

UNINOVE - UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Érika Aparecida Felix de Barros

**Aneuploidia dos cromossomos 3, 7, 9 e 17 no câncer  
de próstata localizado tratado com cirurgia: Análise e  
correlação prognóstica.**

São Paulo, SP

2014

**ÉRIKA APARECIDA FELIX DE BARROS**

**Aneuploidia dos cromossomos 3, 7, 9 e 17 no câncer de  
próstata localizado tratado com cirurgia: Análise e correlação  
prognóstica.**

Dissertação apresentada  
à Universidade Nove de Julho, para obtenção  
do título de Mestre em Medicina

Orientador: Dr. José Pontes Junior

São Paulo, SP

2014

## Ficha Catalográfica

Barros, Érika Aparecida Felix de.

Aneuploidia dos Cromossomos 3, 7, 9 e 17 no câncer de próstata localizado tratado com cirurgia: Análise e correlação prognóstica./

Érika Aparecida Felix de Barros. 2014.

72 f

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.

Orientador (a): Prof. Dr. José Pontes Junior.

1. Câncer de próstata. 2. Citogenética próstata. 3. Tissue microarray.

I. Pontes Junior, José.

II. Título

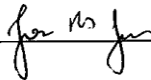
CDU 616

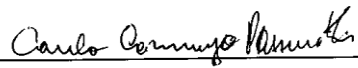
São Paulo, 18 de dezembro de 2013.

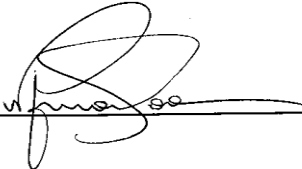
**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno(a): Erika Aparecida F. Barros

Título da Dissertação: "Alterações citogenética dos cromossomos 3,7,9 e 11 no câncer próstata localizado tratado com cirurgia: Analise e correção prognostica"

Presidente: PROF. DR. José Pontes Júnior 

Membro: PROF. DR. Carlo Camargo Passerotti 

Membro: PROFA. DRA. Nádia Guimarães 

**Dedico este trabalho a meus pais que  
incentivaram e me acompanharam  
durante toda a jornada deste trabalho.**

**A Michael Vale Pinto que me incentivou  
a iniciar o Mestrado e que esteve  
lado a lado estudando e me auxiliando  
nos momentos difíceis**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço em primeiro lugar a Deus por ser à base das minhas conquistas.**

**A meus pais Ivanildo de Barros e Magda Aparecida Felix de Barros, e a meu noivo Michael Vale Pinto, por acreditarem, participarem e investirem em minhas escolhas, apoiando-me e esforçando-se junto a mim para que eu suprisse todas elas.**

**Ao Professor Doutor José Pontes Junior, pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho, me incentivando e colaborando no desenvolvimento de minhas ideias.**

**Às doutoras:**

**Kátia Ramos Moreira Leite pelo apoio, parceria, confiança e participação integrada a este trabalho.**

**Ísida de Campos Souza pela execução da FISH e por ter me ensinado e dado todo o apoio necessário à execução deste trabalho.**

**Fernanda Colombo Consolim e Kátia De Angelis pela confiança.**

**E a Sabrina Thalita Reis pelo apoio e ajuda em toda parte estatística do trabalho.**

**À Universidade Nove de Julho (UNINOVE) pelo incentivo ao estudo e a CAPES pela bolsa PROSUP, parte primordial a meus estudos.**

“Seja o que você quer ser, porquê você  
possui apenas uma vida e nela só se tem  
uma chance de fazer aquilo que quer.”

Clarice Lispector

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de próstata (CaP) é o tumor sólido não cutâneo mais comum do homem em países ocidentais. O prognóstico é feito pela dosagem do PSA, estágio e escore de Gleason, porém, nenhum destes fatores clássicos, mesmo quando avaliados em conjunto, apresentam bom desempenho na determinação prognóstica, por isso marcadores moleculares estão sendo estudados. Alterações citogenéticas, representadas por ganhos e deleções cromossômicas, são características da oncogênese e potencialmente podem ser empregadas como marcador de prognóstico. **Objetivos:** O estudo teve como objetivo principal identificar as alterações citogenéticas de aneuploidia nos cromossomos 3, 7, 17 e locus 9p21 pela técnica de FISH no CaP localizado submetido à prostatectomia radical. Como objetivo secundário correlacionamos as alterações encontradas com a recidiva bioquímica após tratamento cirúrgico e com os fatores prognósticos clássicos do adenocarcinoma de próstata. **Metodologia:** Para este estudo caso controle foram analisados 112 pacientes com diagnóstico de CaP clinicamente localizado submetidos à prostatectomia radical com seguimento pós operatório superior a dez anos. As amostras do tumor primário de cada paciente foram disponibilizadas em matriz de microarranjo tecidual e as alterações citogenéticas foram avaliadas através da técnica de FISH. **Resultados:** Dos pacientes avaliados para o locus 9p21, 6,4% apresentaram perdas de um dos dois alelos. Em relação aos resultados obtidos para os cromossomos 3, 7 e 17 encontramos deleção de um dos alelos em 2,3; 1,2 e 1,8% dos casos respectivamente. Não observamos associação entre aneuploidia desses cromossomos com o escore de Gleason, estágio patológico, nível sérico de PSA ou grupo de risco. Observamos que a perda do locus 9p21 esteve associado a menor tempo para recidiva (p 0,038). **Conclusões:** Encontramos baixa ocorrência de aneuploidia detectadas pelas sondas CEP 3, 7 e 17 e LSI 9p em nossa série de tumor. Observamos que a perda do locus 9p21 esteve associado a pior prognóstico no CaP localizado tratado com cirurgia.

**Palavras chaves:** Câncer de Próstata; Citogenética; FISH; Tissue Microarray; locus 9p21.



## ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the most common non-skin solid tumor in man in western countries. The prognosis is defined by the measurement of PSA, stage and Gleason score, however, none of these factors classics, even when combined, show good performance in prognosis definition, therefore molecular markers are being studied. Cytogenetic abnormalities, represented by chromosomal deletions and gains, are characteristic of oncogenesis and potentially can be used as a prognostic marker. **Objectives:** The study aimed to identify the cytogenetic alterations of aneuploidy in chromosomes 3 , 7 , 17 and 9p21 locus by FISH technique located in PCa underwent radical prostatectomy. As a secondary objective correlate the changes found with biochemical recurrence after surgical treatment and the classical prognostic factors of prostate adenocarcinoma. **Methodology:** For this case-control study 112 patients with clinically localized PCa who underwent radical prostatectomy were followed up postoperatively than ten years were analyzed. Samples of the primary tumor of each patient were available for tissue microarray matrix and cytogenetic changes were assessed by FISH technique. **Results:** Among the patients for the 9p21 locus, 6.4 % had lost one of the two alleles. In relation to the results obtained for chromosomes 3, 7 and 17 find deletion of one allele of 2.3, 1.2 and 1.8% of the cases respectively. No association between aneuploidy of these chromosomes with the Gleason score, pathological stage, serum PSA level or risk group . We observed that the loss of the 9p21 locus was associated with shorter time to recurrence (p 0.038 ). **Conclusions:** We found a low occurrence of aneuploidy detected by probes CEP 3 , 7 and 17 and LSI 9p in our series of tumors. We observed that the loss of the 9p21 locus was associated with worse prognosis in CaP located treated with surgery.

**Keywords:** Prostate Cancer; Cytogenetics; FISH; Tissue Microarray, locus 9p21.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representação gráfica da graduação histológica de Gleason (cedida por Leite KRM).....                                                                                             | 15 |
| Figura 2. Organograma da relação dos pacientes e elaboração da pesquisa .                                                                                                                   | 22 |
| Figura 3. Lâmina de TMA contendo 112 casos de CaP (Imagem do arquivo pessoal).....                                                                                                          | 23 |
| Figura 4. Bloco receptor do TMA contendo os cilindros com as amostras do tecido a ser estudado (cedido por Leite KRM).....                                                                  | 24 |
| Figura 5. Demonstração da técnica de Hibridação <i>in situ</i> (cedido por Leite KRM).....                                                                                                  | 25 |
| Figura 6. FISH normal e anormal utilizando o kit UroVysion: CEP 7 (verde), 3 (vermelho), 17 (azul); LSI 9p21 (amarelo). A – normal; B – FISH célula polissômica (cedido por Leite KRM)..... | 26 |
| Figura 7. Célula anormal hemizigótica hibridizada com o kit UroVysion: sonda amarela representa a LSI 9p21 (cedido por Leite KRM).....                                                      | 27 |
| Figura 8. FISH com o emprego da sonda LSI para identificação do locus 9p21.....                                                                                                             | 32 |
| Figura 9. FISH com o uso das sondas para identificação dos cromossomos 3, 7, 9 e 17.....                                                                                                    | 33 |
| Figura 10. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda do locus 9p21.....                                                                                                                | 36 |
| Figura 11. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda de sinal de pelo menos uma das sondas.....                                                                                        | 36 |
| Figura 12. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda do cromossomo 7.....                                                                                                              | 37 |
| Figura 13. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda do cromossomo 17.....                                                                                                             | 37 |
| Figura 14. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda do cromossomo 3.....                                                                                                              | 38 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Exemplificação dos critérios para estratificação de risco de D'Amico.<br>.....                                       | 21 |
| Tabela 2. Dados clínicos e demográficos do estudo caso controle de acordo com a recorrência ou não do tumor após cirurgia..... | 31 |
| Tabela 3. Características clínica e anatomo patológicas dos pacientes com perda de 9p.....                                     | 32 |
| Tabela 4. Características clínicas e anatomo patológicas dos pacientes que tiveram perda dos cromossomos 3, 7 e 17.....        | 33 |
| Tabela 5. Relação dos pacientes com alterações nos cromossomos 3, 7 e 17 e locus 9p21 .....                                    | 33 |
| Tabela 6. Correlação entre os fatores clássicos de prognóstico do CaP e alterações citogenéticas .....                         | 34 |
| Tabela 7. Correlação entre recidiva bioquímica e perda nos cromossomos 3, 7 e 17 e locus 9p21.....                             | 35 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CaP – Câncer de Prostata
- PSA – Antígeno Específico Prostático
- FISH – Hibridização *in situ* por Fluorescência
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- TMA – Tissue Microarray
- TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TNM – Sistema de estadiamento Tumor, Nódulo e Metástase
- IH – Imunohistoquímica
- CEP 3 – Sonda de Numeração Cromossômica 3 *Spectrum Red* (vermelha)
- CEP 7 – Sonda de Numeração Cromossômica 7 *spectrum Green* (verde)
- CEP 17 - Sonda de Numeração Cromossômica 17 *Spectrum Aqua*(azul)
- LSI – Sonda Indicadora Locus-específica

## SUMÁRIO

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                    | 12 |
| 1.1. Câncer de próstata .....                                                                          | 12 |
| 1.2. Fatores Prognósticos .....                                                                        | 14 |
| 1.3. Alterações citogenéticas nas neoplasias e a hibridação “ <i>in situ</i> ” por fluorescência ..... | 16 |
| 2. OBJETIVOS .....                                                                                     | 19 |
| 2.1. Objetivo Primário .....                                                                           | 19 |
| 2.2. Objetivo Secundário .....                                                                         | 19 |
| 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....                                                                          | 20 |
| 3.1. Pacientes e Amostras .....                                                                        | 20 |
| 3.2. “ <i>Tissue microarray</i> ” (TMA) .....                                                          | 23 |
| 3.2.1. Descrição da seleção dos pacientes para a confecção dos blocos de parafina .....                | 24 |
| 3.3. Hibridação “ <i>in situ</i> ” com Fluorescência (FISH) .....                                      | 25 |
| 3.4. Metodologia da FISH.....                                                                          | 27 |
| 3.4.1. Pré-tratamento.....                                                                             | 28 |
| 3.4.2. Hibridação.....                                                                                 | 28 |
| 3.4.3. Lavagem.....                                                                                    | 29 |
| 3.4.4. Análise dos tecidos.....                                                                        | 29 |
| 3.5. Cálculo Amostral .....                                                                            | 30 |
| 4. RESULTADOS .....                                                                                    | 31 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                                                     | 39 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                                                    | 45 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                      | 46 |
| APÊNDICES .....                                                                                        | 51 |
| ANEXOS .....                                                                                           | 65 |

## INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer de Próstata

O Câncer de Próstata (CaP) é o tumor não cutâneo mais frequente e a segunda causa de óbito por câncer em homens no Brasil (Srougi et al. 2010); estatisticamente encontra-se atrás apenas do câncer de pele não-melanoma (Baroni et al. 2009). No Brasil, o CaP representa um problema de saúde de grande relevância, tendo causado 12.274 óbitos e 60.180 novos casos para 2012 (INCA. 2012). Nos Estados Unidos, foram previstos 241.740 novos casos de CaP em 2012, sendo observado cura clínica em aproximadamente 90% destes homens (Lucas et al. 2012).

Em valores absolutos, é o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente em homens (Paiva et al. 2011). Os casos esperados de CaP representam 15,3% de todos os cânceres em homens. A incidência apresenta variações regionais e raciais, provavelmente, devido a condições genéticas e alimentares distintas entre os grupos, sendo em média seis vezes maior em países desenvolvidos quando comparado aos países em desenvolvimento (Nelson et al. 2002; Paiva et al. 2011).

A idade, o estilo de vida e a hereditariedade são os principais fatores de risco para esta neoplasia. Estudos mostram que a existência do tumor em indivíduos com menos de 40 anos é exceção; ocorrendo aumento de incidência após os 50 anos de idade (Giovannucci et al. 2007). O consumo energético elevado e a maior ingestão de carne vermelha e gordura animal tem sido também relacionado à maior probabilidade de desenvolvimento do CaP (Gomes et al. 2008).

A presença de antecedente familiar é um fator de risco para o CaP; pai ou irmão com tumor aumenta o risco individual em 3 a 10 vezes, quando comparado à população geral (Crawford. 2003). No entanto, apenas cerca de 10-15% dos tumores de próstata diagnosticados são considerados hereditários, os quais se caracterizam por diagnóstico em idade mais precoce, quando comparados aos tumores esporádicos (Roehl et al. 2006).

Com o advento do Antígeno Específico Prostático (PSA) e dos programas de rastreamento para diagnóstico precoce, houve uma mudança no estágio em que estes tumores eram diagnosticados, sendo atualmente mais frequentes os casos de tumor órgão confinado, passíveis de cura com o tratamento cirúrgico ou radioterápico, em contraposição à preponderância, no passado, de tumores localmente avançados (Gomes et al. 2008).

Apesar da evolução dos métodos diagnósticos e, conseqüentemente, do aumento da detecção precoce (Carter et al. 1999), ainda resta para o urologista o desafio da definição exata do comportamento biológico do CaP, que é amplamente variável. O comportamento heterogêneo do CaP é exemplificado pela história natural incerta; enquanto alguns têm evolução indolente (30%) e não necessitam de tratamento, outros apresentam doença agressiva (20%), com progressão independente da forma de tratamento adotado. Esta variabilidade de apresentação do CaP denota a importância da caracterização prognóstica para a tomada de decisões em pacientes portadores deste tumor (Pontes-Junior et al. 2013).

Parâmetros como estágio clínico e patológico, o escore de Gleason e os níveis séricos de PSA são convencionalmente utilizados como marcadores de prognósticos em pacientes com CaP. Porém tais fatores, embora ainda úteis na prática clínica, não são considerados bons preditores de prognóstico por apresentarem desempenho aquém do desejado, especialmente nos tumores de grau intermediário (Leite et al. 2005; Migowski et al. 2010; Nogueira et al. 2009).

A prostatectomia radical e a radioterapia são as opções para o tratamento curativo dos tumores localizados, entretanto até 25% dos pacientes apresentam recidiva bioquímica após o tratamento. A recorrência tumoral pode decorrer de excisão local incompleta, do sub-estágio clínico, do crescimento de micrometástases pré existentes ou mesmo da maior agressividade tumoral (Potters et al. 2004).

É sabido que as chances de cura, um dos principais objetivos da terapêutica, são reduzidas na recidiva do CaP após o tratamento local. Portanto, a identificação de pacientes com pior prognóstico é fundamental para a prática urológica, especialmente para determinar a necessidade de tratamentos adicionais. Postula-se que a identificação prévia dos pacientes

com maior potencial de recorrência possibilitaria a indicação de tratamento adjuvante precoce, com consequente melhora do resultado do tratamento (Nogueira et al. 2009; Potters et al. 2004).

## **1.2. Fatores prognósticos**

Os principais indicadores prognósticos no CaP são o escore de Gleason, os níveis absolutos e a cinética do PSA e o estágio clínico. O PSA é uma protease produzida no ácino prostático cuja função é a liquefação do sêmen, atuando assim no processo de fecundação. Trata-se de um marcador clínico para o tumor de próstata, o qual cursa com níveis elevados de PSA, e estes níveis também se correlacionam com maior estágio tumoral, escore de Gleason e pior prognóstico (Martins et al. 2003; Sun et al. 2001; Graefen et al. 2002).

Maior probabilidade de cura com a prostatectomia radical é observada em pacientes com níveis de PSA abaixo de 10ng/mL, porém, o emprego isolado do PSA pré-operatório para estágio e, consequentemente, para definição da estratégia terapêutica, ainda é controverso, visto não ser um marcador específico do CaP. Outras patologias prostáticas como prostatite e hiperplasia benigna também podem causar elevação do PSA (D'Amico et al, 1998; Pontes-Junior et al. 2013).

O estágio clínico é um dos fatores de prognóstico no CaP, porém a predição pré-operatória do estágio é limitada, pois os exames de imagem como ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética, comumente subestimam a extensão extracapsular do tumor (Moul et al. 2002).

O grau de diferenciação histológica tumoral é estabelecido pela determinação do escore de Gleason que tem habilidade preditiva de agressividade da neoplasia. Resultados de estudo de metanálise mostram que, a cada ano, 13% dos tumores de alto grau desenvolvem metástase óssea após tratamento local, enquanto somente 2% dos de baixo grau o fazem (Stamey, et al. 1999; Pcri. 2001).

O escore de Gleason é dado pela soma dos dois padrões tumorais mais representativos da neoplasia logo o escore de Gleason vai variar de 2 a 10 (Cambruzzi et al. 2010). Sua classificação considera a arquitetura glandular do



tumor e a sua relação com o estroma prostático caracterizando cinco padrões distintos, que variam do bem diferenciado 1 ao indiferenciado 5 (figura 1). Os tumores com escore de Gleason entre 2 e 6 são considerados bem diferenciados e têm comportamento menos agressivo quando comparado aos tumores com escore de 7 a 10 que são considerados menos diferenciados. Entretanto, o uso isolado do escore de Gleason para a tomada de decisão é insuficiente devido à subjetividade da avaliação do Gleason pelo patologista, aos inerentes erros de amostragem da biópsia pré-operatória e ao grande número de tumores de grau intermediário, o que, em conjunto, diminuem o poder preditivo isolado do escore de Gleason (Partin et al. 2001).

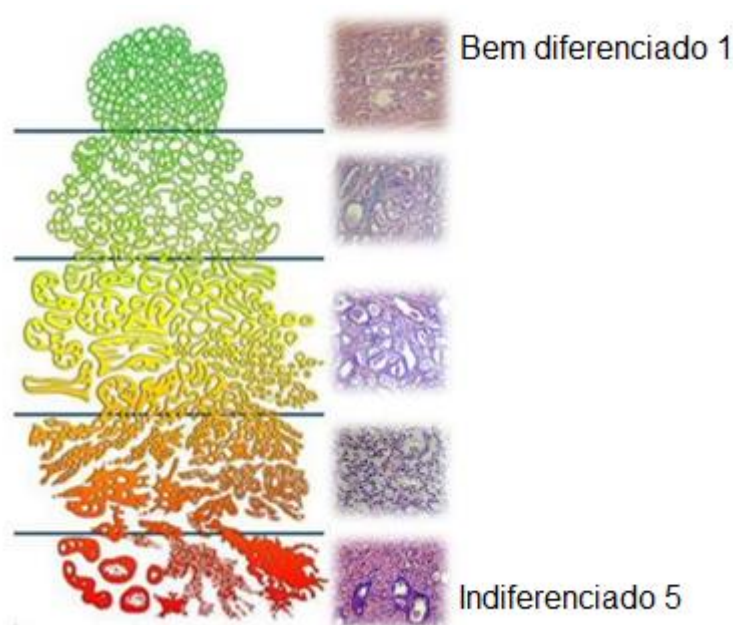


Figura 1. Representação gráfica da graduação histológica de Gleason (Imagem cedida por Leite KRM).

