q(3)	BA6-9009 D(5)	BA6-9009 D(4)	BA6-9018 C(6)	BA6-9018 D(2)	BA6-9751 D(5)	BA6-9751 D(7)	BA6-11738 C(6)	BA6-11738 C(8)	BA6-12420 D(3)	BA6-12420 D(3)	BA6-12857 D(1)	BA6-12857 D(2)	BA6-12857 D(2)	8.8
9	BA7-666 A(4)	BA7-666 A(8)	BA7-1033 B(7)	BA7-2389 D(6)	BA7-2389 D(6)	BA7-2521 C(7)	BA7-2521 C(3)	BA7-3517 B(4)	BA7-3517 D(3)	BA7-4744 B(3)	BA7-4744 D(3)	BA7-4744 D(3)	BA7-06371 D(7)	BA7-06371 D(7)	BA7-06392 A(2)	BA7-06392 A(2)	10.8
10	A-706840 C(7)	A-706840 D(7)	A-708921 D(5)	A-708921 D(6)	A-709519 B(3)	A-709519 C(1)	A-70830 C(1)	A-70830 C(1)	A-71099 A(8)	A-71099 B(8)	A-71449 B(6)	A-71449 B(6)	A-71843 A(7)	A-71843 B(7)	A-713396 C(3)	A-713396 C(3)	12.0
11	13.2	3	3	2	3	3	2	3	1	1	1	X	3	2	2	2	13.2
12	14.4	2	1	1	0	1	2	2	2	2	2	3	2	1	1	2	14.4
13	15.6	2	1	1	2	2	2	1	X	X	2	2	1	1	1	2	15.6
14	16.8	1	2	2	2	2	2	1	X	X	1	1	2	2	2	2	16.8
15	18.0	1	2	2	2	2	2	X	1	1	X	2	2	1	1	2	18.0
16	19.2	2	1	X	2	X	2	X	1	2	1	2	X	X	2	1	19.2
17	20.4	2	2	2	1	2	2	X	X	X	X	1	1	1	X	1	20.4
18	21.6	1	X	2	3	1	1	2	X	X	2	2	X	2	1	1	21.6
22.8	1	1	1	1	2	1	2	X	3	3	3	X	X	2	1	1	22.8
mm	1.0	X	1.2	2.4	2.4	2.4	2.4	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	18.0
mm	1.0	1.1	1.2	1.3	2.4	2.5	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
TMA 1.0mm																	
TMA 1.0mm																	
Agosto.2012																	

*0 - Neg  
1 + pedo  
2 + mod  
3 + porta*

**Título: Próstata-15**  
**Autor: Dra. Isabela-Dra. Stephania-Ricardo**  
*Stephane*

17/10/12



Continuação do exemplo da planilha do TMA

mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	mm
0	A-714374 B1(3)	A-718343 B3(3)	A-720202 B8(4)	A-721238 B8(3)	A-722810 D7(4)	A-723328 A8(4)	A-723538 D8(4)	A-723548 B7(3)									
1	A-723548 B8(3)	A-802405 D4(3)	A-802520 B5(4)	A-804827 C5(3)	A-805440 B4(3)	A-807609 B7(4)	A-808199 D8(3)	A-809652 D3(3)									
2	A-809652 D4(3)	810862 D5(3)	811664 D3(4)	811664 D5(3)	812473 B8(4)	812473 D8(3)	815419 A1(3)	818182 B2(4)									
3	818182 D5(3)	821353 B8(3)	822586 A5(5)	822870 B8(5)	823347 AL(3)	825371 AZ(3)	825394 BH(4)	827702 AD(3)									
4	827702 AP(4)	830103 AO(3)	831177 A5(5)	832744 AN(4)	835261 AU(3)	836186 AH(3)	836798 BG(3)	901914 AZ(3)									
5	901914 AF(3)	903171 AO(4)	903223 AR(5)	904874 CF(3)	905003 BL(3)	905594 BI(3)	905643 BH(4)	907977 AZ(3)									
6	907977 BI(4)	908176 AF(3)	915889 AO(4)	916819 BH(4)	914946 A N(5)	921450 AM(3)	921450 AN(3)	924323 AZ(3)									
7	924323 BG(4)	927327 AM(3)	927421 AB(3)	928971 AH(4)	928971 BI(4)	929172 A N(5)	929502 AM(3)	924314 AO(4)									
8	937664 A N(3)	940866 AM(3)	943637 BH(3)	947371 AO(4)	948407 AF(4)	948567 AG(4)	1005943 BF(4)	1008165 AL(3)									
9	1008165 AK(3)	1009841 AF(3)	1014764 BH(3)	1016795 AO(5)	1016830 AO(4)	1016830 AQ(3)	1017415 AG(4)	1018184 AW(3)									
10	12,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12,0
11	13,2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13,2
12	14,4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14,4
13	15,6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15,6
14	16,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16,8
15	18,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18,0
16	19,2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19,2
17	20,4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20,4
18	21,6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21,6
19	22,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22,8

Mitrogenação

Agosto.2012

TMA 1.0mm

Título: Próstata-16  
Autor: Dra. Isabela-Dra. Stephania-Ricardo

17/9/12