UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

RENAN AUGUSTO PEREIRA

**Expressão de ciclina D1 em adenocarcinoma de próstata utilizando a técnica
de imunohistoquímica.**

RIBEIRÃO PRETO

2013

RENAN AUGUSTO PEREIRA

Expressão de ciclina D1 em adenocarcinoma de próstata utilizando a técnica de imunohistoquímica.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na secretaria do Departamento de Patologia e Medicina Legal FMRP-USP.

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Silva Costa.

Co-Orientador: Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva.

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Cuan Ravinal.

Ribeirão Preto

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pereira, Renan Augusto

Expressão de Ciclina D1 em Adenocarcinoma de Próstata Utilizando a Técnica de Imunohistoquímica. Ribeirão Preto, 2013.

66 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Costa, Roberto Silva.

1. Próstata. 2. Ciclina D1. 3. Patologia. 4. Urologia

DEDICATÓRIA

À minha esposa Flávia, pelo carinho, amor, paciência e companheirismo inigualáveis durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Lupércio e Izabel, pela compreensão, apoio, carinho e força durante toda esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Silva Costa, pela orientação e ensinamentos, além de toda confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva, pela brilhante co-orientação, pela atenção e paciência, e por todo incentivo durante a realização deste trabalho.

À Doutora Marcela Lima Sampaio, pelo apoio, ajuda e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Patologia Renal da FMRP-USP, Flávio Henrique Leite e Guilherme De Paula Lemos, pela colaboração na realização deste trabalho e sobretudo pela amizade, pelos momentos de reflexão e descontração.

À secretária Camila Luca Zambonini Gímenes, por toda atenção e orientações no decorrer desse trabalho.

PEREIRA, R.A. **Expressão de ciclina D1 em adenocarcinoma de próstata utilizando a técnica de imunohistoquímica.** Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

RESUMO

PEREIRA, R.A. **Expressão de ciclina D1 em adenocarcinoma de próstata utilizando a técnica de imunohistoquímica.** 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O câncer de próstata é o tumor maligno mais freqüente nos homens com idade superior a 50 anos, excetuando-se os tumores cutâneos. No Brasil estima-se para o ano de 2012 cerca de 60.180 casos novos deste tipo de neoplasia. Os marcadores tumorais permitem fazer o rastreamento do câncer, o diagnóstico diferencial entre uma neoplasia benigna e maligna, a avaliação de prognóstico e o acompanhamento terapêutico, assim como a detecção da recidiva tumoral. Dentre estes marcadores tumorais, tem-se dado muito atenção para as proteínas que mediam e participam da progressão do ciclo celular. A ciclina D1 é uma proteína nuclear de vida curta que é destruída pela via da ubiquitina ATP dependente, e está envolvida na transição celular da fase do ciclo G1 (repouso) para a fase S (síntese) tanto em células normais como em células neoplásicas. A super expressão de ciclina D1 remove a regulação normal do ciclo celular causando proliferação celular descontrolada, um crescimento anormal dos tecidos e a transformação para um fenótipo neoplásico, atuando como oncogene. No presente trabalho foi estudado a expressão de ciclina D1 em adenocarcinomas de próstata, tendo como objetivo avaliar a relação desta proteína com parâmetros epidemiológicos, clínicos e histopatológicos. Adicionalmente também foi feita comparação de escore de Gleason e lateralidade tumoral entre biópsias prostáticas com agulha e de prostatectomias radicais. No ensaio para ciclina D1 foram analisados 85 casos através de imunoistoquímica (IHQ) de material proveniente de prostatectomias radicais diagnosticados com adenocarcinoma de próstata entre os anos de 2005 e 2010 em nosso serviço. O método de avaliação se utilizou de microscopia ótica comum e contagem semi-quantitativa, comparado-se a expressão com achados clínicos, epidemiológicos e

histopatológicos utilizando-se Teste T de Fisher, Qui Quadrado, Mann-Whitney, Curva ROC e correlação de Spearman. Os resultados demonstraram correlação positiva de ciclina D1 com escore de Gleason ($p < 0,05$), com volume prostático ($p = 0,01$) e uma tendência a correlação positiva com invasão perineural ($p = 0,07$). Não houve correlação estatística entre ciclina D1 e o aumento de PSA, assim como outros achados histopatológicos. As biópsias prostáticas com agulha apresentaram subestimação em 40% dos casos para escore de Gleason e de 62,3% dos casos para lateralidade tumoral quando comparadas a prostatectomia radical. Já que as taxas de subestimação de escore de Gleason e lateralidade tumoral são relativamente altas e visto a urgência em se padronizar novos biomarcadores para o câncer prostático, sugerimos que ciclina D1 pode ser utilizada como biomarcador em patologia cirúrgica da próstata auxiliando numa gradação histológica mais precisa em biópsias com agulha colaborando para melhor vigilância e escolha terapêutica.