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

Ainda assim, a incidência clínica dos tumores localiza-se na zona intermediária, com 15% (Gleason entre 6 e 7 e PSA menor que 20) de história natural imprevisível, onde a definição prognóstica é limitada mesmo com o uso de tabelas e nomogramas. Uma vez que a incidência histológica é 30% e a chance de mortalidade por CaP é de apenas 5%. Denotando a heterogenicidade da doença.

Pelas deficiências expostas, torna-se claro a necessidade de identificação de características morfológicas ou biológicas que identifiquem o potencial de progressão do CaP e que possibilitem a seleção individualizada do tratamento. A pesquisa continua no sentido de estabelecer novos fatores prognósticos, e o enfoque principal tem sido dado ao estudo dos marcadores moleculares. (Stephenson et al. 2006).

O câncer é uma doença caracterizada por alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem e acumulam-se durante a progressão da neoplasia. Estas alterações resultam em ativação de oncogenes, inativação de genes supressores e influenciam a transcrição de genes envolvidos em passos chave do ciclo celular (Antoinette et al. 2010).

O processo de oncogênese, portanto, é o resultado da herança de genes de susceptibilidade somado à aquisição de alterações somáticas e, tais alterações, podem ser potencialmente empregadas como marcadores de diagnóstico, prognóstico e desenvolvimento de alvos terapêuticos (Scheble et al. 2010).

### **1.3. Alterações citogenéticas nas neoplasias e a hibridação “*in situ*” por fluorescência**

O melhor conhecimento da citogenética tem contribuído amplamente para a identificação e caracterização de alterações genéticas específicas que são frequentemente encontrados nas neoplasias. Tais alterações incluem deleções, duplicações, inversões, translocações ou amplificações, que são comumente observadas na carcinogênese (Stefan et al. 1994). Estas deleções podem resultar na perda da função de um conjunto de genes ou de um gene isoladamente, principalmente dos genes supressores de tumor, cuja perda

constitui evento fundamental na gênese e evolução do câncer (Araujo et al. 2005).

Os métodos de avaliação mais comumente empregados na literatura para análise das alterações citogenéticas em tumores são: a técnica de FISH (Hibridização *in situ* por Fluorescência) e o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

A técnica de FISH vem sendo empregada devido a sua especificidade em detectar tanto grandes alterações cromossômicas, como aneuploidia, como perdas específicas de determinado gene ou locus gênico (Guerra et al. 2004). Um exemplo da utilização da técnica de FISH na prática clínica é o Kit UroVysion® que está indicado no seguimento do câncer de bexiga, onde a análise das alterações numéricas é realizada com emprego de sondas específicas do Kit em amostras de urina (Meloni et al. 1993).

O UroVysion® é o nome comercial do kit para a realização da técnica do FISH para detectar a presença de aneuploidia dos cromossomos 3, 7, 17 e a perda do locus 9p21 em células da bexiga, sendo um exemplo atual do potencial da pesquisa translacional na oncologia. O exame já foi liberado pela “*Food and Drug Administration – FDA*” e de acordo com o consenso da Associação Européia de Urologia, o exame está indicado no diagnóstico e no acompanhamento pós-operatório de pacientes com câncer urotelial de bexiga (Babjuk et al. 2009).

Estudos mostraram que a deleção do cromossomo 9p21, que contém o gene supressor de tumor o P16, foi também frequentemente observada no CaP, sendo postulado que talvez esse locus perdido abrigue genes supressores eventualmente relacionados à carcinogênese da próstata (Paiva, 2008).

Embora existam relatos sobre alterações citogenéticas no CaP, os dados da literatura são muito escassos, as informações provêm de estudos com baixa casuística, e a técnica empregada na maioria destes estudos foi exclusivamente o PCR. Não existe, até o momento, estudo que tenha demonstrado, através da técnica de FISH em produto emblocado em parafina pela técnica de “*Tissue Microarray*” (TMA), a correlação entre alterações citogenéticas e o prognóstico do CaP localizado tratado com cirurgia com intuito curativo. Portanto, persiste a dúvida sobre a frequência das alterações

citogenéticas nos cromossomos 3, 7, 17 e 9p21 detectadas pela técnica de FISH no CaP, bem como a correlação destas alterações com o prognóstico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Primário**

Identificar as alterações citogenéticas, através da técnica de FISH, nos cromossomos 3, 7, 17 e locus 9p21 no Câncer de Próstata localizado.

### **2.2. Objetivo Secundário**

Correlacionar às alterações citogenéticas encontradas com a recidiva bioquímica após tratamento cirúrgico e com os fatores prognósticos clássicos do adenocarcinoma de próstata.

### 3. CASUÍSTICAS E MÉTODOS

#### 3.1. Pacientes e amostras

Após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa, (número do parecer 206.920) (Anexo 1) avaliamos retrospectivamente os prontuários de 954 pacientes com CaP localizado tratados com prostatectomia radical com intenção curativa entre janeiro de 1994 e abril de 2000; os quais após a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2) concordaram em participar do estudo. As prostatectomias radicais com intenção curativa foram realizadas em instituição hospitalar terciária privada por um único cirurgião referenciado na área da Uro-oncologia. Os critérios de inclusão foram: I - seguimento pós operatório de pelo menos 10 anos nos casos que não apresentaram recorrência bioquímica; II - disponibilidade e adequação dos blocos de parafina; III - assinatura do TCLE.

Depois de respeitados os critérios de inclusão, selecionamos 112 casos que formaram a casuística de nosso estudo. Houve perda de seguimento de 1 paciente, portanto, para análise do objetivo secundário, a casuística final consistiu de 51 casos com recorrência do tumor após a cirurgia e 60 controles sem recidiva da neoplasia após seguimento médio de 123 meses. A recorrência tumoral foi definida pela presença de nível sérico de PSA acima de 0,2 ng/mL no seguimento. O estadiamento empregado foi o sistema tumor-linfonodo-metástase de acordo com a Classificação de Tumores Malignos (TNM) (Sobin et al. 2009).

Os pacientes e controles foram pareados de acordo com os critérios de estratificação de risco D'Amico (D'Amico et al. 1998), a qual divide os pacientes em grupos de risco de recidiva alto, intermediário e baixo, através da avaliação conjunta do escore de Gleason, PSA e estágio clínico. O grupo de baixo risco compreende aqueles pacientes com PSA < 10ng/ml, escore de Gleason < 7 e estágio clínico até T2a; o grupo intermediário engloba os pacientes com PSA entre 10 e 20ng/ml, escore de Gleason 7 e estágio clínico T2b enquanto o grupo de alto risco é representado pelos pacientes que apresentam níveis séricos de PSA > 20ng/ml ou escore de Gleason > 7 ou ainda estágio clínico >

T2b. Conforme podemos observar na Tabela 1 que exemplifica como é realizado os critérios para de estratificação de risco de D'Amico.

|   |                        |
|---|------------------------|
| ▶ | BAIXO RISCO:           |
|   | • PSA<10               |
|   | • Estadiamento até T2a |
|   | • Gleason <7           |
| ▶ | RISCO INTERMEDIARIO:   |
|   | • PSA: 10-20           |
|   | • Estadiamento até T2b |
|   | • Gleason 7            |
| ▶ | ALTO RISCO:            |
|   | • PSA superior a 20    |
|   | • Estadiamento ≥ T2c   |
|   | • Gleason > 7          |

Tabela 1. Exemplificação dos critérios para estratificação de risco de D'Amico

As amostras foram classificadas de acordo com o grau histológico de Gleason, estadiamento patológico e níveis séricos de PSA pré-operatórios. A análise das alterações citogenéticas foram realizadas pela técnica de FISH em material de biópsia emblocado em parafina pelo método de “*Tissue Microarray*” (TMA) contendo duas amostras de cada paciente.

Podemos observar o organograma da evolução da pesquisa quanto ao levantamento dos pacientes (Figura 2).

Os pacientes foram tratados e são acompanhados pelo Serviço de Urologia do mesmo cirurgião que realizou o procedimento cirúrgico. As amostras de tumores foram obtidas do banco de tumores do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular desta mesma Instituição, a qual detém a guarda do material biológico.

Afim de elucidar o andamento da pesquisa a figura 2 mostra o organograma desde a seleção dos pacientes ao término da pesquisa.

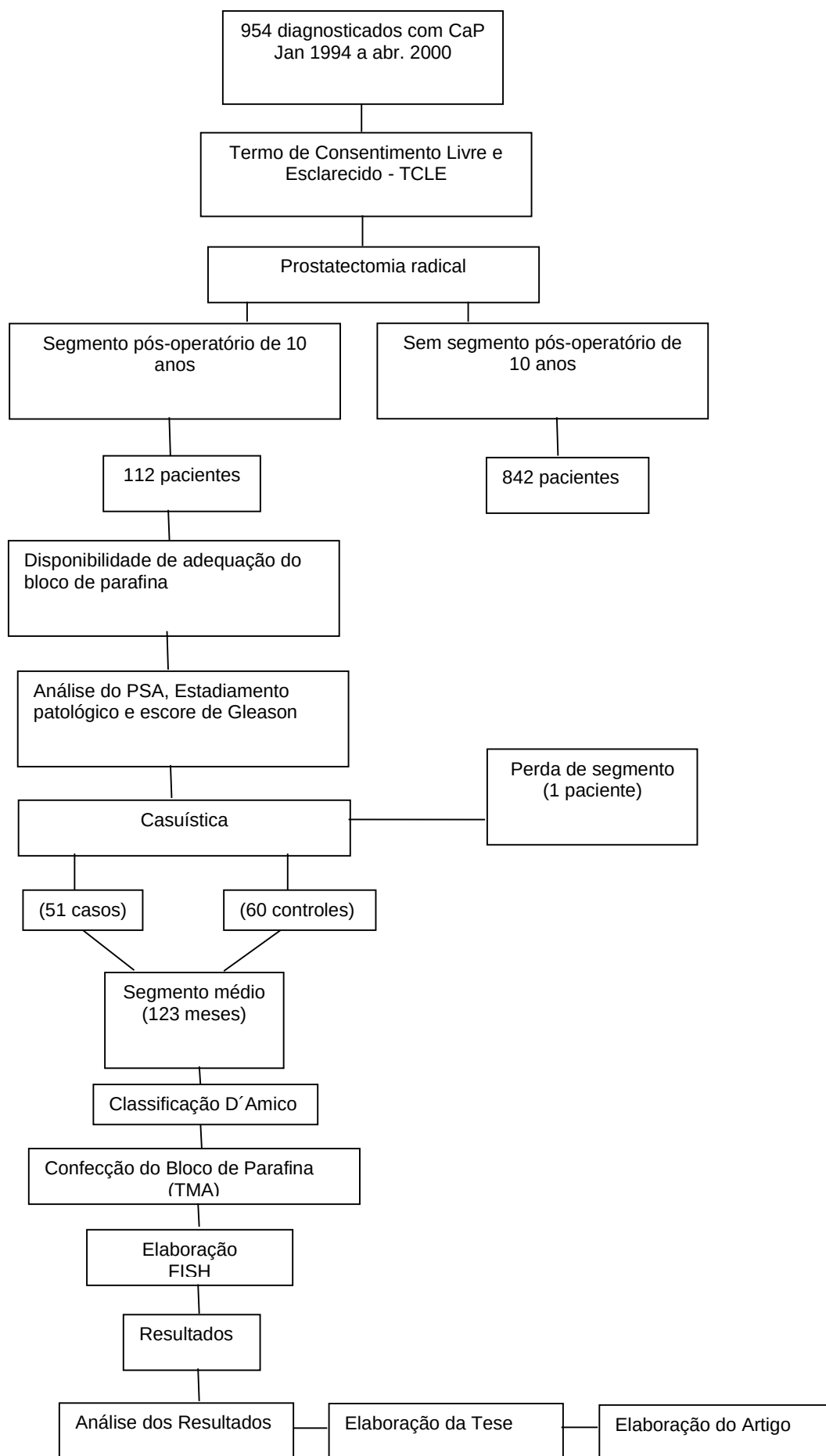


Figura 2. Organograma da seleção dos pacientes e elaboração da pesquisa



### 3.2. “Tissue Microarray” (TMA)

A análise das alterações citogenéticas dos cromossomos 3, 7 e 17 e locus 9p21 foi realizada através da técnica de FISH utilizando a Hibridação “*in situ*” por fluorescência na lâmina contendo o TMA (Figura 3). O TMA é uma coleção organizada de amostras teciduais dispostas sob a forma de uma matriz, onde cada amostra é suficientemente grande para ser representativa, e convenientemente pequena para permitir o uso não predatório do bloco doador, permitindo utilização racional dos reagentes a serem aplicados na amostra em condições experimentais homogêneas.

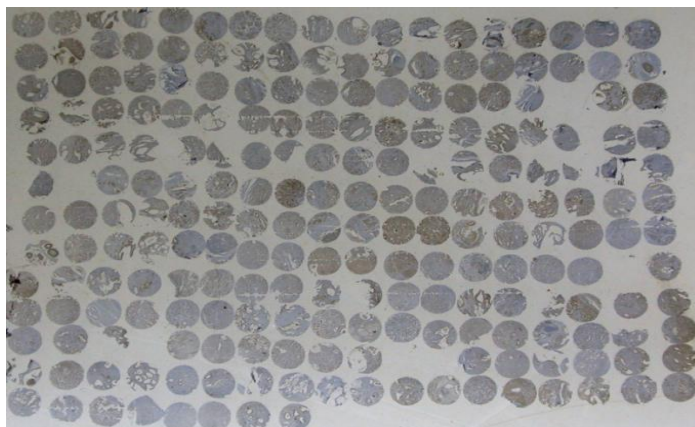


Figura 3. Lâmina de TMA contendo 112 casos de CaP (Imagem do arquivo pessoal).

A principal vantagem do TMA reside na análise simultânea de vários cortes histológicos arranjados em apenas uma lâmina. Na figura 4, mostramos um bloco de TMA, onde cada cilindro amostral é alocado numa posição do bloco de parafina definida em sistema cartesiano de coordenadas, e o conjunto das amostras constitui o que se denomina de TMA.

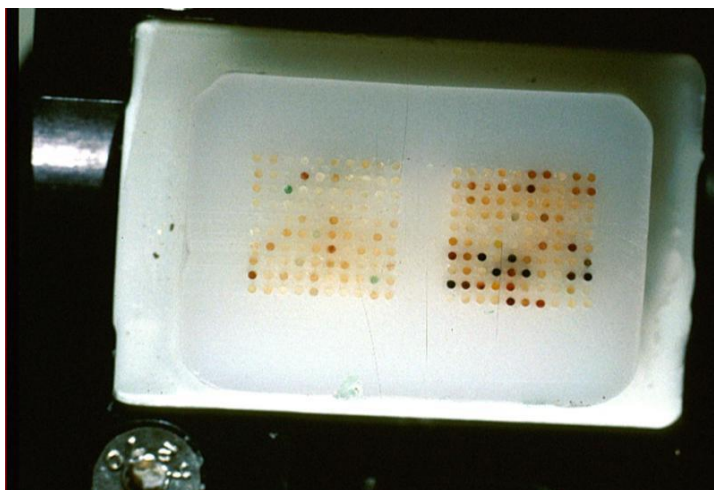


Figura 4. Bloco receptor do TMA com os cilindros com as amostras do tecido a ser estudado (Imagem cedida por Leite KRM).

### 3.2.1. Descrição da seleção dos pacientes para a confecção dos blocos de parafina

Em nosso estudo, selecionamos as lâminas e os blocos de parafina contendo o tumor primário de 112 pacientes, considerando-se as áreas que melhor representavam a totalidade do tumor. Retiramos dois fragmentos de 1mm de diâmetro por caso, e para isto duas áreas representativas de cada tumor foram selecionadas e os blocos doadores marcados com tinta permanente, e estas áreas foram inclusas no TMA. A realização da técnica de FISH para análise citogenética dos 112 casos foi, portanto, feita na lâmina contendo duas amostras para cada paciente operado.

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 da neoplasia (Hoos et al. 2001). Optamos por duas amostras por paciente, pois é comprovado que a análise de duas amostras em TMA é comparável ao observado na secção tecidual em 95% das vezes (Camp et al. 2000). Em nosso estudo, as lâminas e os blocos de parafina respectivos contendo o tumor primário de cada um dos 111 pacientes foram selecionados, considerando-se as áreas que melhor representavam a totalidade do tumor.

### 3.3. Hibridação “*in situ*” com Fluorescência (FISH)

A técnica de Hibridação *in situ* com Fluorescência (FISH) permite a visualização de determinada sequência específica de ácido nucleico de um cromossomo previamente definido. Especificamente a técnica de FISH implica no emparelhamento de bases específicas de duas sequências de ácido nucleico complementares, sendo empregada na detecção de alterações e sequências específicas na cadeia do ácido desoxirribonucleico (DNA) de peças biológicas; permitindo uma análise rápida de desequilíbrios cromossômicos (Stefan et al. 1994, Guerra et al. 2004, Bhargava et al. 2005).

Em outras palavras trata-se de uma técnica que utiliza sonda de DNA marcadas com fluorescência para detectar anomalias cromossômicas, como aneuploidia, microdeleções e rearranjos cromossômicos complexos, sendo estes dois últimos de resolução da citogenética clássica. Detecta sequencias específicas de ácidos nucleicos pela formação de um duplex de um fragmento de ácido nucleico de fita simples modificado (sonda) e sua sequência complementar (sequência alvo) na amostra fixada (Naoum, 2001).

A técnica FISH é utilizada para a localização de um segmento específico do DNA em determinado cromossomo, através do uso de uma sonda de oligonucleotídeos específicos marcada com um corante fluorescente (Figura 5). A sonda é adicionada à preparação citológica do DNA previamente desnaturado para permitir a hibridação complementar entre os ácidos nucleicos do DNA cromossômico com a sonda específica marcada com o fluoróforo. A hibridação libera o fluoróforo da sonda, sendo possível a visualização de coloração específica com o auxílio do microscópio de fluorescência.

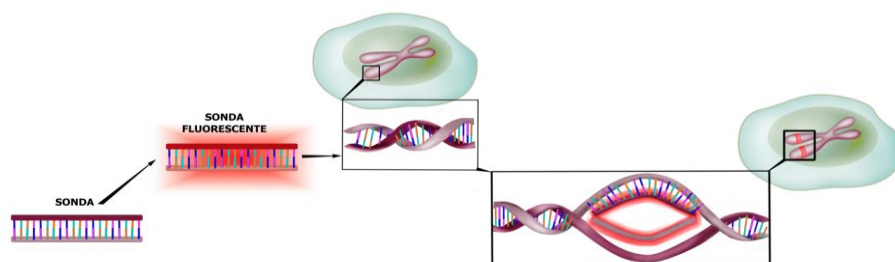


Figura 5. Demonstração da técnica de Hibridação *in situ* (cedido por Leite KRM).

As células somáticas normais apresentam duas cópias de cada cromossomo, isto é denominado dissomia, enquanto a presença de alterações caracterizadas por ganhos de uma ou duas cópias resultarão em trissomia e tetrassomia respectivamente caracterizando a aneuploidia, uma vez que qualquer alteração numérica dos cromossomos para mais ou para menos é chamada de aneuploidia. Na figura 6, vemos um exemplo de um teste de FISH com as quatro sondas mostrando dissomia (A) e um exemplo de célula contendo polissomia (B). Em algumas ocasiões o achado de cópia adicional em poucas células pode não representar alteração, visto que na fase S ou G2 do ciclo celular algumas células normais podem apresentar uma cópia a mais. Porém, é importante ressaltar que a abundância de células trissômicas é via de regra indicativa de aberração cromossômica e este achado é frequentemente encontrado em diversas neoplasias (Halling et al. 2008).

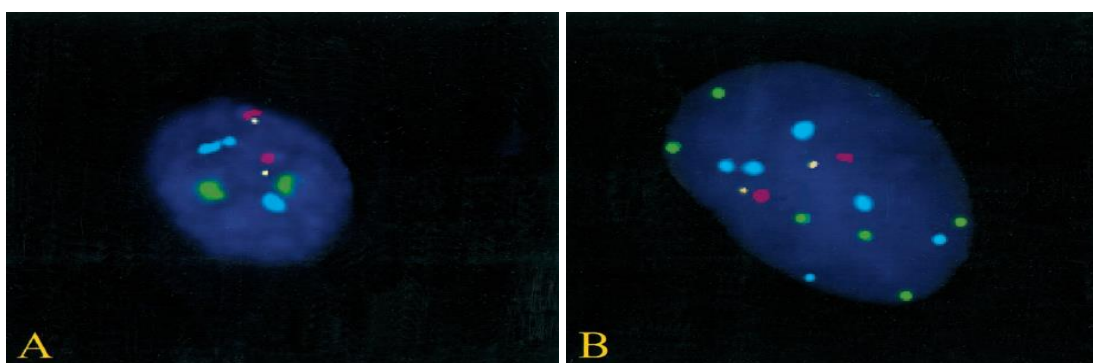


Figura 6. FISH normal e anormal utilizando o Kit Urovysion: CEP7 (verde), 3 (vermelho), 17 (azul), LSI 9p21 (amarelo). A-normal; B-FISH célula polissômica. (Cedido por Leite KRM).

Empregamos para o nosso estudo o Kit UroVysion®, da fabricante Abbott Laboratories - Abbott Park, Illinois, USA, que contém 3 sondas centroméricas e uma locus específica.

A sonda de numeração cromossômica (CEP), do inglês “*Chromosome Enumeration Probe*” que hibridiza-se com a região pericentrométrica e permite a identificação de anormalidade numérica do cromossomo. Neste kit temos a sonda 3 “*SpectrumRed*” (CEP 3) que marca o cromossomo 3 com a coloração vermelha; a sonda 7 “*SpectrumGreen*” (CEP 7) que marca o cromossomo 7 com a coloração verde e a sonda 17 “*SpectrumAqua*” (CEP 17) que marca o

cromossomo 17 com a coloração azul. Com o emprego destas sondas podemos detectar alterações numéricas como monossomia, trissomia ou polissomia.

A sonda indicadora locus-específico (LSI), do inglês “*Locus Specific Identifier*” é útil na identificação de deleção ou presença de um gene específico, também através do sinal fluorescente à microscopia, e pode ser desenhada para hibridizar vários genes de interesse, como por exemplo HER2, p53, p16 ou outros genes. Em nosso estudo empregamos a sonda LSI 9p21 “*Spectrum Gold*” que marca especificamente o locus 9p21.

A ausência de coloração específica indica a deleção do respectivo gene. A presença de nenhum ou de apenas um sinal fluorescente indica a deleção homozigota ou hemizigótica do gene de interesse, respectivamente (Figura 7).

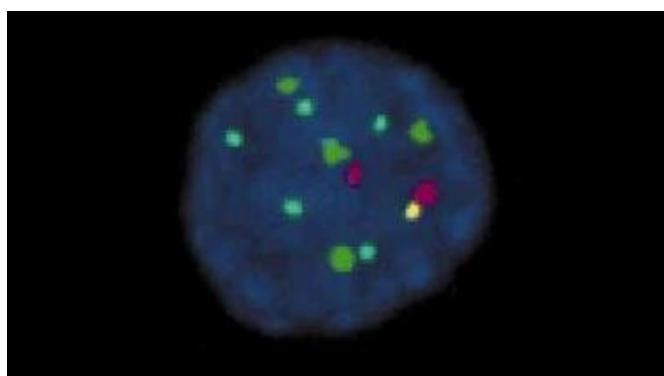


Figura 7. Célula anormal hemizigótica hibridizada com o kit Urovysion: sonda amarela representa a LSI 9p21. (Cedido por Leite KRM).

### 3.4. Metodologia da FISH

As alterações citogenéticas numéricas dos cromossomo 3, 7, 17 e da região 9p21 foram estudadas pela metodologia da FISH nas lâminas de TMA construídas a partir de tecido prostático conservado em bloco parafinado do banco de tumores do laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês (Anexo 3).

Para a realização da FISH, utilizamos cortes de 6 $\mu$ M do TMA montados em lâmina sinalizada. Para a realização da técnica de FISH em tecido parafinado montado em lâmina é necessário a deparafinização, desidratação e pré-tratamento do material.

Para desparafinização, a lâmina com o corte foi colocado em estufa à 65°C por 16 horas aproximadamente, foi incubada em uma bateria de xilol 3 vezes por 20 minutos cada e deixada posteriormente para secar. Em seguida o material foi desidratado em álcool absoluto 2 vezes por 5 minutos e mantida neste álcool até a realização da FISH.

#### **3.4.1. Pré-tratamento**

A lâmina foi retirada do álcool absoluto e transferida para uma bateria de etanol 70%, 85% e 100% por 2 minutos em cada um e deixada secar a temperatura ambiente. A a lâmina foi incubada em 2XSSC à 75°C por 15 minutos e em seguida foi transferida para uma solução de 2XSSC com proteinase K (Ambion – Invitrogen 0,25mg/ml) por 15 minutos a 45°C. Após esse período a lâmina foi transferida para um coplin com solução de 2XSSC por 5 minutos a temperatura ambiente. O material foi então novamente desidratado na bateria de etanol 70%, 85% e 100% por 2 minutos cada e seca a temperatura ambiente.

#### **3.4.2 Hibridação**

Uma vez seco, foi aplicado sobre o material 8  $\mu$ l da sonda(Urovysion – Abbott Molecular), foi colocado uma lamínula que foi selada com cola de borracha (rubber cement). A lamina foi então colocada na placa aquecedora a 80°C por 10 minutos e transferida em seguida para a estufa a 37°C em câmara úmida e escura em por 16 horas aproximadamente.

### **3.4.3 - Lavagem**

A lâmina foi retirada da estufa, a lamínula foi removida com cuidado e transferida para uma solução de ureia 1,5 M em 0,1x SSC (pH 7,0-7,5) a 45° C por 30 minutos. Em seguida foi transferida para um coplin com 2XSSC a temperatura ambiente por 2 minutos, novamente desidratadas em uma bateria de etanol 70%, 85% e 100% e seca ao ar protegida da luz. Foi aplicado 20 U $\mu$ l de DAPI (Abbott Molecular) (0,125ng/ml) sobre o material para realizar a coloração fluorescente e colocado uma lamínula. Após esse procedimento a lâmina ficou armazenada em uma caixa ao abrigo da luz na geladeira. Para analisar os resultados e visualizar os espectros de cores das respectivas sondas utilizamos a microscopia de fluorescência (Microscópio Trinocular da Marca Nikon, modelo E600, com resolução de 1000 vezes, sendo 10 vezes com lente ocular de 10 vezes e lente objetiva planacromáticas de 40 e 100 vezes com imersão à óleo. Desta forma, tornou-se possível analisar a existência de ganho ou perda de um cromossomo ou gene específico.

### **3.4.4. Análise dos tecidos**

Para análise dos tecidos foram selecionados 50 núcleos para cada caso. Referindo-se ao locus 9p21, o caso foi considerado positivo, presença da respectiva deleção, quando 7 ou mais células, das 50 avaliadas (14%), mostraram um ou zero sinal da sonda. Para os cromossomos 3, 7 e 17 a análise de aneuploidia foi feito de acordo com a observação de coloração evidenciando ausência ou presença de cópias extras dos cromossomos.

### **3.5. Cálculo amostral**

A definição do tamanho da amostra deste estudo caso-controle foi baseada no estudo de Strohmeyer et al. (2004), que correlacionou alterações citogenéticas com o prognóstico do CaP. Tomamos como base para o cálculo da amostra as porcentagens de pacientes com e sem progressão do câncer. Adotamos um nível de significância de 5% (erro tipo I) e poder de 95%, e obtivemos tamanho de amostra total de 70 pacientes, ou seja, 35 pacientes por grupo. Após considerarmos possíveis perdas, decidimos aumentar a amostra em 10%; assim o tamanho mínimo da amostra ficou em 84 pacientes no total. Diante do levantamento dos 954 pacientes, decidimos realizar a pesquisa com um amostral de 112 pacientes a fim de superar os índices de possíveis perdas.



## 4. RESULTADOS

A amostra consistiu de 112 pacientes com CaP localizado tratados com prostatectomia radical. A idade média foi de 63,62 anos (+/- 7,36) tendo a idade variado de 45 a 79 anos. A média do PSA foi 10,82ng/ml (+/- 7,773).

Em relação aos grupos de risco, 16 pacientes (14%) eram risco baixo, 39 pacientes (35%) risco intermediário e 56 pacientes (51%) classificados como risco alto. A maioria dos pacientes foram classificados entre intermediário e alto. Um paciente não apresentava seguimento adequado e foi excluído da correlação entre prognóstico e presença de alterações citogenéticas.

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos através de análise de prontuários dos 111 pacientes e estão representados na Tabela 1. Observa-se que os grupos são similares em termos de estratificação do risco ( $p=0.266$ ), confirmando a homogeneidade do nosso estudo caso-controle.

Tabela 2. Dados clínicos e demográficos do estudo caso controle de acordo com a recorrência ou não do tumor após a cirurgia

|                           | <b>Recorrência</b><br>(n= 51) | <b>Sem recorrência</b><br>(n=60) | <b>Valor p</b> |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------|
| <b>Idade (anos)</b>       |                               |                                  | 0.687 *        |
| Mediana (Q1 - Q3)         | 65 (60 - 68)                  | 65 (60 - 69)                     |                |
| Mínimo - Máximo           | 45 - 74                       | 41 - 79                          |                |
| <b>PSA pré (ng/ml)</b>    |                               |                                  | 0.004**        |
| Mediana (Q1 - Q3)         | 9.3 (7.6 - 14.2)              | 7.6 (4.9 - 10.1)                 |                |
| Mínimo - Máximo           | 4.2 - 45.0                    | 1.2 - 38.0                       |                |
| <b>Estadio Patológico</b> |                               |                                  | 0.521***       |
| T2                        | 41 (80.4%)                    | 51 (85.0%)                       |                |
| T3                        | 10 (19.6%)                    | 9 (15.0%)                        |                |
| <b>Gleason</b>            |                               |                                  | 0.061 ***      |
| ≤ 6                       | 9 (17.6%)                     | 20 (33.3%)                       |                |
| ≥ 7                       | 42 (82.4%)                    | 40 (66.7%)                       |                |
| <b>Risco</b>              |                               |                                  | 0.266***       |
| Baixo                     | 6 ( 11.8%)                    | 10 (16.7%)                       |                |
| Intermediário             | 15 (29.4%)                    | 24 (40.0%)                       |                |
| Alto                      | 30 (58.8%)                    | 26 (43.3%)                       |                |

\* Teste Mann-Whitney; \*\* Teste Exato de Fisher; \*\*\* teste Qui-quadrado

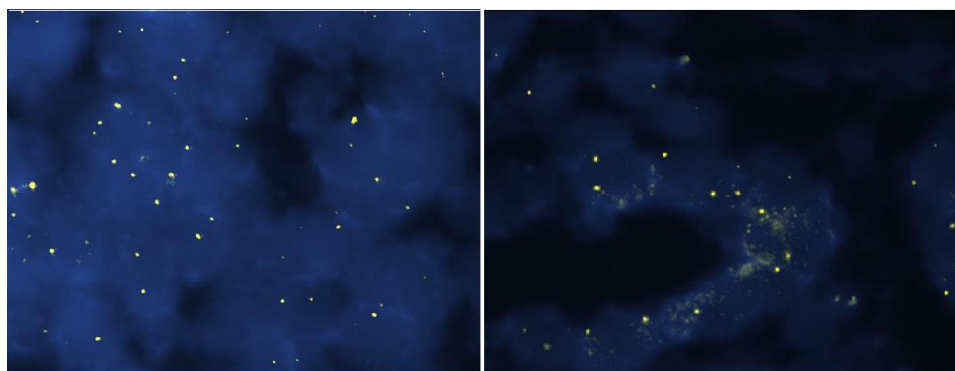


Figura 8. FISH com o emprego da sonda LSI para identificação do locus 9p21

Tabela 3. Características clínicas e anátomo patológicas dos casos com perda de 9p.

| Pacientes | Classif. de   |         | PSA  | Gleason | Recidiva | Tempo para Recidiva |
|-----------|---------------|---------|------|---------|----------|---------------------|
|           | Risco         | Estadio |      |         |          |                     |
| 2         | Baixo         | T2A     | 6,7  | 6       | Não      |                     |
| 43        | Intermediário | T2B     | 14,2 | 6       | Sim      | 9 anos e 6 meses    |
| 53        | Intermediário | T2A     | 8,6  | 7       | Sim      | 5 meses             |
| 77        | Alto          | T2B     | 9,2  | 8       | Sim      | 9 anos e 11 meses   |
| 108       | Alto          | T3A     | 9,3  | 7       | Sim      | 3 anos e 11 meses   |
| 110       | Alto          | T2C     | 18,3 | 8       | Sim      | 1 ano e 7 meses     |

Quanto aos resultados obtidos com as sonda 3 e 7, encontramos perda da amostra respectivamente em 25 e 29 casos. Dos 87 pacientes avaliados com a sonda CEP 3 encontramos perda do cromossomo em 2 pacientes (2,3%), enquanto que dos 83 pacientes avaliados com a CEP 7 apenas 1 paciente (1,2%) apresentou ausência de sinal.

Para a sonda 17 encontramos perda da amostra em 56 casos (50%). Dos 56 avaliados, encontramos perda do cromossomo em apenas 1 paciente (1,8%). Na figura 9, mostramos a imagem do FISH com o emprego das quatro sondas em conjunto. A tabela 4, contem as características dos pacientes que apresentaram alterações com as sondas CEP 3, 7 e 17. Na tabela 5 elencamos os casos com alterações em mais de uma das sondas avaliadas.

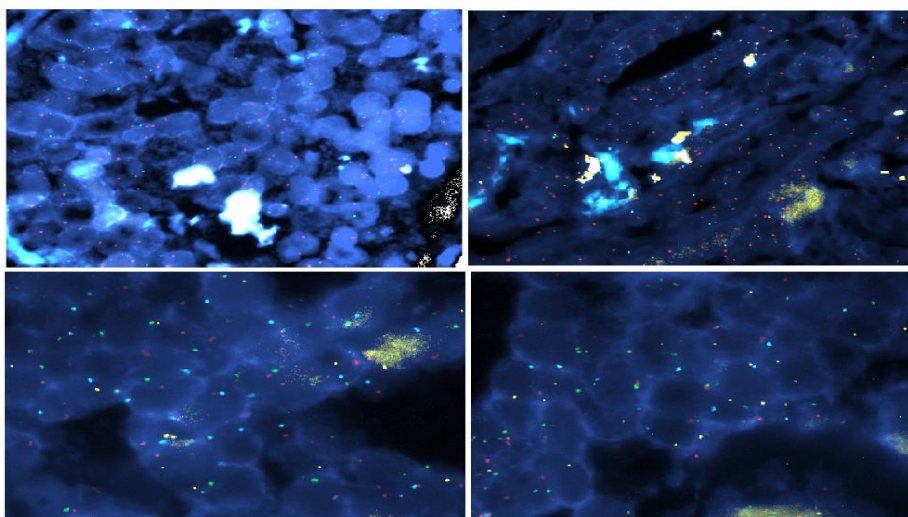


Figura 9. FISH com o uso das sondas para os cromossomos 3, 7, 9p e 17.

**Tabela 4. Características clínicas e anátomo patológicas dos pacientes que tiveram perda dos cromossomos 3, 7 e 17.**

|               | Paciente | Risco         | Estadio | PSA | Gleason | Recidiva | Tempo de recidiva |
|---------------|----------|---------------|---------|-----|---------|----------|-------------------|
| <b>CEP3</b>   | 45       | Intermediário | T2B     | 7.8 | 6       | 1        | 86 meses          |
|               | 70       | Alto          | T2B     | 6.2 | 9       | 0        | 0                 |
| <b>CEP7</b>   | 45       | Intermediário | T2B     | 7.8 | 6       | 1        | 86 meses          |
| <b>CEP 17</b> | 70       | Alto          | T2B     | 6.2 | 9       | 0        | 0                 |

**Tabela 5. Relação dos pacientes com alterações nos cromossomos 3, 7 e 17 e locus 9p21**

| Paciente | Locus 9p21 | Cromossomo 3 | Cromossomo 7 | Cromossomo 17 |
|----------|------------|--------------|--------------|---------------|
| 2        | +          | -            | -            | -             |
| 43       | +          | *            | *            | -             |
| 45       | -          | +            | +            | -             |
| 53       | +          | -            | -            | -             |
| 70       | *          | +            | -            | +             |
| 77       | +          | -            | -            | *             |
| 108      | +          | -            | -            | *             |
| 110      | +          | -            | -            | *             |

(+)ganho ou perda cromossômica; (-) ausência de alterações; (\*) não avaliados.

Correlacionamos os fatores clássicos de prognóstico no CaP com a presença de perdas dos cromossomos 3, 7 e 17 ou locus 9p21. Avaliamos a associação de cada perda isoladamente com cada fator de prognóstico e posteriormente qualquer perda (Tabela 6). Não observamos significância nas correlações entre as alterações citogenéticas com os fatores clássicos de prognóstico escore de Gleason, PSA, estágio patológico ou grupo de risco.

Tabela 6. Correlação entre os fatores clássicos de prognóstico do CaP e alterações citogenéticas

|                                  | <i>Locus 9p21</i><br><i>normal perda</i> |            | <i>Crom. 3</i><br><i>normal perda</i> |             | <i>Crom. 7</i><br><i>normal perda</i> |             | <i>Crom. 17</i><br><i>normal perda</i> |             | <i>Qualquer</i><br><i>normal perda</i> |             |
|----------------------------------|------------------------------------------|------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|----------------------------------------|-------------|----------------------------------------|-------------|
| <b>PSA<sub>pre</sub> (ng/mL)</b> |                                          |            |                                       |             |                                       |             |                                        |             |                                        |             |
| Mediana                          | 10,9                                     | 11,1       | 9,9                                   | 7,0         | 9,6                                   | 7,8         | 10,2                                   | 6,2         | 11,0                                   | 10,0        |
| Pvalue                           | 0,987                                    |            | 0,506                                 |             | 0,763                                 |             | 0,567                                  |             | 0,739                                  |             |
| <b>pT</b>                        |                                          |            |                                       |             |                                       |             |                                        |             |                                        |             |
| T2                               | 76<br>(86%)                              | 5<br>(83%) | 70<br>(82%)                           | 2<br>(100%) | 67<br>(82%)                           | 1<br>(100%) | 47<br>(85%)                            | 1<br>(100%) | 82<br>(82%)                            | 7<br>(87%)  |
| T3                               | 12<br>(14%)                              | 1<br>(17%) | 15<br>(18%)                           | 0<br>(0%)   | 15<br>(18%)                           | 0<br>(%0)   | 8<br>(15%)                             | 0<br>(0%)   | 18<br>(18%)                            | 1<br>(13%)  |
| p-value                          | 0,835                                    |            | 0,683                                 |             | 0,819                                 |             | 0,857                                  |             | 0,694                                  |             |
| <b>Gleason</b>                   |                                          |            |                                       |             |                                       |             |                                        |             |                                        |             |
| ≤6                               | 22<br>(92%)                              | 2<br>(8%)  | 22<br>(96%)                           | 1<br>(4%)   | 21<br>(96%)                           | 1<br>(4%)   | 18<br>(100%)                           | 0<br>(0%)   | 25<br>(89%)                            | 3<br>(11%)  |
| ≥7                               | 66<br>(94%)                              | 4<br>(6%)  | 63<br>(98%)                           | 1<br>(2%)   | 61<br>(100%)                          | 0<br>(0%)   | 37<br>(97%)                            | 1<br>(3)    | 75<br>(94%)                            | 5<br>(6%)   |
| p-value                          | 0,651                                    |            | 0,461                                 |             | 0,265                                 |             | 0,679                                  |             | 0,438                                  |             |
| <b>Risco</b>                     |                                          |            |                                       |             |                                       |             |                                        |             |                                        |             |
| Baixo                            | 13<br>(15%)                              | 1<br>(17%) | 14<br>(16%)                           | 0<br>(0%)   | 14<br>(17%)                           | 0<br>(0%)   | 12<br>(22%)                            | 0<br>(0%)   | 1<br>(12%)                             | 15<br>(15%) |
| Intermediário                    | 33<br>(37%)                              | 2<br>(33%) | 28<br>(33%)                           | 1<br>(50%)  | 28<br>(34%)                           | 1<br>(100%) | 19<br>(34%)                            | 0<br>(0)    | 3<br>(37)                              | 34<br>(34%) |
| Alto                             | 42<br>(48%)                              | 3<br>(50%) | 43<br>(51%)                           | 1<br>(50%)  | 40<br>(49%)                           | 0<br>(0%)   | 24<br>(44%)                            | 1<br>(100%) | 4<br>(50)                              | 51<br>(51%) |
| p-value                          | 0,977                                    |            | 0,779                                 |             | 0,390                                 |             | 0,532                                  |             | 0,971                                  |             |

Quando correlacionamos a recidiva bioquímica com a presença de perdas dos cromossomos 3, 7 e 17 ou do locus 9p21, observamos significância marginal da correlação entre perda de 9p21 com maior chance de recidiva do

tumor (tabela 7). Não observamos correlação entre as perdas dos cromossomos 3,7 e 17 com o prognóstico.