Palavras-chave: Próstata. Adenocarcinoma. Ciclina D1.

ABSTRACT

PEREIRA, R.A. **Cyclin D1 expression in prostate adenocarcinoma using immunohistochemistry**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Prostate cancer is the most common malignant tumor in men older than 50 years, except for skin tumors. In Brazil it is estimated for the year 2012 about 60,180 new cases of this type of neoplasm. Tumor markers allow to cancer screening, differential diagnosis between a benign and malignant, assessment of prognosis and therapeutic monitoring, and detection of tumor recurrence. Among these tumor markers, has been given much attention for proteins that mediate and participate in cell cycle progression. Cyclin D1 is a short-lived nuclear protein that is destroyed by the ATP ubiquitin dependent pathway, and is involved in the transition of cell cycle G1 phase (resting) to the S phase (synthesis) cells both in normal and neoplastic cells. The overexpression of cyclin D1 removes the normal regulation of cell cycle causing uncontrolled cell proliferation, abnormal growth of tissues and transformation to a neoplastic phenotype, acting as an oncogene. In the present work we studied the expression of cyclin D1 in prostate adenocarcinomas, and to evaluate the relationship of this protein with epidemiologic factors, clinical and histopathological features. Additionally comparison was also made of Gleason score and laterality between tumor biopsies and prostate needle radical prostatectomies. In the assay for cyclin D1 were 85 cases analyzed by immunohistochemistry (IHC) of material from radical prostatectomies diagnosed with prostate adenocarcinoma between the years 2005 and 2010 at our institution. The evaluation method utilized were light microscopy and semi-quantitative score, comparing the cyclin D1 expression with clinical, epidemiological and histopathological features using Fisher's exact test, chi square test, Mann-Whitney test, ROC curve and Spearman correlation. The results showed a positive correlation of cyclin D1 with Gleason score ($p < 0.05$), prostate volume ($p = 0.01$) and a trend toward positive correlation with perineural invasion

($p = 0.07$). There was no statistical correlation between cyclin D1 and increased PSA, as well as other histopathologic features. Prostate needle biopsies showed underestimation in 40% of cases for Gleason score and 62.3% of cases for tumor laterality when compared to radical prostatectomy. Since the rates of underestimation of Gleason score and tumor laterality are relatively high and the urgency to standardize new biomarkers for prostate cancer, we suggest that cyclin D1 may be used as biomarkers in surgical pathology of the prostate assisting more accurate histological grading in needle biopsies and collaborating for better surveillance and therapeutic choice.

Keywords: Prostate. Adenocarcinoma. Cyclin D1.

LISTA DE SIGLAS

ATA	Atrofia acinar
BaG	Biópsia com Agulha
CaP	Adenocarcinoma de Próstata
CCND1	Ciclina D1
CCND1-	Ciclina D1 negativo
CCND1+	Ciclina D1 positivo
Cdks	Ciclina quinase-dependente
Cdksi	Inibidores de ciclina quinase-dependentes
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IHQ	Imunoistoquímica
PIN	Lesão Intra-epitelial Prostática
PR	Prostatectomia Radical
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PSA	Antígeno Prostático Específico
TR	Toque Retal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Epidemiologia do câncer de próstata	14
1.2	Anatomia e histologia da próstata	15
1.3	Adenocarcinoma da próstata	16
1.4	Diagnóstico do adenocarcinoma de próstata	17
1.5	Marcadores tumorais e ciclina D1	20
1.6	Câncer de próstata e ciclina D1	22
2	OBJETIVOS	25
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
3.1	Amostra	28
3.2	Ensaio imunoistoquímico para ciclina D1	28
3.3	Análise das lâminas	31
3.4	Análise estatística	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Resultados do ensaio com ciclina D1	34
4.2	Resultados da comparação entre biópsias e prostatectomia radical	41
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Câncer de Próstata