Tabela 7. Correlação entre recidiva bioquímica e perda nos cromossomos 3, 7 e 17 e locus 9p21.

|                              | <b>Recidiva</b> | <b>Sem recidiva</b> | <b>p-value</b> |
|------------------------------|-----------------|---------------------|----------------|
| <b>Locus 9p21<br/>(n=94)</b> |                 |                     | 0.084**        |
| Normal                       | 40 (46%)        | 48(54%)             |                |
| Perda                        | 5 (83%)         | 1(17%)              |                |
| <b>Crom 3<br/>(n=87)</b>     |                 |                     | 0.723**        |
| Normal                       | 40 (47%)        | 45(53%)             |                |
| Perda                        | 1 (50%)         | 1(50%)              |                |
| <b>Crom 7<br/>(n=83)</b>     |                 |                     | 0.470**        |
| Normal                       | 38 (46%)        | 44 (54%)            |                |
| Perda                        | 1 (100%)        | 0 (0%)              |                |
| <b>Crom 17<br/>(n=56)</b>    |                 |                     | 0.554**        |
| Normal                       | 25 (45%)        | 30 (55%)            |                |
| Perda                        | 0 (0%)          | 1(100%)             |                |
| <b>Qualquer<br/>(n=108)</b>  |                 |                     | 0.085**        |
| Normal                       | 43 (43%)        | 57 (57%)            |                |
| Perda                        | 6 (75%)         | 2 (25%)             |                |

Teste Exato de Fisher;

Construímos curvas de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a ocorrência de alterações citogenéticas, sendo observado correlação estatisticamente significativa apenas para a perda do 9p21. (figura 10), estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevida livre de recidiva bioquímica significativamente menor quando comparado aos indivíduos sem esta alteração ( $p=0,038$ ). Adicionalmente, encontramos associação marginalmente significativa ( $p=0,085$ ) quando correlacionamos a existência de qualquer alteração citogenética com a recidiva bioquímica (Figura11). Não encontramos

associação significativa para a perda do cromossomo 7 ( $p=0,376$ ) (Figura 12) e para a perda do cromossomo 17 ( $p=417$ ) (Figura 13).

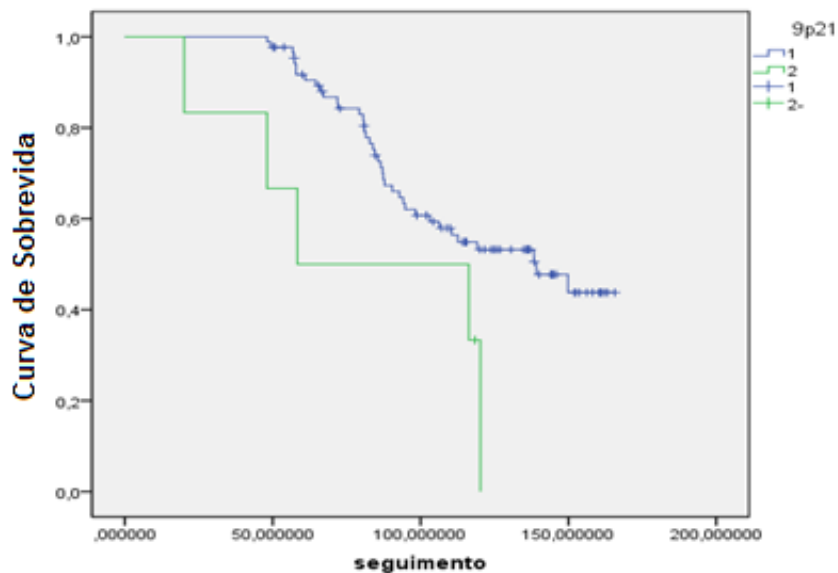


Figura 10. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda do locus 9p21

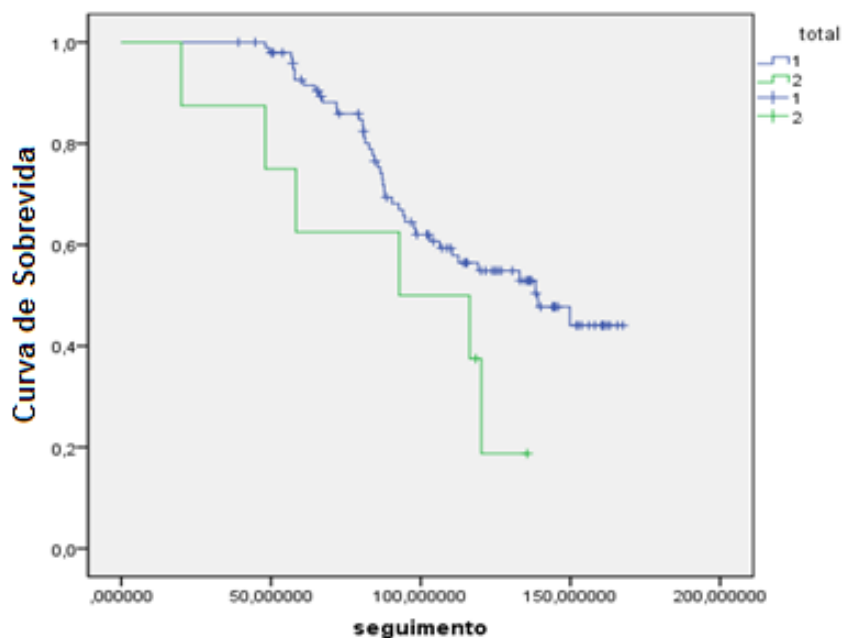


Figura 11. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda de sinal de pelo menos uma das sondas.

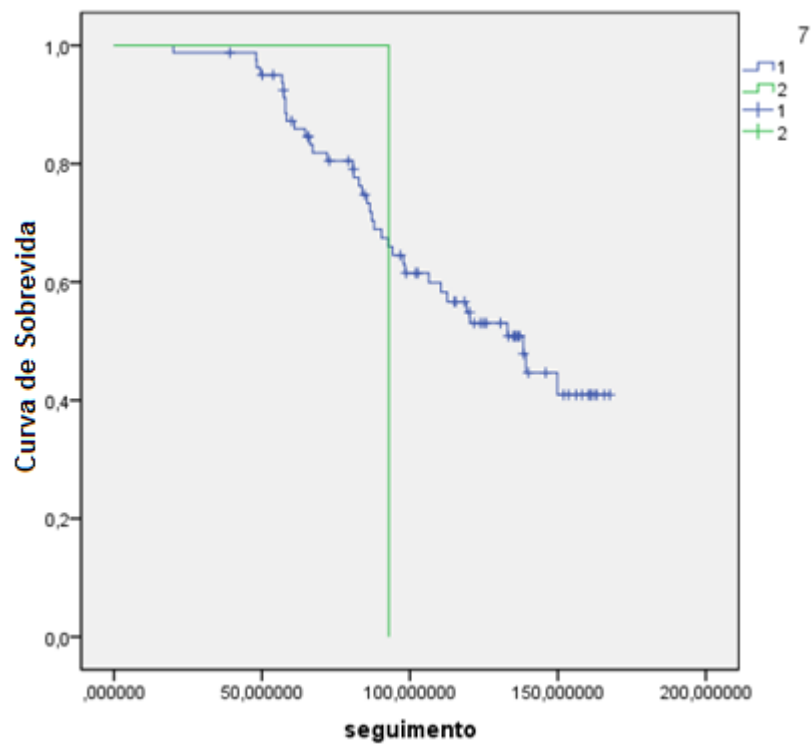


Figura 12. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda do cromossomo 7.

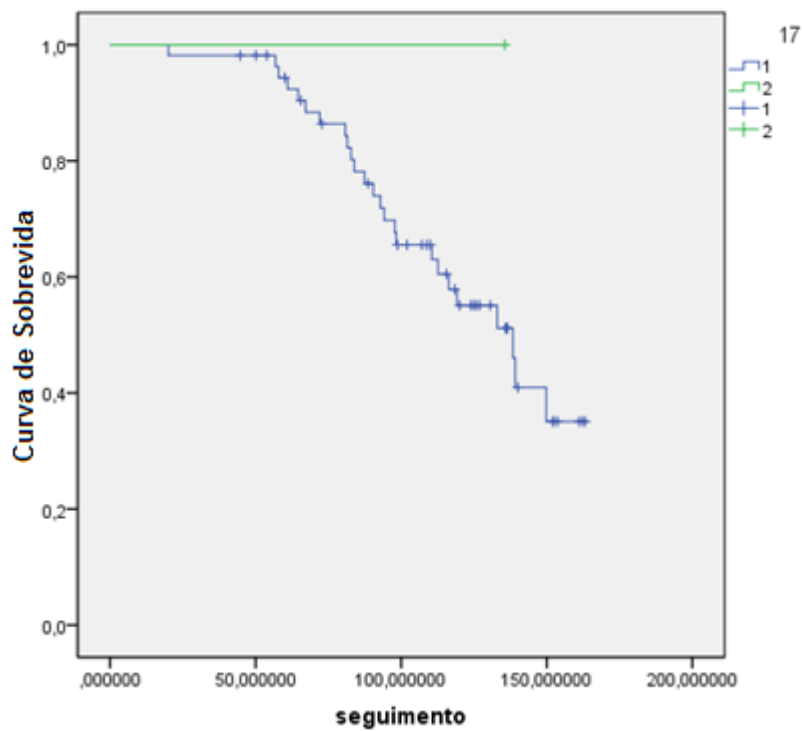


Figura 13. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda do cromossomo 17.

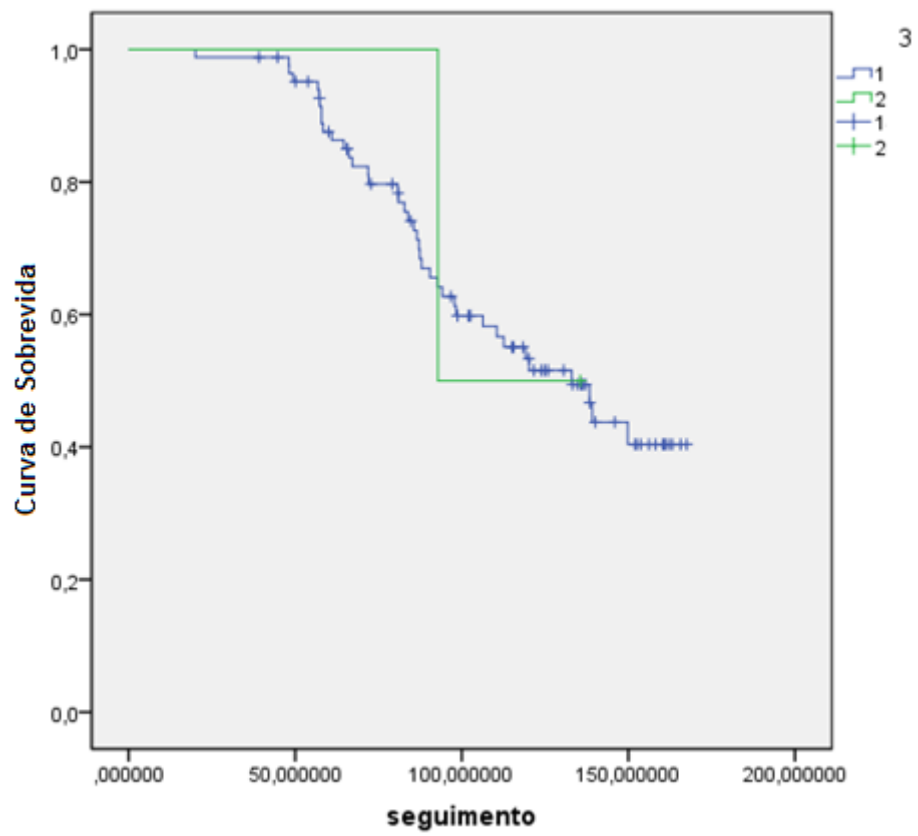


Figura 14. Tempo de sobrevida médio de acordo com a perda do cromossomo 3.



## 5. DISCUSSÃO

Avaliamos pela primeira vez na literatura indexada, as alterações citogenéticas nos cromossomos 3, 7, 17 e locus 9p21 no CaP localizado através da Técnica de FISH com o emprego do kit UroVysion® em microarranjo tecidual. Demonstramos baixa ocorrência destas alterações no tumor localizado uma vez que apenas 8 pacientes apresentaram alterações para uma das quatro sondas. Apesar disto, observamos associação significativa da perda do locus 9p21 com o prognóstico do CaP localizado tratado com cirurgia com intuito curativo. Acreditamos que este evento possa estar relacionado a maior agressividade da doença, visto que dos pacientes que apresentaram esta alteração 83% tiveram recidiva tumoral, e esta correlação alcançou significância marginal.

Notamos ainda, que os indivíduos que apresentam a perda de 9p21 apresentaram tempo médio para recidiva menor que os pacientes sem esta alteração (Log-rank  $p=0,038$ ), o que reforça a provável associação deste evento com o prognóstico da neoplasia. Em relação aos cromossomos 3, 7 e 17 não foi observada correlação da ocorrência de qualquer perda com a recidiva bioquímica, nem com o tempo médio para recidiva. Não encontramos também correlação entre os fatores clássicos de prognóstico, escore de Gleason, nível sérico de PSA ou estágio patológico com a ocorrência de perda de sinal de qualquer uma das sondas.

O CaP é uma neoplasia visceral de etiologia multifatorial e que apresenta alta prevalência nos países ocidentais. Trata-se de tumor de comportamento heterogêneo, caracterizado por história natural variável; onde alguns tumores apresentam um curso clínico indolente, isto é, podem ser seguidos de forma segura, sem a necessidade de intervenção imediata, enquanto outros possuem doença agressiva e necessitam de intervenção imediata, como a prostatectomia radical, além dos tratamentos adjuvantes (Cuzick et al. 2012). Esta é a razão da necessidade de definição prognóstica no manejo terapêutico destes pacientes; ou seja, a habilidade de identificar e diferenciar os tumores indolentes dos com maior potencial de agressividade.

é essencial na prática clínica para permitir a adoção da conduta apropriada a cada paciente, conforme seu prognóstico.

Os principais indicadores prognósticos no CaP são o escore de Gleason, os níveis absolutos e a velocidade do PSA, e o estágio clínico e patológico (Martins et al. 2003). O fato da evolução agressiva da doença estar relacionada a escores elevados de Gleason e níveis elevados de PSA é um consenso e está pautado em vários estudos previamente publicados (Qi-Peng Sun et al. 2010). Porém atualmente o desempenho destes fatores são díspares, pois não mapeiam e não diferenciam adequadamente os tumores indolentes dos agressivos.

O PSA é um marcador bem aceito para o diagnóstico tumoral do CaP, porém não é um marcador específico para o prognóstico, pois também sofre influências de outras alterações da próstata. O escore de Gleason é subjetivo devido a erros inerentes ao patologista. A classificação de risco, apesar do atrativo de refletir a análise combinada dos tres fatores de prognóstico clássico também é imperfeito (Pontes-Junior et al. 2013). Fazendo-se necessário a busca de novos marcadores mais específicos para prognóstico e acompanhamento do CaP.

Estudo de nosso grupo avaliou uma série de 93 pacientes, que apesar de preencherem os critérios de insignificância baseados nos fatores clássicos de prognóstico, foram submetidos à prostatectomia radical. Avaliando a peça cirúrgica encontramos tumor agressivo ou estágio localmente avançado em um terço dos casos. Esses dados reforçam a hipótese de que os fatores clássicos não são suficiente, reforçando a necessidade da descoberta de novos marcadores (Oliveira et al. 2010). A pesquisa de novos marcadores nas diversas neoplasias está baseada nos eventos moleculares, uma vez que independente do órgão e do tumor, o câncer é uma doença cuja patogênese é amplamente de causa genética. No CaP existe farta literatura sobre inúmeros marcadores relacionados ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica já descritos nesta neoplasia (Bhavsar et al. 2013).

A adesão celular tem sido uma dos focos na busca de novos marcadores no CAP (Christiansen et al. 2006, Tran et al. 1999). O nosso grupo avaliou retrospectivamente a expressão de 8 integrinas e 4 caderinas por IH e demonstramos que a perda de expressão da integrina beta1 estava

significativamente associada a maior chance de recorrência bioquímica após tratamento cirúrgico, ( $p = 0,047$ ) , os indivíduos com expressão negativa deste marcador 1 apresentavam chance de recorrência do CaP 2,78 vezes maior que o observado nos casos com expressão positiva (Pontes-Junior et al 2013). Acreditamos que a perda desta integrina promova o aparecimento do fenótipo mesenquimal, que favoreceria a progressão e disseminação do tumor.

O grande problema em relação aos inúmeros marcadores descritos na literatura tem sido a baixa confirmação dos resultados previamente descritos. A causa disto talvez deva-se à natureza heterogênea e a etiologia multifatorial do CaP; somado a isto a ausência de estudos confirmatórios com alto nível de evidência confere um problema adicional. A conclusão é que apesar da multiplicidade de estudos sobre marcadores moleculares no CaP, até o presente momento, nenhum marcador de prognóstico foi identificado, diante disso, permanece a necessidade de estudos para a identificação de novos marcadores.

Considerando a heterogeneidade do CaP, tem-se proposto, que a combinação da expressão de vários genes em conjunto, conhecido como assinatura gênica, seja mais promissor na definição prognóstica do CaP localizado. Nesse sentido Cuzick et al. (2012), com o intuito de prever o prognóstico de pacientes com CaP de acordo com determinada assinatura gênica, avaliou o padrão de expressão de 31 genes através da técnica de PCR em 349 pacientes com CAP tratados conservadoramente. Os autores definiram um padrão de assinatura associado à chance de óbito por CaP; indivíduos classificados com escore alto versus baixo apresentam chance de morte pelo tumor de 75 versus 19%, respectivamente ( $p < 0,0003$ ) . Esta assinatura gênica já foi validada em outras séries e recentemente foi aprovada pelo órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) sob o nome comercial Prolaris™, estando já disponível na prática clínica, constituindo assim um exemplo de pesquisa translacional.

A técnica de FISH, que é baseada nos princípios de hibridização e da citogenética, tem sido amplamente empregada na pesquisa e na validação de marcadores moleculares. Esta técnica possibilita a avaliação de alterações cromossômicas como deleções, duplicações, inversões, translocações ou amplificações; que são eventos diretamente ligados ao processo de

carcinogênese (Stefan et al. 1994) A técnica de FISH permite que sondas possam ser especificamente desenhadas para o reconhecimento de locus que contenham 1 ou um conjunto de genes supressores de tumor, cuja perda constitui um evento fundamental na gênese e evolução do processo carcinogênico (Araujo et al. 2005).

No câncer urotelial de bexiga e do trato urinário superior foi demonstrado que a presença de perdas nos cromossomos 3, 7, 17 e locus 9p21 detectadas na urina através da técnica de FISH estava associada a maior chance de desenvolvimento de câncer vesical de pior prognóstico (Halling et al. 2008). Este exame, conforme já discutido, já se encontra disponível na prática diária em nosso país sob o nome UroVysion® e está indicado no seguimento pós operatório dos pacientes com câncer de bexiga. Em nosso estudo levantamos a hipótese de que talvez pudéssemos encontrar correlação entre as alterações genéticas detectadas pelo UroVysion® e o prognóstico do CaP localizado, com o intuito de estabelecermos novos marcadores de prognóstico nessa neoplasia.

Encontramos baixa ocorrência de perdas cromossômicas detectadas pelo UroVysion® no CaP localizado tratado com cirurgia; e também não observamos correlação entre as perdas de sinal das sondas centroméricas 3,7 e 17 com o prognóstico do CaP.

Apesar da baixa ocorrência de alterações cromossômicas observadas, encontramos associação marginal entre a perda do locus 9p21 e a recidiva bioquímica no seguimento pós operatório. Dentre os seis pacientes com perda do sinal da sonda 9p21, 5 casos (83%) apresentaram recorrência da neoplasia durante os dez anos de seguimento. Reforçando esta associação, mostramos que os indivíduos com perda 9p21 mostraram tempo médio de sobrevida livre de recidiva significativamente menor quando comparado aos indivíduos sem perda deste locus ( $p=0,038$ ).

O locus 9p21 contem o gene p16 que codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina denominado CDKN2A. Por inibir as quinases e promover a inibição do ciclo celular, o p16 é considerado um gene supressor; adicionalmente o produto do gene p16 também atua estabilizando o p53, que é considerado o guardião do ciclo celular e gene supressor mais estudado na literatura. A perda do p53 tem sido observada em quase todas as neoplasias, ocorrendo precocemente ou tardiamente de acordo com o tumor considerado

(Hanahan, et al 2011). Postula-se que a perda do p16 facilita a carcinogênese por promover perda de inibição do ciclo celular, contribuindo assim para a proliferação descontrolada que é a característica de qualquer neoplasia maligna.

Dados da literatura evidenciam associação de mutações e perdas de p16 com aumento de risco de melanoma e adenocarcinoma de pâncreas, denotando o papel supressor deste gene (Liggett et al, 1998). Deleção homozigótica de p16 mostrou-se associado à pior prognóstico no câncer gástrico e esofágico (Igaki et al, 1994).

Brownhill et al (2007) avaliaram a ocorrência de metilação específica no gene do p16 em cultura de células de sarcoma de Ewing, por meio do método PCR em tempo real e descobriram que essas alterações podem estar relacionadas a pior prognóstico com menor tempo de sobrevida livre de doença.

Os dados da literatura sobre as alterações da expressão de p16 no CAP são escassos e as séries existentes apresentam baixa casuística. Alguns estudos mostraram que baixos níveis de expressão da proteína p16 e perda do locus 9p21 tem sido associado a menor sobrevida livre de recidiva bioquímica, maior chance de progressão, indicando um potencial marcador de prognóstico do CaP. Além das evidências de que a perda do locus 9p21 está associada a carcinogênese da próstata, existem também indícios de que perdas no cromossomo 7 também estejam diretamente relacionadas à progressão do CaP. Estudo realizado em 50 biópsias de próstata com diagnóstico de câncer mostrou que a perda do locus 7q32.2 estava associada maior estágio do CAP (Brys et al. 2013).

Adicionalmente, Spans et al realizaram revisão sistemática da literatura sobre as alterações citogenéticas no CaP e encontraram pior prognóstico em pacientes que apresentavam ganhos nas regiões 3q e 7q dos cromossomos 3 e 7 respectivamente (Spans et al. 2013). Nossos dados em relação às alterações nos cromossomos 3 e 7 não corroboram esses dados da literatura, uma vez que não observamos correlação entre a perda das sondas para os cromossomos 3 e 7 com os fatores de prognóstico, ou com a recidiva do tumor.

Em nosso estudo, postulamos que a perda do locus 9p21, e consequentemente perda do gene supressor p16, resulte em perda de inibição

do ciclo celular favorecendo a proliferação e o processo carcinogenético da próstata, sendo portanto um potencial candidato a marcador de prognóstico no CaP. Estudos de sequenciamento e de validação são necessários para comprovar nossa hipótese.

Alguns estudos postulavam que o menor tamanho da amostra disposta no TMA impossibilitaria a realização adequada do FISH, logo uma contribuição importante de nosso estudo foi que demonstramos pela primeira vez na literatura a exequibilidade da realização da técnica de FISH em amostras parafinadas de CaP dispostas em TMA, e que tal técnica pode ser realizada em lâminas com longo tempo de armazenamento (Brys et al. 2013; Spans et al. 2013).

O ponto forte de nosso estudo residiu na homogeneidade de resultados uma vez que adotamos a técnica de TMA, que permite a análise simultânea de vários cortes histológicos do CaP arranjados em lâmina única. O fato de todas as cirurgias terem sido realizadas por cirurgião único e referenciado na área somada à análise anátomo patológica com revisão central por uro-patologista única também constituem pontos positivos do trabalho. Sabemos que a natureza retrospectiva do estudo constituiu limitação de nossos resultados, assim como a perda de casos, especialmente para a sonda do cromossomo 17 onde houve perda de amostra em metade dos casos, o que limita as conclusões em relação a esta sonda.

## CONCLUSÕES

As alterações citogenéticas detectadas pelas sondas CEP 3, 7 e 17 e LSPI 9p apresentaram baixa frequência em nossa amostra de CaP localizado.

Não houve correlação entre a presença de alterações citogenéticas com o escore de Gleason, níveis sérico de PSA, estágio patológico ou grupo de risco. Observamos que a perda do locus 9p21 está associado a pior prognóstico no CaP tratados com Câncer de próstata, pois pacientes com esta alteração citogenética apresentaram menor tempo para a recidiva bioquímica após a cirurgia.

## REFERÊNCIAS

Antoinette S, Perry R, William GW, Mark LDH. The epigenome as therapeutic target in prostate cancer. *Nature Reviews/Urology*. 2010; (7): 668-680.

Araujo JJ. Estudos Citogenético e Molecular de Tumores Humanos do Sistema Nervoso. [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina - Departamento de genética; 2005.

Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Aasinen E, Bohle A, Palou-Redorta J, Roupret M. EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Actas Urol Esp*. 2009; 33(4): 361-71.

Baroni RH, Novis MI, Hissae A, Caiado M, Cerri LMO, et al. Ressonância magnética da próstata: uma visão geral para o radiologista. *Rev. Radiol Brasileira*. [periódico na Internet] Mai./jun 2009; 42(3).

Bhargava R, Lal Priti, Chen B. Chromogenic In Situ Hybridization for the Detection of HER-2/neu Gene Amplification in Breast Cancer With an Emphasis on Tumors With Borderline and Low-Level Amplification. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 237-243.

Bhavsar T, McCue P, Birbe R. Molecular diagnosis of prostate cancer: are we up to age? *Semin Oncol*. 2013; 40(3): 259-75.

Brownhill SC, Taylor C, Burchill SA. Chromosome 9p21 gene copy number and prognostic significance of p16 in ESFT. *British Journal of Cancer*. 2007; 96: 1914 – 1923.

Brys M, Migdalska-Sek M, Pastuszek-Lewandoska D, Forma E, Czarnecka K, Doman´ska D, Nawrot E, Wilkosz J, Rózanski W, Brzezianska E. Diagnostic value of DNA alteration: loss of heterozygosity or allelic imbalance—promising for molecular staging of prostate cancers. *Med Oncol*. 2013; 30:391.

Cambruzzi E, Zettler CG, Pegas KL, Teixeira SL. Relação entre escore de Gleason e fatores prognósticos no adenocarcinoma acinar de próstata. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. [periódico na Internet] Fev. 2010; 46(1): 61- 68.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000; 80 (12): 1943-9.

Carter HB, Pearson JD. Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of cancer: formulation of guidelines. *Urology*. 1999; 54: 780-786.



Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66: 8319-8326.

Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*. 2003; 62:3-12.

Cuzick J, Berney DM, Fisher G, Mesher D, Moller H, Reid JE, Perry M, Park J, Younus A, Gutin A, Foster CS, Scardino P, Lanchbury JS, Stone S. Prognostic value of a cell cycle progression signature for prostate cancer death in a conservatively managed needle biopsy cohort. *British Journal of Cancer*. 2012; 106: 1095 – 1099.

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998; 280 (11): 969-74.

Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum Pathol*. 1992; 23: 273-279.

Giovannucci EL, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer*. 2007; 121:1571 – 8.

Gomes R, Rebello LEFS, Araujo FC, Nascimento EF. A prevenção do câncer de próstata: uma revisão da literatura. *Rev. Ciênc. Saúde coletiva*. 1,2, 2008; 13(1).

Graefen M, Karakiewicz PI, Cagiannos I, Quinn DI, Henshall SM, Grygiel JJ, et.al.. International validation of a preoperative nomogram for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 3206-12.

Guerra M. FISH - (Fluorescent in Situ Hybridization) Conceitos e Aplicações na Citogenética. SBG, 2004.

Halling KC, Kipp BR. Bladder Cancer Detection Using FISH (UroVysion Assay). *Adv Anat Pathol*, Set, 2008;15(5): 279-286.

Hanahan, D; Weinberg, RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144(5), 646-74.

Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH. Validation of tissue microarrays for imunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol*. 2001;158: 1245-1251.

Igaki H, Sasaki H, Kishi T, Sakamoto H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Sugimura T, Terada M. Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 203(2): 1090-1095.

Inca – Instituto nacional de Câncer. [pagina na Internet]. Tipos de Câncer – Prostata. [citado em 26 de março de 2012]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>

Leite KRM, Srougi M, Kauffmann JR, Bevilacqua RG, Nesrallah AJ, et al. O padrão 4 de Gleason e o volume tumoral no prognóstico do carcinoma da próstata. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2005; 51(6).

Liggett WH Jr, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16(3):1197-206.

Lucas SM, Health EI. Current Challenges in Development of Differentially Expressed and Prognostic Prostate Cancer Biomarkers. Hindawi Publishing Corporation - Prostate Cancer. 2012;

Martins ACP, Rodrigues AAJ, Reis RB, Bovo TB, Suaid HJ, et al. Free PSA and prostate volume on the diagnosis of prostate carcinoma. *Acta Cir. Bras*. 2003; 18(5).

Meloni AM, Peier AM, Haddad FS, Powell IJ, Block AW, Huben RP, Todd I, Potter W, Sandberg AA. A new approach in the diagnosis and follow-up of bladder cancer. FISH analysis of urine, bladder washings, and tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993; 71(2):105-18.

Migowski A, Silva GA. Sobrevida e fatores prognósticos de pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado. *Rev. Saúde Pública*. Abr. 2010; 44(2).

Moul JW, Kane CJ, Malkowicz SB. The role of imaging studies and molecular markers for selecting candidates for radical prostatectomy. *Urol Clin North Am*. 2002; 8: 459-472.

Naoum PC. Avanços tecnológicos em hemoterapia laboratorial. *Rev. Bras hematol. Bemoter*. 2001; 23(2).

Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. NEJM. 2003; 349: 366-81.

Nogueira L, Corradi R, Eastham JA. Prostatic specific antigen for prostate cancer detection. Int. Braz. J. urol. 2009; 35(5).

Oliveira IS, Pontes-Junior J, Abe DK, Crippa A, Dall'oglio MF, Nesralah AJ, Leite KR, Reis ST, Srougi M. Undergrading and understaging in patients with clinically insignificant prostate cancer who underwent radical prostatectomy. Int Braz J Urol. 2010; May-Jun; 36(3): 292-9.

Qi-Peng Sun, Liao Yuan Li, Zhong Chen, Jun Pang, Wei-Jiao Yang, et al. Detection of TMPRSS2 – ETS fusions by a multiprobe fluorescence in situ Hybridization Assay for the Early Diagnostic of Prostate Cancer. Journal of Molecular Diagnostics. 2010; 12(5).

Paiva GHRG, Rogatto SR. Genes candidatos a marcadores tumorais na progressão do adenocarcinoma de próstata identificados por análise de HR-CGC e CGH-Array. [Tese de doutorado]. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências de Botucatu. 2009.

Paiva EP, Motta MCS, Griep RH. Barriers related to screening examinations for prostate câncer. Rev. Latino-Am. Enfermagem. 2011; 19(1).

Partin AW, Feneley MR. Indicators of pathologic stage of prostate cancer and their use in clinical practice. Urol Clin North Am. 2001; 28: 3.

Pcri – Prostate Cancer research Institute. [página na Internet]. The Gleason Score: A Significant Biologic Manifestation of Prostate Cancer Aggressiveness On Biopsy; 2001 - . [citado em 27 de março de 2012]. Disponível em: <http://www.prostate-cancer.org/pcricms/node/165>.

Pontes-Junior J, Reis ST, Bernardes FS, Oliveira SCN, Barros EAF, Dall'Óglio MF, Timosczuk LMS, Ribeiro-Filho LA, Srougi M, Leite KRM. Correlation between Beta1 integrin expression and prognosis in clinically localized prostate cancer. Int Braz J Urol. 2013; 39: 335-43.

Potters L, Klein EA, Kattan MW, Reddy CA, Ciezki JP, Reuther AM, Kupelian PA. Monotherapy for stage T1-T2 prostate cancer: radical prostatectomy, external beam radiotherapy, or permanent seed implantation. Radiother Oncol. 2004; 71: 29-33.

Roehl KA, Loeb S, Antenor JA, Corbin N and Catalona WJ: Characteristics of patients with familial versus sporadic prostate cancer. J Urol. 2006; 176: 2438.

Scheble VJ, Braun M, Beroukhir R, Mermel Ch, Ruiz C, et al. ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. *Modern Pathology* 2010; 23: 1061-1067.

Spans L, Clinckemalie L, Helsen C, Vanderschueren D, Boonen S, Lerut E, Steven Joniau S, Claessens F. The Genomic Landscape of Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14, 10822-10851.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM – Classification of Malignant Tumours. 7ed. UICC – International Union Against Cancer: 2009

Srougi M, Pontes JJ, Antunes AA, Reis ST. Identificação de novos marcadores diagnósticos e prognósticos no câncer de próstata. In: *Patologias urológicas da Bancada ao leito*; Leite KRM, Srougi M. Atheneu: 2010.

Stamey TA, Mc Neal JE, Yemoto C. Biological determinant of cancer progression of men with prostate cancer. *JAMA*. 1999; 281:1395.

Stefan J, Thomas MF, Andreas R, Peter L. Mapping and chromosome analysis: The potential of fluorescence in situ hybridization. *Journal of Biotechnology*. 1994; 35: 135-153.

Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, Bianco FJ Jr, Dotran ZA, Fearn PA, Kattan MW. Preoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98(10): 715-717.

Strohmeyer DM, Berger AP, Moore DH, Bartsch G, Klocker H, et al. Genetic Aberrations in Prostate Carcinoma Detected by Comparative Genomic Hybridization and Microsatellite analysis association with progression and angiogenesis. *The Prostate*. 2004; 59: 43 - 58.

Sun XY, Dolnald SP, Phang JM. Testosterone and prostate specific antigen stimulate generation of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Oxford Journals. Carcinogenesis*. 2001; 22 (11): 1775 -1780.

Tran NL, Nagle RB, Cress AE, Heimark RL: N-cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with stromal cells. *Am J Pathol* 1999;155: 787-798.

UroVysion. Informações e direcionamento do fabricante referente ao Kit para câncer de bexiga. Abbott Laboratories. 2010.

## APÊNDICE 1

Tabela. Dados clínicos, demográficos e anátomo patológicos dos pacientes avaliados no estudo

| Número do paciente | SL    | Risco         | Idade | PSApr e | Estpa t | Gleaso n | data recidva | recidiva | Acomp. em meses | Seguimento | DataSO     |
|--------------------|-------|---------------|-------|---------|---------|----------|--------------|----------|-----------------|------------|------------|
| 1                  | 32983 | Baixo         | 63    | 6,60    | T2A     | 6        |              | 0        | 167,5           | 17/10/2007 | 12/01/1994 |
| 2                  | 34282 | Baixo         | 72    | 6,70    | T2A     | 6        |              | 0        | 118,4           | 30/12/2003 | 09/04/1994 |
| 3                  | 41972 | Baixo         | 73    | 4,40    | T2A     | 6        |              | 0        | 161,1           | 30/09/2008 | 08/07/1995 |
| 4                  | 46850 | Baixo         | 58    | 7,50    | T2A     | 6        |              | 0        | 152,0           | 02/10/2008 | 09/04/1996 |
| 5                  | 48397 | Baixo         | 70    | 7,90    | T2A     | 6        | 17/03/2005   | 1        | 149,8           | 22/10/2008 | 02/07/1996 |
| 6                  | 53523 | Baixo         | 68    | 6,10    | T2A     | 6        |              | 0        | 140,0           | 22/10/2008 | 22/04/1997 |
| 7                  | 55199 | Baixo         | 62    | 7,40    | T2A     | 6        |              | 0        | 136,4           | 30/09/2008 | 17/07/1997 |
| 8                  | 58661 | Baixo         | 52    | 3,80    | T2A     | 6        |              | 0        | 72,7            | 30/12/2003 | 08/01/1998 |
| 9                  | 62285 | Baixo         | 66    | 3,20    | T2A     | 6        |              | 0        | 79,2            | 20/01/2005 | 21/07/1998 |
| 10                 | 63820 | Baixo         | 70    | 4,82    | T2A     | 6        |              | 0        | 121,7           | 30/09/2008 | 03/10/1998 |
| 11                 | 65732 | Baixo         | 47    | 10,00   | T2A     | 6        |              | 0        | 110             | 27/03/2008 | 07/01/1999 |
| 12                 | 65207 | Baixo         | 58    | 10,00   | T2A     | 6        | 12/01/2004   | 1        | 61,0            | 12/01/2004 | 05/12/1998 |
| 13                 | 42366 | Baixo         | 66    | 9,60    | T2A     | 6        | 30/04/1997   | 1        | 98,3            | 30/08/2003 | 02/08/1995 |
| 14                 | 63362 | Baixo         | 69    | 4,20    | T2A     | 6        | 30/04/2002   | 1        | 64,6            | 30/12/2003 | 10/09/1998 |
| 15                 | 63739 | Baixo         | 61    | 7,60    | T2A     | 6        | 30/04/1999   | 1        | 56,8            | 30/05/2003 | 29/09/1998 |
| 16                 | 52878 | Baixo         | 67    | 9,30    | T2A     | 6        | 30/11/2000   | 1        | 80,6            | 30/10/2003 | 18/03/1997 |
| 17                 | 40348 | intermediário | 66    | 8,10    | T2B     | 6        |              | 0        | 125,8           | 21/07/2005 | 21/03/1995 |
| 18                 | 40833 | intermediário | 56    | 1,60    | T2B     | 7        |              | 0        | 163,2           | 30/09/2008 | 05/05/1995 |
| 19                 | 44672 | intermediário | 65    | 8,60    | T2B     | 7        |              | 0        | 156,2           | 02/10/2008 | 04/12/1995 |
| 20                 | 51707 | intermediário | 56    | 1,60    | T2B     | 6        |              | 0        | 84,7            | 30/12/2003 | 14/01/1997 |
| 21                 | 50131 | intermediário | 72    | 20,00   | T2B     | 7        |              | 0        | 145,9           | 02/10/2008 | 08/10/1996 |
| 22                 | 56231 | intermediário | 63    | 4,80    | T2B     | 7        |              | 0        | 134,8           | 02/10/2008 | 06/09/1997 |
| 23                 | 54023 | intermediário | 74    | 8,60    | T2B     | 7        | 26/01/2006   | 1        | 139,2           | 22/10/2008 | 17/05/1997 |
| 24                 | 54482 | intermediário | 74    | 7,80    | T2B     | 7        | 22/02/2002   | 1        | 138,3           | 22/10/2008 | 12/06/1997 |
| 25                 | 55247 | intermediário | 67    | 13,90   | T2A     | 7        |              | 0        | 136,4           | 30/09/2008 | 19/07/1997 |
| 26                 | 56201 | intermediário | 57    | 8,20    | T2A     | 7        |              | 0        | 104,3           | 01/11/2005 | 09/04/1997 |
| 27                 | 60724 | intermediário | 70    | 16,00   | T2B     | 7        |              | 0        | 126,9           | 02/10/2008 | 30/04/1998 |
| 28                 | 68254 | intermediário | 50    | 3,70    | T2B     | 6        |              | 0        | 106,1           | 26/01/2008 | 11/05/1999 |
| 29                 | 67826 | intermediário | 64    | 5,00    | T2B     | 7        |              | 0        | 57,3            | 30/12/2003 | 17/04/1999 |
| 30                 | 62063 | intermediário | 41    | 6,50    | T2B     | 6        |              | 0        | 66,7            | 30/12/2003 | 08/07/1998 |
| 31                 | 62520 | intermediário | 69    | 12,00   | T2B     | 7        |              | 0        | 123,8           | 02/10/2008 | 01/08/1998 |
| 32                 | 42063 | intermediário | 70    | 3,80    | T2A     | 7        |              | 0        | 161,0           | 02/10/2008 | 14/07/1995 |
| 33                 | 62698 | intermediário | 68    | 7,90    | T2A     | 7        |              | 0        | 65,6            | 30/12/2003 | 11/08/1998 |
| 34                 | 62277 | intermediário | 61    | 4,40    | T2A     | 7        |              | 0        | 120,1           | 02/06/2008 | 21/07/1998 |
| 35                 | 57981 | intermediário | 59    | 5,47    | T2A     | 7        |              | 0        | 50,8            | 30/01/2002 | 27/11/1997 |
| 36                 | 51538 | intermediário | 65    | 7,60    | T2A     | 7        |              | 0        | 130,6           | 25/09/2007 | 02/01/1997 |
| 37                 | 63288 | intermediário | 51    | 10,00   | T2A     | 7        |              | 0        | 65,6            | 30/12/2003 | 09/08/1998 |
| 38                 | 39711 | intermediário | 69    | 8,30    | T2A     | 7        |              | 0        | 165,7           | 30/09/2008 | 21/02/1995 |
| 39                 | 42712 | intermediário | 66    | 10,00   | T2A     | 7        |              | 0        | 160,3           | 22/10/2008 | 22/08/1995 |
| 40                 | 45344 | intermediário | 61    | 3,80    | T2A     | 7        |              | 0        | 96,7            | 30/12/2003 | 19/01/1996 |
| 41                 | 54364 | intermediário | 74    | 8,40    | T2B     | 6        |              | 0        | 60,0            | 01/06/1997 | 05/06/1992 |
| 42                 | 35278 | intermediário | 64    | 9,40    | T2A     | 7        |              | 0        | 144,0           | 17/05/2006 | 08/06/1994 |
| 43                 | 34799 | intermediário | 56    | 14,20   | T2B     | 6        | 30/11/2003   | 1        | 116,4           | 30/11/2003 | 10/05/1994 |

|    |                    |                   |    |       |     |   |            |   |       |            |            |
|----|--------------------|-------------------|----|-------|-----|---|------------|---|-------|------------|------------|
| 44 | 46151              | intermediari<br>o | 50 | 7,10  | T2B | 7 | 30/11/1996 | 1 | 72,0  | 30/01/2002 | 01/03/1996 |
| 45 | 46412              | intermediari<br>o | 61 | 7,80  | T2B | 6 | 30/05/2003 | 1 | 92,8  | 30/10/2003 | 15/03/1996 |
| 46 | 47190              | intermediari<br>o | 65 | 8,80  | T2B | 7 | 30/03/1998 | 1 | 90,4  | 30/09/2003 | 26/04/1996 |
| 47 | 50736              | intermediari<br>o | 60 | 5,70  | T2B | 7 | 30/05/1997 | 1 | 80,8  | 28/02/2003 | 11/07/1996 |
| 48 | 50922              | intermediari<br>o | 59 | 7,30  | T2B | 7 | 30/05/1999 | 1 | 81,5  | 30/07/2003 | 19/11/1996 |
| 49 | 57221              | intermediari<br>o | 60 | 7,60  | T2B | 6 | 30/04/2003 | 1 | 67,2  | 30/04/2003 | 23/10/1997 |
| 50 | 72993              | intermediari<br>o | 65 | 7,30  | T2A | 7 | 30/12/2003 | 1 | 49,4  | 30/12/2003 | 09/12/1999 |
| 51 | 64300              | intermediari<br>o | 46 | 7,60  | T2B | 7 | 30/12/2002 | 1 | 57,9  | 30/07/2003 | 27/10/1998 |
| 52 | 64155              | intermediari<br>o | 68 | 16,00 | T2B | 7 | 30/08/2002 | 1 | 57,1  | 30/06/2003 | 20/10/1998 |
| 53 | 58600              | intermediari<br>o | 69 | 8,60  | T2A | 7 | 30/06/1998 | 1 | 20,0  | 30/08/1999 | 06/01/1998 |
| 54 | 53781              | intermediari<br>o | 64 | 6,25  | T2A | 7 | 28/02/2001 | 1 | 81,0  | 30/12/2003 | 06/05/1997 |
| 55 | 52326              | intermediari<br>o | 67 | 12,50 | T2B | 7 | 30/04/1998 | 1 |       |            | 20/02/1997 |
| 56 | 53853              | alto              | 71 | 10,60 | T2A | 8 |            | 0 | 80,9  | 30/12/2003 | 08/05/1997 |
| 57 | 75919              | alto              | 69 | 7,10  | T3A | 6 |            | 0 | 102,7 | 30/09/2008 | 25/04/2000 |
| 58 | 69166              | alto              | 60 | 6,10  | T3A | 8 |            | 0 | 107,1 | 07/04/2008 | 21/06/1999 |
| 59 | 39582              | alto              | 74 | 38,00 | T2C | 9 |            | 0 | 108,8 | 21/01/2004 | 14/02/1995 |
| 60 | 78434              | alto              | 79 | 22,00 | T2A | 6 |            | 0 | 39,1  | 30/10/2003 | 12/08/2000 |
| 61 | 54431              | alto              | 64 | 4,50  | T3A | 8 |            | 0 | 138,4 | 22/10/2008 | 10/06/1997 |
| 62 | 41364              | alto              | 69 | 15,80 | T2B | 8 |            | 0 | 162,3 | 30/09/2008 | 03/06/1995 |
| 63 | 41625              | alto              | 67 | 4,80  | T3B | 9 |            | 0 | 88,6  | 30/09/2002 | 20/06/1995 |
| 64 | 44416              | alto              | 63 | 10,20 | T3C | 8 |            | 0 | 98,7  | 30/12/2003 | 21/11/1995 |
| 65 | 54953              | alto              | 69 | 6,80  | T3C | 7 |            | 0 | 135,8 | 28/08/2008 | 04/07/1997 |
| 66 | 61877              | alto              | 69 | 6,60  | T3C | 7 |            | 0 | 124,9 | 02/10/2008 | 30/06/1998 |
| 67 | 46588              | alto              | 58 | 25,00 | T2A | 6 |            | 0 | 152,4 | 02/10/2008 | 26/03/1996 |
| 68 | 71224              | alto              | 61 | 10,00 | T2c | 9 |            | 0 | 44,7  | 30/05/2003 | 27/09/1999 |
| 69 | 66152              | alto              | 65 | 21,00 | T2B | 9 |            | 0 | 53,8  | 30/06/2003 | 28/01/1999 |
| 70 | 49940              | alto              | 58 | 6,20  | T2B | 9 |            | 0 | 135,6 | 13/11/2007 | 24/09/1996 |
| 71 | 50703              | alto              | 61 | 23,80 | T2C | 8 |            | 0 | 145,0 | 02/10/2008 | 05/11/1996 |
| 72 | 57818              | alto              | 45 | 8,80  | T3A | 8 | 28/03/2005 | 1 | 133,0 | 22/10/2008 | 20/11/1997 |
| 73 | 54780              | alto              | 76 | 5,80  | T2A | 8 |            | 0 | 137,1 | 30/09/2008 | 26/06/1997 |
| 74 | 45925              | alto              | 74 | 1,20  | T2A | 8 |            | 0 | 153,7 | 30/09/2008 | 16/02/1996 |
| 75 | 42573              | alto              | 47 | 19,60 | T2B | 8 |            | 0 | 102,0 | 30/12/2003 | 15/08/1995 |
| 76 | 50920              | alto              | 65 | 15,50 | T2B | 8 |            | 0 | 144,5 | 03/10/2008 | 19/11/1996 |
| 77 | 52229              | alto              | 61 | 9,20  | T2B | 8 | 01/01/2007 | 1 | 120,2 | 01/01/2007 | 15/02/1997 |
| 78 | 35784              | alto              | 62 | 9,00  | T2C | 8 |            | 0 | 115,5 | 30/12/2003 | 04/07/1994 |
| 79 | 54069              | alto              | 79 | 1,30  | T2B | 8 |            | 0 | 50,1  | 30/06/2001 | 20/05/1997 |
| 80 | 65771              | alto              | 70 | 5,40  | T3A | 9 | 02/03/2004 | 1 | 119,1 | 22/10/2008 | 09/01/1999 |
| 81 | 67890              | alto              | 61 | 10,00 | T3A | 8 |            | 0 | 115,0 | 30/09/2008 | 20/04/1999 |
| 82 | 57147              | alto              | 62 | 10,00 | T3C | 9 |            | 0 | 133,2 | 30/09/2008 | 21/10/1997 |
| 83 | 41234              | alto              | 58 | 7,40  | T2C | 6 |            | 0 | 114,3 | 16/10/2004 | 29/05/1995 |
| 84 | 43643              | alto              | 58 | 11,00 | T2C | 6 |            | 0 | 158,2 | 02/10/2008 | 06/10/1995 |
| 85 | 40955              | alto              | 50 | 9,60  | T3A | 8 | 30/07/1998 | 1 | 103,2 | 30/10/2003 | 10/05/1995 |
| 86 | 35186              | alto              | 68 | 8,40  | T2B | 8 | 30/08/1994 | 1 | 110,5 | 30/06/2003 | 03/06/1994 |
| 87 | 40227<br>1E+0<br>5 | alto              | 64 | 10,50 | T3A | 8 | 30/06/1996 | 1 | 103,7 | 30/09/2003 | 25/03/1995 |
| 88 |                    | alto              | 72 | 36,00 | T2B | 8 | 30/10/1998 | 1 | 106,4 | 30/12/2003 | 05/04/1995 |
| 89 | 41597              | alto              | 66 | 25,90 | T3A | 8 | 30/06/1997 | 1 | 97,8  | 30/06/2003 | 17/06/1995 |
| 90 | 42082              | alto              | 74 | 24,00 | T2C | 7 | 30/11/1999 | 1 | 94,8  | 30/04/2003 | 18/07/1995 |
| 91 | 41960              | alto              | 67 | 9,90  | T3C | 8 | 30/09/1995 | 1 | 80,9  | 28/02/2002 | 07/07/1995 |
| 92 | 46722              | alto              | 59 | 6,60  | T2C | 8 | 30/12/1997 | 1 | 87,1  | 30/05/2003 | 02/04/1996 |
| 93 | 47625              | alto              | 62 | 16,00 | T3C | 7 | 30/12/2003 | 1 | 92,6  | 30/12/2003 | 21/05/1996 |
| 94 | 48165              | alto              | 65 | 40,00 | T2A | 8 | 30/09/1996 | 1 | 84,5  | 30/05/2003 | 19/06/1996 |
| 95 | 48269              | alto              | 62 | 20,00 | T2C | 9 | 30/05/2000 | 1 | 87,4  | 30/08/2003 | 25/06/1996 |
| 96 | 50409              | alto              | 65 | 12,00 | T3C | 7 | 30/06/1999 | 1 | 86,5  | 30/11/2003 | 22/10/1996 |

|     |       |      |    |       |     |   |            |   |       |            |            |
|-----|-------|------|----|-------|-----|---|------------|---|-------|------------|------------|
| 97  | 50633 | alto | 60 | 9,90  | T2C | 8 | 30/03/1998 | 1 | 87,8  | 30/04/2003 | 11/02/1996 |
| 98  | 50809 | alto | 71 | 25,90 | T2B | 9 | 30/06/1999 | 1 | 82,8  | 30/09/2003 | 11/12/1996 |
| 99  | 54216 | alto | 58 | 45,00 | T2B | 7 | 30/06/1998 | 1 | 79,3  | 30/11/2003 | 27/05/1997 |
| 100 | 71072 | alto | 61 | 7,50  | T2A | 8 | 30/06/2001 | 1 | 48,2  | 30/08/2003 | 14/09/1999 |
| 101 | 36785 | alto | 60 | 7,50  | T2A | 8 | 30/04/1997 | 1 | 112,6 | 30/11/2003 | 31/08/1994 |
| 102 | 49290 | alto | 62 | 16,92 | T2A | 8 | 30/10/2000 | 1 | 85,5  | 30/08/2003 | 20/08/1996 |
| 103 | 41981 | alto | 72 | 12,50 | T2B | 8 | 30/05/2001 | 1 | 87,9  | 30/09/2002 | 11/07/1995 |
| 104 | 44753 | alto | 51 | 14,60 | T2B | 8 | 30/09/1996 | 1 | 94,1  | 30/08/2003 | 06/12/1995 |
| 105 | 51645 | alto | 66 | 11,00 | T2B | 8 | 30/06/1999 | 1 | 83,8  | 30/11/2003 | 10/01/1997 |
| 106 | 49406 | alto | 68 | 14,00 | T2B | 8 | 30/01/1998 | 1 | 66,2  | 30/01/2002 | 24/08/1996 |
| 107 | 61837 | alto | 68 | 8,39  | T2B | 8 | 30/01/2002 | 1 | 57,9  | 30/03/2003 | 27/06/1998 |
| 108 | 62846 | alto | 71 | 9,30  | T3A | 7 | 30/07/2002 | 1 | 48,1  | 30/07/2002 | 18/08/1998 |
| 109 | 62754 | alto | 62 | 11,00 | T3A | 9 | 30/04/2003 | 1 | 57,4  | 30/04/2003 | 13/08/1998 |
| 110 | 63430 | alto | 66 | 18,30 | T2C | 8 | 30/04/2000 | 1 | 58,3  | 30/06/2003 | 15/09/1998 |
| 111 | 58145 | alto | 53 | 6,52  | T2A | 8 | 30/01/2000 | 1 | 71,9  | 30/10/2003 | 04/12/1997 |

## APÊNDICE 2

Tabela. Resultados da leitura das placas de TMA, contendo 112 casos de Adenocarcinoma de próstata, 2 amostras por caso, utilizando um perfurador de 1,0 mm e espaçamento de 0,2 mm

|       | 1  | 1  | 2  | 2  | 3  | 3  | 4  | 4  | 5  | 5  | 6  | 6  | 7  | 7  | 8  | 8  | 9  | 9  |
|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 9p    | *  | *  | +  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | *  | -  | -  | *  | *  |
| Verde | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  |
| Verm  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  |
| Aqu   | *  | *  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  |
|       | 10 | 10 | 11 | 11 | 12 | 12 | 13 | 13 | 14 | 14 | 15 | 15 | 16 | 16 | 17 | 17 | 18 | 18 |
| 9p    | -  | *  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  |
| Verde | -  | -  | *  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | -  | -  | -  | *  |
| Verm  | -  | -  | *  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | -  | -  | -  | *  |
| Aqu   | *  | *  | -  | *  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | -  | *  | -  | *  |
|       | 19 | 19 | 20 | 20 | 21 | 21 | 22 | 22 | 23 | 23 | 24 | 24 | 25 | 25 | 26 | 26 | 27 | 27 |
| 9p    | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | *  | *  | -  | -  | -  |
| Verde | -  | -  | *  | -  | -  | *  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | *  | *  | *  |
| Verm  | -  | -  | *  | -  | -  | *  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | *  | *  | *  |
| Aqu   | *  | *  | *  | *  | *  | *  | *  | *  | *  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | -  | -  |
|       | 28 | 28 | 29 | 29 | 30 | 30 | 31 | 31 | 32 | 32 | 33 | 33 | 34 | 34 | 35 | 35 | 36 | 36 |
| 9p    | *  | *  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -  | *  | -  | -  |
| Verde | *  | *  | -  | *  | *  | *  | *  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | -  | *  |
| Verm  | *  | *  | -  | *  | *  | *  | *  | -  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | -  | *  |
| Aqu   | *  | *  | *  | *  | *  | *  | *  | -  | *  | *  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | -  | -  |
|       | 37 | 37 | 38 | 38 | 39 | 39 | 40 | 40 | 41 | 41 | 42 | 42 | 43 | 43 | 44 | 44 | 45 | 45 |
| 9p    | *  | *  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | *  |
| Verde | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | *  | *  | *  | *  | -  | -  | +  | +  |
| Verm  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | *  | *  | *  | *  | -  | -  | +  | +  |
| Aqu   | *  | *  | *  | *  | *  | *  | *  | *  | -  | -  | *  | *  | *  | *  | -  | *  | -  | -  |
|       | 46 | 46 | 47 | 47 | 48 | 48 | 49 | 49 | 50 | 50 | 51 | 51 | 52 | 52 | 53 | 53 | 54 | 54 |
| 9p    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | *  | +  | *  | *  | *  |
| Verde | *  | -  | -  | -  | *  | *  | -  | *  | -  | *  | -  | -  | -  | *  | -  | *  | *  | *  |
| Verm  | *  | -  | -  | -  | *  | *  | -  | *  | -  | *  | -  | *  | -  | *  | -  | *  | *  | *  |
| Aqu   | *  | *  | *  | *  | *  | -  | -  | *  | *  | *  | *  | *  | *  | *  | -  | *  | *  | *  |
|       | 55 | 55 | 56 | 56 | 57 | 57 | 58 | 58 | 59 | 59 | 60 | 60 | 61 | 61 | 62 | 62 | 63 | 63 |
| 9p    | -  | -  | *  | -  | *  | *  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | -  | -  | -  | *  | *  |
| Verde | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | *  |
| Verm  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | *  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | *  | *  |
| Aqu   | *  | *  | *  | *  | *  | *  | -  | -  | -  | -  | *  | *  | *  | *  | *  | -  | -  | *  |



|       | 64  | 64  | 65  | 65  | 66  | 66  | 67  | 67  | 68  | 68  | 69  | 69  | 70  | 70  | 71  | 71  | 72  | 72  |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 9p    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | *   | *   | -   | -   | *   | *   | -   | -   | *   | *   |
| Verde | -   | -   | -   | *   | -   | -   | *   | *   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | *   | *   | -   | -   |
| Verm  | -   | -   | -   | *   | -   | -   | *   | -   | *   | -   | -   | -   | +   | +   | *   | *   | -   | -   |
| Aqu   | -   | -   | -   | *   | -   | -   | *   | -   | *   | -   | -   | -   | +   | +   | *   | *   | -   | -   |
|       | 73  | 73  | 74  | 74  | 75  | 75  | 76  | 76  | 77  | 77  | 78  | 78  | 79  | 79  | 80  | 80  | 81  | 81  |
| 9p    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | +   | *   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | -   |
| Verde | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | *   | -   | -   | -   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Verm  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | *   | -   | -   | -   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Aqu   | *   | *   | *   | -   | -   | *   | *   | *   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | *   | *   |
|       | 82  | 82  | 83  | 83  | 84  | 84  | 85  | 85  | 86  | 86  | 87  | 87  | 88  | 88  | 89  | 89  | 90  | 90  |
| 9p    | *   | *   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | *   | -   | -   | *   | *   | -   | -   |
| Verde | -   | -   | *   | *   | -   | *   | *   | *   | -   | -   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | *   | *   |
| Verm  | -   | -   | *   | *   | -   | *   | *   | *   | -   | -   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | *   | *   |
| Aqu   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | -   | -   | *   | *   | *   | *   | -   | -   | *   | *   |
|       | 91  | 91  | 92  | 92  | 93  | 93  | 94  | 94  | 95  | 95  | 96  | 96  | 97  | 97  | 98  | 98  | 99  | 99  |
| 9p    | -   | *   | -   | *   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | -   | -   | *   | -   | -   | -   |
| Verde | -   | -   | -   | -   | *   | -   | *   | *   | *   | *   | -   | -   | *   | *   | *   | -   | *   | *   |
| Verm  | -   | -   | -   | -   | *   | -   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | *   | *   | *   | -   | *   | *   |
| Aqu   | *   | *   | *   | -   | *   | *   | *   | *   | -   | *   | -   | *   | *   | *   | *   | -   | *   | *   |
|       | 100 | 100 | 101 | 101 | 102 | 102 | 103 | 103 | 104 | 104 | 105 | 105 | 106 | 106 | 107 | 107 | 108 | 108 |
| 9p    | *   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | +   |
| Verde | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | -   |
| Verm  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | *   | -   |
| Aqu   | -   | *   | *   | *   | *   | *   | -   | -   | *   | *   | *   | *   | -   | -   | -   | -   | *   | *   |
|       | 109 | 109 | 110 | 110 | 111 | 111 | 112 | 112 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 9p    | -   | *   | +   | *   | *   | -   | *   | *   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Verde | -   | -   | -   | *   | *   | *   | *   | *   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Verm  | -   | -   | -   | *   | -   | -   | *   | *   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Aqu   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

legenda

\* não avaliável  
ausência de perda ou  
ganho  
- presença de perda ou  
ganho  
+ ganho

## APÊNDICE 3



## ORIGINAL ARTICLE

Vol. 39 (3): 335-343, May - June, 2013  
doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2013.03.06

## Correlation between Beta1 integrin expression and prognosis in clinically localized prostate cancer

José Pontes-Júnior, Sabrina Thalita Reis, Felipe S. Bernardes, Luiz C. N. Oliveira, Érika Aparecida Felix de Barros, Marcos Francisco Dall'Oglio, Luciana M. S. Timosczyk, Leopoldo A. Ribeiro-Filho, Miguel Srougi, Kátia R. M. Leite

Laboratory of Medical Investigation – LIM 55, Urology Department, University of Sao Paulo Medical School (JPJr, STR, FSB, LCNO, MFA, LMST, LARFilho, MS, KRML) and Universidade Nove de Julho (JPJr, LCNO, EAFB), Sao Paulo, Brazil

### ABSTRACT

*Integrins are transmembrane glycoprotein receptors that regulate cell-matrix interactions, thus functioning as sensors from the environment. They also act as cell adhesion molecules that are responsible for the maintenance of the normal epithelial phenotype. Some studies have reported a correlation between carcinogenesis and changes in integrin expression, especially  $\beta 1$  integrin, however its role in prostate cancer (PC) is unclear. The aim of our study was to evaluate the expression of  $\beta 1$  integrin in localized PC and to correlate the pattern of expression with recurrence after surgical treatment. Methods For this case-control study, we retrospectively selected surgical specimens from 111 patients with localized PC who underwent radical prostatectomy. Recurrence was defined as a PSA level exceeding 0.2ng/mL after surgery, and the median follow-up was 123 months. Integrin expression was evaluated by immunohistochemistry in a tissue microarray containing two samples from each tumor. We employed a semiquantitative analysis and considered a case as positive when the expression was strong and diffusely present. Results: There was a loss of 11 cases during the tissue micro array assembling.  $\beta 1$  expression was positive in 79 of the 100 evaluated cases (79%). The univariate and multivariate analyses showed that the negative expression of  $\beta 1$  integrin was associated with biochemical recurrence ( $p = 0.047$ ) and time to recurrence after radical prostatectomy ( $p = 0.023$ ). When  $\beta 1$  was negative, the odds ratio for recurrence was 2.78 times higher than that observed in the positive cases [OR = 2.78,  $p = 0.047$ , IC 95% (1.01-7.66)]. Conclusions: The loss of  $\beta 1$  integrin immune expression was correlated with biochemical recurrence in patients treated with radical prostatectomy for localized PC.*

### ARTICLE INFO

#### Key words:

Prostatic Neoplasms; Cell Adhesion Molecules; Prognosis; Integrins

Int Braz J Urol. 2013; 39: 335-43

Submitted for publication:  
March 14, 2012

Accepted after revision:  
November 30, 2012

### INTRODUCTION

Prostate cancer (PC) is the most common solid cancer and the second leading cause of death in males in western countries (1). Radical prostatectomy (RP) is a method of treating organ-confined tumors that demonstrates good results in large series of patients; however, up to a quarter of them experience biochemical recurrence after surgery (2).

Prior identification of patients with poor prognosis is important in clinical practice in order to improve the treatment outcome. The classic prognostic parameters, such as the Gleason score and serum levels of prostate specific antigen (PSA), can estimate, to some extent, aggressiveness and recurrence but they are often deficient, even when used in combination (3,4). This deficiency is probably due to the heterogeneous nature of PC. Consequently,

the discovery of new markers is necessary to identify those patients with worse prognoses and increased likelihood of tumor recurrence more effectively, which can improve the management of PC patients.

Many aspects of oncogenesis involve changes in intercellular adhesion, and it was shown that altered expression of the cell adhesion molecule (CAM) correlates with invasion and progression in PC and other neoplasms (5-7). Integrins are transmembrane glycoprotein receptors that regulate cell-matrix interactions, thereby functioning as sensors of the environment. These CAMs form heterodimers composed of one  $\alpha$  and one  $\beta$  subunit. Currently, 18  $\alpha$  and 8  $\beta$  subunits have been identified, and different combinations of these subunits are known to dictate both their specificity for the extra cellular matrix (ECM) proteins and their signaling properties.

Integrins have several functions in cell homeostasis that involve the adhesion of cells to the ECM proteins as well to other cells. As receptors, integrins mediate the anchoring and migration of cells via the recognition of various ECM molecules. Moreover, intracellular signals generated by integrins influence gene expression and thus regulate growth, proliferation and survival (8). The existence of alternative splicing forms of the messenger RNA of some integrins further increases the diversity within the integrin family.

Despite the existence of previous research examining  $\beta 1$  integrin in PC, no study to date has evaluated  $\beta 1$  integrin in clinical specimens as a prognostic marker for a clinical outcome. Most prior studies in PC have primarily focused on describing integrin expression rather than on examining its correlations to tumor recurrence or biochemical free survival (9-11). The aim of this case-control study was to assess the expression profile of  $\beta 1$  integrin in surgical specimens of clinically localized PC through the use of immunohistochemistry by utilizing a tissue microarray (TMA), and to evaluate the association between integrin expression and biochemical recurrence following RP.

## MATERIALS AND METHODS

### Case selection

We retrospectively evaluated 954 patients with clinically localized PC who underwent RP

with a curative intention between January 1994 and April 2000, all performed by the same surgeon. For this case-control study, we selected 51 patients with low, intermediate or high risk PC that had biochemical recurrence after surgery (case group). Then, 60 patients without biochemical recurrence ten years after surgery and matched to the first group, according to the PC stratification of risk, were selected as controls.

We stratified the PC patients into three groups of risk according to a combined evaluation of pre operative PSA serum level, pathologic stage and surgical specimen's Gleason score. Low risk PC patients was characterized by PSA level lower than 10ng/mL, Gleason score  $\leq 6$  and pT2a; the risk was intermediate when PSA level was 10 to 20ng/mL, Gleason score 7 and pT2b and higher risk when PSA level was  $\geq 20$ ng/mL, Gleason score  $\geq 8$  and pathologic stage was higher than pT2c. This risk stratification is similar to that one proposed by D'Amico; the difference is the adoption of pathologic stage and Gleason score in our study, which are more reliable in terms of prognostic strength, when compared to the clinical parameters employed in D'Amico criteria (12).

The median follow-up time was 123 months. Regarding race, 97.3% of the patients were Caucasian and 2.7% were Asian. The demographic and clinical data according to recurrence are shown in Table-1.

Tumor recurrence was defined as a PSA level exceeding 0.2ng/mL during follow-up. The tumor-node-metastasis (TNM) staging designations were assigned according to the TNM 2010 classification. All subjects provided informed consent to participate in the study and to allow their biological samples to be analyzed. Approval for the study was given by the Institutional Board of Ethics (n°1074/04).

### Immunohistochemistry

Histological examination of the prostatectomy specimens were performed in formalin-fixed and totally paraffin-embedded sections stained with hematoxylin and eosin. The slides containing the primary tumor for each patient were selected by sampling the area representative of the final pathologic Gleason score. Two areas from each

Table 1 - Demographic and clinical data: recurrence vs. no recurrence.

|                                  | Biochemical recurrence<br>(n = 51) | No biochemical recurrence<br>(n = 60) | P-value         |
|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| <b>Age (years)</b>               |                                    |                                       | <b>0.687 #</b>  |
| Median (Q1 - Q3)                 | 65.0 (60.0 - 68.0)                 | 64.5 (59.2 - 69.0)                    |                 |
| Minimum - Maximum                | 45 - 74                            | 41 - 79                               |                 |
| <b>PSApre (ng/mL)</b>            |                                    |                                       | <b>0.752 ##</b> |
| PSA < 10                         | 30 (58.8%)                         | 39 (65.0%)                            |                 |
| PSA 10-20                        | 15 (29.4%)                         | 16 (26.7%)                            |                 |
| PSA > 20                         | 6 (11.8%)                          | 5 (8.3%)                              |                 |
| <b>Pathologic stage</b>          |                                    |                                       | <b>0.521 ##</b> |
| T2                               | 41 (80.4%)                         | 51 (85.0%)                            |                 |
| T3                               | 10 (19.6%)                         | 9 (15.0%)                             |                 |
| <b>Gleason score</b>             |                                    |                                       | <b>0.095 ##</b> |
| ≤ 6                              | 9 (17.6%)                          | 20 (33.3%)                            |                 |
| = 7                              | 17 (33.3%)                         | 21 (66.7%)                            |                 |
| ≥ 8                              | 25 (49.0%)                         | 19 (31.7%)                            |                 |
| <b>PC stratification of risk</b> |                                    |                                       | <b>0.266 ##</b> |
| Low                              | 6 (11.8%)                          | 10 (16.7%)                            |                 |
| Intermediate                     | 15 (29.4%)                         | 24 (40.0%)                            |                 |
| High                             | 30 (58.8%)                         | 26 (43.3%)                            |                 |

# - Mann-Whitney Test

## - Chi-square test

tumor were marked with permanent ink; these areas were included in the tissue microarray assay (TMA) (13).

The samples underwent a heat antigen retrieval process using citrate buffer (1mM, pH 6.0). The slides were incubated overnight at 4°C with the anti-β1 integrin monoclonal antibody (Dako Cytomation, CA) in a 1:50 dilution. The LSAB system was used for the immunostaining (Dako Cytomation, CA). Color was developed through a reaction with a 3,3'-diaminobenzidine substrate-chromogen solution

The samples underwent a heat antigen retrieval process using citrate buffer (1mM, pH 6.0). The slides were incubated overnight at 4°C with the anti-β1 integrin monoclonal antibody (Dako Cytomation, CA) in a 1:50 dilution. The LSAB system was used for the immunostaining (Dako Cytomation, CA). Color was developed through a reaction with a 3,3'-diaminobenzidine substrate-chromogen solution followed by counterstaining with Harris hemato-

xylin. The slides were dehydrated, coverslipped and observed under a light microscope.

β1 integrin expression was evaluated as positive or negative through immunohistochemistry in a TMA containing two samples from each case. We employed optical microscopy and the expression was considered positive when it was strong and diffusely present in the tumor tissue (i.e., +++). In order to confirm the integrity of the antigen determinants, we also evaluated the expression of PSA and cytokeratin 18 (CK18) in the same TMA. All of the cases positive or negative through immunohistochemistry in a TMA containing two samples from each case. We employed optical microscopy and the expression was considered positive when it was strong and diffusely present in the tumor tissue (i.e., +++). In order to confirm the integrity of the antigen determinants, we also evaluated the expression of PSA and cytokeratin 18 (CK18) in the same TMA. All of the cases were evaluated by a single uropathologist (KRML).



### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 17.0 for Windows (version 17.0.0). All of the reported p-values were two-sided. The Mann-Whitney, Pearson chi-square and Fisher Exact tests were used to explore the bivariate associations between the status of tumor recurrence and other continuous and categorical covariates.

An approximation of the risk association between integrin expression and recurrence was estimated by odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) using unconditional logistic regression analysis. Kaplan-Meier curves were used to illustrate biochemical recurrence free survival. We performed the log-rank test to show differences between the curves.

### RESULTS

The PSA and CK18 expression levels were strongly positive in all cases, confirming that the antigens were preserved in our samples. There was a loss of 11 cases during the TMA assembling. As such,  $\beta 1$  expression was evaluated in a total of 100 cases.

The cases and controls exhibited similar characteristics regarding the D'Ámico stratification of risk, which was the adopted criterion used to ma-

teach the two groups, attesting to the homogeneity of this case control study (Table-1). The mean and median follow-up for the entire sample was 116 and 123 months, respectively.

The  $\beta 1$  integrin was expressed in a non-polarized manner and was mainly located in the cytoplasm and the cell membrane. Positive staining of the  $\beta 1$  integrin was found in 79 cases (79%). The  $\beta 1$  integrin expression profile was compared with classic prognostic factors, such as Gleason score, PSA pre-surgical levels and pathological stage. These results are shown in Tables 2-4.

There was an association between higher pre-surgical PSA levels and the absence of  $\beta 1$  integrin expression ( $p = 0.03$ ). There was no correlation between  $\beta 1$  integrin immune expression and Gleason score or between  $\beta 1$  integrin and pathological stage.

Correlating the expression with biochemical recurrence after surgery, we found that patients with downregulated  $\beta 1$  integrin expression levels had a higher probability of tumor recurrence. Fifty-eight percent of patients whose tumors showed positive  $\beta 1$  integrin were free of recurrence after surgery compared to only 33% of those with negative  $\beta 1$  integrin expression (Table-5). In a univariate analysis, the chance of biochemical recurrence was 2.8 times higher in patients with

**Table 2 -  $\beta 1$  integrin expression according to Gleason score.**

|                    | G 6        | G7         | G8-9       | p-value         |
|--------------------|------------|------------|------------|-----------------|
| $\beta 1$ integrin |            |            |            | 0.120           |
| Positive           | 23 (92.0%) | 27 (79.4%) | 29 (70.7%) |                 |
| Negative           | 2 (8.0%)   | 7 (20.6%)  | 12 (29.3%) | Chi-square test |

**Table 3 -  $\beta 1$  integrin expression according to pathological stage.**

|                    | pT2        | pT3        | p-value           |
|--------------------|------------|------------|-------------------|
| $\beta 1$ integrin |            |            | 0.523             |
| Positive           | 66 (80.5%) | 13 (72.2%) |                   |
| Negative           | 16 (19.5%) | 5 (27.8%)  | Fisher exact test |

Table 4 -  $\beta 1$  integrin expression according to PSA serum level.

| PSA ng/mL          | < 4       | 4-10       | > 10       | p value         |
|--------------------|-----------|------------|------------|-----------------|
| $\beta 1$ integrin |           |            |            | 0.030           |
| Positive           | 7 (87.5%) | 51 (86.4%) | 21 (63.6%) |                 |
| Negative           | 1 (12.5%) | 8 (13.6%)  | 12 (36.4%) | chi-square test |

Table 5 - Univariate analysis: recurrence vs. no recurrence.

|                    | Biochemical recurrence |            | OR   | 95% CI    | p-value         |
|--------------------|------------------------|------------|------|-----------|-----------------|
|                    | yes                    | no         |      |           |                 |
| $\beta 1$ integrin |                        |            |      |           |                 |
| Positive           | 33 (41.8%)             | 46 (58.2%) |      |           |                 |
| Negative           | 14 (66.7%)             | 7 (33.3%)  | 2.79 | 1.01-7.67 | 0.042           |
|                    |                        |            |      |           | Chi-square test |

negative  $\beta 1$  expression [OR = 2.79,  $p$  = 0.042, IC 95% (1.01-7.67)].

The Kaplan-Meier curve of biochemical free survival according to  $\beta 1$  integrin immune expression is shown in Figure-1, which confirms the association between  $\beta 1$  integrin and time to recurrence in localized PC treated with radical prostatectomy. The mean biochemical recurrence free survival time was 112 and 77 months for the positive and negative cases, respectively ( $p$  = 0.023 - Log-Rank test).

In the multivariate analysis, including Gleason score and  $\beta 1$  integrin expression, only  $\beta 1$  integrin remained independently associated with biochemical recurrence after surgery [OR = 2.78,  $p$  = 0.047 IC 95% (1.01-7.66)].

## DISCUSSION

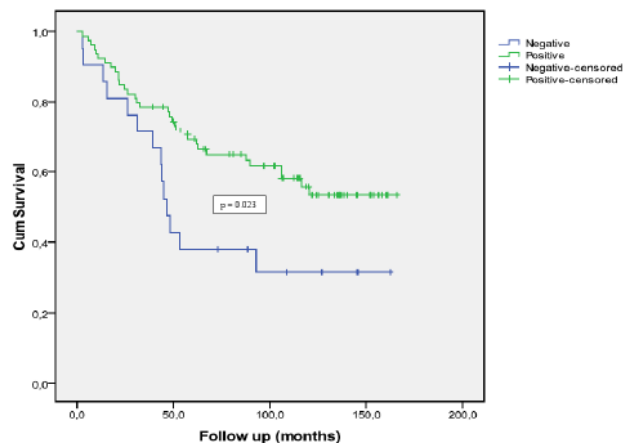
This is the first study in literature to show that the loss of  $\beta 1$  integrin expression was independently associated with biochemical recurrence after RP. The strong points associated with these findings were the extended follow-up, along with the fact that all subjects underwent surgery by the same surgeon and had their integrin expression

evaluated by the same uropathologist. The employment of a TMA for integrin expression analysis also confers homogeneity to our results.

The ability of PC cells to proliferate and invade depends on their interactions with the surrounding cells and the ECM, which is partially mediated by integrins. Alterations of integrin expression have been implicated in many aspects of tumorigenesis, including cell survival, invasion and dissemination, making them potential prognostic markers. In PC, the literature indicates that with the exception of  $\alpha 6$ ,  $\alpha 3$  and  $\beta 1$ , there is a down regulation of most integrins (9,14-17). In two previous publications evaluating primary and metastatic PC to the lymph nodes, we also demonstrated that a globally downregulated expression of integrin expression was a characteristic of PC progression (6,7).

Special attention has been given to  $\beta 1$  integrin and its splice variants because they modulate cell adhesion and migration (18).  $\beta 1$  integrin has a widespread distribution and is known to complex with 10 different  $\alpha$  subunits, which have variable binding specificities for different ECM components. As a result, this integrin may act to either prevent or promote cell migration (19).

**Figure 1 - Kaplan-Meier curve for biochemical recurrence free survival in 111 primary PC patients according to  $\beta 1$  integrin expression. (Log-Rank test  $p = 0.023$ ).**



The consistent  $\beta 1$  expression in PC and other tumor indicates a role of this CAM in carcinogenesis, and also its potential utility as a prognostic marker (9). In kidney cancer, the expression repertoire of  $\beta 1$  integrin was shown to influence the metastatic potential of cancer cells, making them attractive targets for future therapeutic strategies (20).

While there are data suggesting a role of  $\beta 1$  integrin in carcinogenesis, its precise functional role in PC is not well understood (21). Previous studies have indicated that  $\beta 1$  integrin and its splicing variants act by modulating cell adhesion, proliferation and survival (11,22). In vitro data in a PC3 cell line study showed that alterations in  $\beta 1$  integrin expression allowed prostate tumor cells to become more invasive and increased the propensity for metastasis (15).

$\beta 1$  integrin is known to localize in focal contacts and to mediate spreading and cytoskeleton rearrangement in normal cells (16). Furthermore,  $\beta 1$  integrin also promotes the activation of selective signaling pathways that support PC progression. Goel et al. observed reduction of  $\beta 1$  integrin expression from well to poorly differentiated

PC in animal models, suggesting that its loss is a characteristic of PC progression (23).

Chen et al. evaluated  $\beta 1$  integrin expression using immunohistochemistry in 30 PC and 30 controls and found that the loss of expression was associated with a worse prognosis in terms of Gleason score and clinical TNM stage (24). In our study, we did not find a relationship between  $\beta 1$  integrin immune expression and Gleason score or between  $\beta 1$  integrin and pathological stage. However, we did observe a relationship between the absence of  $\beta 1$  integrin expression and higher pre-operative PSA serum levels, which is a well-known prognostic factor.

Conversely, Murant et al. showed that higher  $\beta 1$  integrin expression was associated with lower E-cadherin expression and higher Gleason scores (19). This contradictory finding may be explained by the relatively small sample involving only 40 cases and the specific characteristic of their specimens, which comprised tumor tissues from transurethral resections of prostate. That sample may have represented advanced PC cases, whereas our sample came from localized tumors of patients who underwent surgery with curative intent.

Until now, five  $\beta 1$  integrin splicing variants have been described, however only variants A and C are expressed in the prostate. They have been shown to differentially affect receptor localization and function (22). Variant  $\beta 1C$  normally maintains adhesion and inhibits cell cycle progression, thereby inhibiting cell proliferation and migration (10,22,25). It is expressed by normal prostate tissues and is downregulated in PC; Perlino et al. evaluated 33 PC and 5 normal prostate tissues and observed a down regulation of the mRNA and protein levels of  $\beta 1C$  in 94% and 100% of cancer cases, respectively (21). In contrast, variant A was maintained in PC where its translation rates had increased more than twofold, which supports its role in cell proliferation and cancer cell invasion (21-23).

We did not evaluate  $\beta 1$  variants in our study because we employed an antibody that recognizes the whole  $\beta 1$  repertoire. We may, however, speculate that the loss of  $\beta 1$  that resulted in worse prognosis in our study probably indicates the loss of  $\beta 1C$  variant, leading to the unfavorable clinical outcome observed.

Although previous studies have described alterations in  $\beta 1$  integrin expression in PC, no study to date has explored the expression of  $\beta 1$  integrin in a group of patients who were homogeneously treated and followed for more than 10 years. Moreover, no other study has correlated expression with tumor outcomes. According to our results, although integrin  $\beta 1$  was positively expressed in 79% of our cases, its downregulated expression was associated with worse outcome, indicating a role of this integrin in PC progression. We believe that the loss of  $\beta 1$  expression may be important for both progression and invasion and therefore maybe useful as a prognostic marker in PC.

If confirmed, our results could be applied in clinical practice to improve the prognostic evaluations of patients with PC. In combination with other molecular and biochemical assays, test for integrin  $\beta 1$  immune-expression may help to identify and select patients with greater likelihood of recurrence for adjuvant treatment, thereby leading to improved disease management. At the same time, this assay may spare many patients from unnecessary adjuvant therapies and their associated complications.

We are aware that these conclusions may not apply to other races, such as African descendant men, because our study was comprised mainly by Caucasian patients (97%). In addition, our results should be regarded as hypothesis generating due the retrospective nature, the case control design and the sample size of the present study. Therefore prospective analysis with larger series, employing another method of protein expression evaluation and containing patients of other races are necessary to validate our results.

## CONCLUSIONS

In the present study, we showed that the downregulated expression of  $\beta 1$  integrin was significantly correlated with biochemical recurrence after RP for localized PC and with higher levels of pre-operative PSA; thereby making this integrin a potential marker of prognosis. Analyses of the different  $\beta 1$  integrin isoforms may confirm our initial findings and can help to establish the role of the  $\beta 1$  integrin in PC.

## DISCLOSURE

The study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) process number 2010/19525-8. This study received institutional review board approval by the Ethical Board of the HCFMUSP under the protocol 1074/04.

## ABBREVIATIONS

PC = prostate cancer  
 RP = radical prostatectomy  
 CAM = cell adhesion molecule  
 ECM = extracellular matrix  
 TMA = tissue microarray  
 TNM = tumor-node-metastasis  
 GS: Gleason score

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.



## REFERENCES

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61: 69-90. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2011; 61: 134.
- Potters L, Klein EA, Kattan MW, Reddy CA, Ciezki JP, Rutherford AM, et al.: Monotherapy for stage T1-T2 prostate cancer: radical prostatectomy, external beam radiotherapy, or permanent seed implantation. *Radiother Oncol.* 2004; 71: 29-33.
- Eifler JB, Feng Z, Lin BM, Partin MT, Humphreys EB, Han M, et al.: An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011. *BJU Int.* 2013; 111: 22-9.
- Zaytoun OM, Kattan MW, Moussa AS, Li J, Yu C, Jones JS: Development of improved nomogram for prediction of outcome of initial prostate biopsy using readily available clinical information. *Urology.* 2011; 78: 392-8.
- Albelda SM: Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* 1993; 68: 4-17.
- Pontes-Junior J, Reis ST, Dall'Oglio M, Neves de Oliveira LC, Cury J, Carvalho PA, et al.: Evaluation of the expression of integrins and cell adhesion molecules through tissue microarray in lymph node metastases of prostate cancer. *J Carcinog.* 2009; 8: 3. [Epub]
- Pontes-Júnior J, Reis ST, de Oliveira LC, Sant'anna AC, Dall'oglio MF, Antunes AA, et al.: Association between integrin expression and prognosis in localized prostate cancer. *Prostate.* 2010; 70: 1189-95.
- Slack-Davis JK, Parsons JT: Emerging views of integrin signaling: implications for prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2004; 91: 41-6.
- Goel HL, Li J, Kogan S, Languino LR: Integrins in prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer.* 2008; 15: 657-64.
- Fornaro M, Tallini G, Bofetado CJ, Bosari S, Languino LR: Down-regulation of beta 1C integrin, an inhibitor of cell proliferation, in prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 1996; 149: 765-73.
- Goel HL, Moro L, King M, Teider N, Centrella M, McCarthy TL, et al.: Beta1 integrins modulate cell adhesion by regulating insulin-like growth factor-II levels in the microenvironment. *Cancer Res.* 2006; 66: 331-42.
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al.: Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA.* 1998 16; 280: 969-74.
- Fedor HL, De Marzo AM: Practical methods for tissue microarray construction. *Methods Mol Med.* 2005; 103: 89-101.
- Knox JD, Cress AE, Clark V, Manriquez L, Affinito KS, Dalkin BL, et al.: Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am J Pathol.* 1994; 145: 167-74.
- Dedhar S, Saulnier R, Nagle R, Overall CM: Specific alterations in the expression of alpha 3 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in highly invasive and metastatic variants of human prostate carcinoma cells selected by in vitro invasion through reconstituted basement membrane. *Clin Exp Metastasis.* 1993; 11: 391-400.
- Goel HL, Alam N, Johnson IN, Languino LR: Integrin signaling aberrations in prostate cancer. *Am J Transl Res.* 2009; 1: 211-20.
- Okegawa T, Li Y, Pong RC, Hsieh JT: Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol.* 2002; 167: 1836-43.
- Cress AE, Rabinovitz I, Zhu W, Nagle RB: The alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in human prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 1995; 14: 219-28.
- Murant SJ, Handley J, Stower M, Reid N, Cussenot O, Maitland NJ: Co-ordinated changes in expression of cell adhesion molecules in prostate cancer. *Eur J Cancer.* 1997; 33: 263-71.
- Oertl A, Relja B, Makarevic J, Weich E, Höfler S, Jones J, et al.: Altered expression of beta1 integrins in renal carcinoma cell lines exposed to the differentiation inducer valproic acid. *Int J Mol Med.* 2006; 18: 347-54.
- Perlino E, Lovecchio M, Vacca RA, Fornaro M, Moro L, Di-tonno P, et al.: Regulation of mRNA and protein levels of beta1 integrin variants in human prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 2000; 157: 1727-34.
- Moro L, Perlino E, Marra E, Languino LR, Greco M: Regulation of beta1C and beta1A integrin expression in prostate carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 1692-702.
- Goel HL, Breen M, Zhang J, Das I, Aznavoorian-Cheshire S, Greenberg NM, et al.: beta1A integrin expression is required for type 1 insulin-like growth factor receptor mitogenic and transforming activities and localization to focal contacts. *Cancer Res.* 2005; 65: 6692-700.
- Chen HJ, Wang H, Zhang L, Zhang YK, Wang GM: Correlation between integrin subunits alpha5 and beta1 expressions in prostate cancer and its clinical implication. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2006; 12: 148-50.
- Meredith J Jr, Takada Y, Fornaro M, Languino LR, Schwartz MA: Inhibition of cell cycle progression by the alternatively spliced integrin beta 1C. *Science.* 1995 15; 269: 1570-2.

## Correspondence address:

Dr. José Pontes Jr.  
Faculdade de Medicina da USP  
Av. Dr. Arnaldo 455, 2º andar, CJ 2145  
Sao Paulo, SP, 01246-903, Brazil  
Phone/Fax: + 55 11 3061-7183  
E-mail: docjpr@uol.com.br

## EDITORIAL COMMENT

This is an elegant case-control study done in 111 patients from a cohort of almost 1000 patients underwent Radical prostatectomy to treat localized prostate cancer (PC).

Nowadays the immunohistochemical analysis are performed in several places with acceptable costs. Then if this results be reproduced by other groups or validated externally, this new marker integrine could became a valuable tool in defining

prognostic in localized PC patients, like as in breast cancer, currently (1).

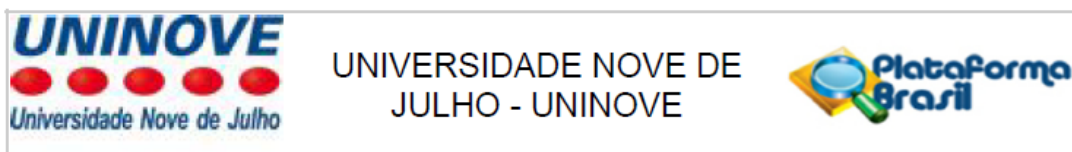
Unfortunately in this series there were not black or mulato patients. We do not know if the racial factors can influence this marker's expression. I think that this marker could be tested in large multicentric cohorts containing Black and mulatos patients, as is the racial distribution in Brazil. In several series, worldwide, Black men and Afro descendants with PC present worst outcomes than the Caucasian ones (2-5).

## REFERENCES

1. Hammond ME: ASCO-CAP guidelines for breast predictive factor testing: an update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011; 19: 499-500.
2. Chornokur G, Dalton K, Borysova ME, Kumar NB: Disparities at presentation, diagnosis, treatment, and survival in African American men, affected by prostate cancer. *Prostate*. 2011; 71: 985-97.
3. Freedland SJ, Isaacs WB: Explaining racial differences in prostate cancer in the United States: sociology or biology? *Prostate*. 2005; 62: 243-52.
4. Nardi AC, dos Reis RB, Zequi Sde C, Nardozza A Jr: Comparison of the epidemiologic features and patterns of initial care for prostate cancer between public and private institutions: a survey by the Brazilian Society of Urology. *Int Braz J Urol*. 2012; 38: 155-64; discussion 164-6.
5. Kheirandish P, Chinegwundoh F: Ethnic differences in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2011; 105: 481-5.

*Dr. Stênio de Cássio Zequi*  
 Membro Titular Sociedade Brasileira de Urologia  
 Mestre e Doutor em Oncologia-Fundação Antônio Prudente-  
 SP  
 Rua Batataes, 391 - 4o. andar  
 Jardim Paulista, SP, 01423-010, Brazil  
 E-mail: steniozequi@uol.com.br

## ANEXO 1



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise e correlação prognóstica das alterações citogenéticas dos cromossomos 3, 7, 9 e 17 no câncer de próstata localizado tratado com cirurgia

**Pesquisador:** JOSE PONTES JUNIOR

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.  
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

**Versão:** 3

**CAAE:** 03222612.1.0000.5511

**Instituição Proponente:** Universidade Nove de Julho - UNINOVE

**Patrocinador Principal:** Universidade Nove de Julho - UNINOVE

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 206.920

**Data da Relatoria:** 18/02/2013

#### Apresentação do Projeto:

**Introdução:** O câncer de próstata (CaP) é o tumor não cutâneo mais frequente e a segunda causa de óbito por câncer em homens no Brasil, encontrando-se atrás apenas do câncer de pele não-melanoma. Em 2009 causou 12.274 óbitos e a estimativa para 2012 é de 60.180 novos casos (INCA, 2012). A incidência apresenta variações regionais e raciais, provavelmente, devido a condições genéticas e alimentares distintas entre os grupos, sendo em média seis vezes maior em países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento.

A idade, o estilo de vida e a hereditariedade são os principais fatores de risco para esta neoplasia. Estudos mostram que a existência do tumor em indivíduos com menos de 40 anos é exceção; ocorrendo aumento de incidência após os 50 anos de idade. O consumo energético elevado e a maior ingestão de carne vermelha e gordura animal tem sido também relacionado à maior chance de desenvolvimento do CaP. A presença de antecedente familiar é fator de risco para o CaP; pai ou irmão com tumor aumenta o risco individual em 3 a 10

vezes. No entanto, apenas cerca de 10-15% dos tumores de próstata diagnosticados são hereditários, os quais se caracterizam por diagnóstico em idade mais precoce quando comparados aos tumores esporádicos. Com o advento do antígeno específico prostático (PSA) e dos programas

**Endereço:** VERGUEIRO nº 235/249

**Bairro:** LIBERDADE

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3385-9059

**CEP:** 01.504-001

**E-mail:** comitedeetica@uninove.br



UNIVERSIDADE NOVE DE  
JULHO - UNINOVE



de rastreamento para diagnóstico precoce, houve uma mudança no estágio em que estes tumores eram diagnosticados, sendo atualmente mais frequentes os casos de tumor órgão confinado, passível de cura com o tratamento cirúrgico ou radioterápico, em contraposição à preponderância, no passado, de tumores localmente avançados. Apesar da evolução dos métodos diagnósticos e, consequentemente, do aumento da detecção precoce, ainda resta o desafio da definição exata do comportamento biológico do CaP, que é amplamente variável. O comportamento heterogêneo do CaP é exemplificado pela história natural incerta: enquanto alguns têm evolução indolente e não necessitam de tratamento, outros apresentam doença agressiva, com progressão independente da forma de tratamento adotado. Esta variabilidade de apresentação do CaP denota a importância da caracterização

prognóstica para a tomada de decisões em pacientes portadores deste tumor. Parâmetros como estágio clínico e patológico, o escore de Gleason e os níveis séricos de Antígeno Específico da Próstata (PSA) são convencionalmente utilizados como marcadores de prognósticos em pacientes com CaP. Porém tais fatores são imperfeitos, mesmo quando avaliados em conjunto, para a determinação prognóstica individual. A prostatectomia radical e a radioterapia são as opções para o tratamento curativo dos tumores localizados, entretanto até 25% dos pacientes apresentam recidiva após o tratamento (Potters, 2004). A recorrência tumoral pode decorrer de excisão local incompleta, do sub-estádio clínico, do crescimento de micrometástases pré-existentes ou mesmo da maior agressividade tumoral. Portanto, a identificação de pacientes com pior prognóstico é fundamental para a prática urológica, especialmente para determinar a necessidade de tratamentos adicionais. Postula-se que a identificação prévia dos pacientes com maior potencial de recorrência possibilitaria a indicação de tratamento adjuvante precoce, com consequente melhora do resultado do tratamento.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Identificar as alterações citogenéticas nos cromossomos 3, 7, 17 e 9p21 no Câncer de Próstata localizado submetido à prostatectomia radical com intuito curativo através da técnica de FISH.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Como a pesquisa envolve apenas estudo de prontuário, de blocos de parafina e de material parafinado do banco de tumores, inexistirá risco para os pacientes a serem estudados. O estudo também não causará nenhuma mudança no tratamento que os

pacientes recebem no seu acompanhamento pós-operatório. O material biológico a ser utilizado será devolvido ao laboratório de patologia do Hospital Sírio Libânies. A manipulação do material biológico não oferece riscos à saúde dos pesquisadores, sendo que serão tomadas as medidas de precaução universal de estudo em laboratório

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3385-9059

E-mail: comitedeetica@uninove.br



UNIVERSIDADE NOVE DE  
JULHO - UNINOVE



**Benefícios:**

A pesquisa tem o potencial de estabelecer novo marcador de câncer de próstata.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se do projeto de Mestrado da pós-graduanda Erika Aparecida Felix de Barros, sob orientação do pesquisador responsável. Consta anexada declaração da diretora científica, Dra. Katia R. M. Leite, assinada em 18 de abril de 2012, confirmando ciência e autorizando o uso da infraestrutura do laboratório de Patologia Cirúrgica do Hospital Sírio Libanes para a consecução dos propósitos da pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

os pesquisadores apresentaram o TCLE que deverá ser assinado por todos os sujeitos de pesquisa

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

os pesquisadores fizeram as alterações pedidas.

SAO PAULO, 27 de Fevereiro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Stella Regina Zamuner**  
(Coordenador)

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9059

E-mail: comitedeetica@uninove.br



## ANEXO 2



## PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E  
ESCLARECIDODADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL  
LEGAL

1. NOME: .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO .....  
Nº ..... APTO: ..... BAIRRO: .....  
CIDADE .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: .....  
Nº ..... APTO: ..... BAIRRO: .....  
CIDADE: .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

## DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“Análise e correlação prognóstica das alterações citogenéticas dos cromossomos 3, 7, 9 e 17 no câncer de próstata localizado tratado com cirurgia.”**

PESQUISADOR : **Dr. José Pontes Junior**

**CARGO/FUNÇÃO:** Médico Assistente HCFMUSP, Pesquisador do Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia – LIM/55, docente do programa do Mestrado em Medicina e disciplina de urologia para a graduação em Medicina da UNINOVE.

**INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº 85241**

## 1. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

|              |                                     |             |                          |
|--------------|-------------------------------------|-------------|--------------------------|
| RISCO MÍNIMO | <input type="checkbox"/>            | RISCO MÉDIO | <input type="checkbox"/> |
| RISCO BAIXO  | <input checked="" type="checkbox"/> | RISCO MAIOR | <input type="checkbox"/> |

## 2. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

O senhor está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa cujo objetivo é avaliar um novo marcador de diagnóstico ou prognóstico do câncer de próstata. O diagnóstico do câncer de próstata só é confirmado através de uma biópsia, um método invasivo que apresenta complicações e altas taxas de resultados falsos. Além disso, sabemos que nem todos os tumores de próstata se comportam de forma igual, alguns são mais agressivos que outros e ainda não existem exames que possam dizer ao médico qual paciente terá um tumor mais agressivo ou não, portanto o objetivo deste trabalho é tentar encontrar alterações que ajudem na descoberta e no tratamento do câncer de próstata.

O trabalho será realizado utilizando parte do tecido que foi retirado durante a sua cirurgia, não acarretará nenhum prejuízo a sua pessoa ou ao próprio material que continuará preservado para seu interesse futuro.

Não será necessário fazer nenhum procedimento adicional. Portanto esta pesquisa não lhe traz nenhum desconforto e nenhum risco. Não há benefício direto para o senhor, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para os pacientes. Como não há procedimentos adicionais a serem feitos, não existem procedimentos alternativos.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. **José Pontes Junior**, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255- 7º andar sala 710-F, Telefone (011) 3069 – 8080. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua. Vergueiro nº 235/249 – Liberdade – SP CEP. 01504-001 -1º andar. Telefone: (11) 3385-9059

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: : **“Análise e correlação prognóstica das alterações citogenéticas dos cromossomos 3, 7, 9 e 17 no câncer de próstata localizado tratado com cirurgia.”**

Eu discuti com o Dr. **José Pontes Junior** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

-----

Assinatura do paciente/representante  
legal

Data      /      /



-----  
Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Dr. José Pontes Junior  
(responsável pelo estudo)

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### ANEXO 3



Certic#7229553

#### Laboratório de Patologia Cirúrgica de São Paulo

Hospital Sírio Libanês  
Rua D. Adma Jafet 91  
01308-050 São Paulo  
Tel. 11 31550249

#### DECLARAÇÃO

Declaro que estou ciente do projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE E CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS DOS CROMOSSOMOS 3, 7, 9p E 17 NO CÂNCER DE PRÓSTATA LOCALIZADO TRATADO COM CIRURGIA" de responsabilidade da aluna de mestrado Erika Aparecida Felix de Barros que tem como orientador o Dr. José Pontes Junior, e que o Laboratório de Patologia Cirúrgica de São Paulo disponibilizará todos os materiais biológicos, equipamentos e reagentes necessários para a realização dos testes referentes ao projeto. Também afirmamos que a nossa infra-estrutura laboratorial está capacitada a realizar os exames supracitados, e que a execução dos mesmos se baseará nas normas das melhores práticas de laboratório.

São Paulo, 18 de abril de 2012

Profs. Dra. Katia Ramos Moreira Leite  
Diretora Científica