O câncer de próstata é a neoplasia maligna visceral mais comum em homens, e a incidência tende a crescer nas próximas décadas com o aumento da expectativa de vida (POMPOE, 2007;NASSIF;TAMBARA FILHO;PAULA;TAGUCHI *et al.*, 2009). Aproximadamente são diagnosticados 543 mil novos casos de câncer de próstata por ano no mundo, representando cerca de 15,3% de todos os casos de câncer incidentes em países desenvolvidos e 4,3% em países em desenvolvimento (GOMES;REBELLO;DE ARAUJO e DO NASCIMENTO, 2008). No Brasil estima-se para o ano de 2012 cerca de 60.180 casos novos deste tipo de neoplasia. A sobrevida média num intervalo de cinco anos é de 64% para países desenvolvidos e de 41% para países considerados em desenvolvimento, com média global de 58%. A taxa de mortalidade entre os anos de 2007 e 2009 foram aproximadamente de 13,57 casos para cada 100 mil homens em todo o país, e o número de mortes causadas por câncer de próstata em 2010 foi de 12.778 indivíduos (GOMES;REBELLO *et al.*, 2008;NASSIF;TAMBARA FILHO *et al.*, 2009;INCA, 2011). O fator de risco de maior relevância é idade avançada, além de fatores étnicos e genéticos. Estima-se que a incidência de câncer de próstata chegue aproximadamente 30% a 50% em homens com idade igual ou superior 50 anos, e aumente progressivamente, chegando a uma taxa de 80% em homens com idade igual ou superior a 80 anos. As taxas de incidência mais elevadas do mundo se encontram em países considerados desenvolvidos, tais como Estados Unidos e França, enquanto que as taxas mais baixas se encontram em países em desenvolvimento e países asiáticos (SIMARD;DUMONT;SOUCY e LABRIE, 2002;MARSHALL, 2012). Embora fatores genéticos sejam apontados como causa principal de tais diferenças entre países, fatores ambientais também parecem estar envolvidos. Mudanças alimentares embora não muito esclarecidas, são apontadas como principal fator sócio-ambiental (DUNN e KAZER, 2011;MARSHALL, 2012). História familiar de câncer de próstata também é considerado fator de risco, aumentando em até duas vezes o risco quando o paciente tem parentesco de primeiro grau portador da doença. A raça também é considerada um fator de risco

relevante (EPSTEIN, 2004;BILLIS, 2007;DUNN e KAZER, 2011). Negros americanos possuem taxas de incidência de câncer de próstata mais elevadas e maior risco de doença metastática e, de acordo com Billis e outros estudos, tal predisposição também é evidenciada no Brasil (BRAWER;CRAWFORD;FOWLER;LUCIA *et al.*, 2000; PASCHOALIN;MARTINS; PASTORELLO; SANDIS *et al.*, 2003; BILLIS, 2007; DUNN e KAZER, 2011). Embora os mecanismos envolvidos na predisposição étnica permaneçam obscuros, o acesso ao sistema de saúde, educação e outros fatores socioeconômicos e ambientais estão fortemente relacionados (DUNN e KAZER, 2011;NARDI;REIS;ZEQUI SDE e NARDOZZA, 2012). Dados epidemiológicos sugerem que mais homens morreram *com* câncer de próstata do que *pelo* câncer de próstata, devido ao grande aumento na expectativa de vida e que aumenta a preocupação das autoridades em saúde (FOSTER e KE, 1997;SROUGI, 2003;EPSTEIN;AMIN;BOCCON-GIBOD;EGEVAD *et al.*, 2005;POMPOE, 2007; DUNN e KAZER, 2011).

1.2 Anatomia e Histologia da Próstata

A próstata é uma glândula retroperitoneal localizada entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal. Encontra-se posteriormente a sínfise púbica, anteriormente ao reto e inferiormente à bexiga urinária. Sua forma é cônica e circunda a uretra proximal à medida que se conecta ao colo vesical. Uma próstata normal apresenta aproximadamente 20g e mede cerca de 4cm no eixo transversal ao nível da base, 3cm no eixo vertical e 2cm no anteroposterior, podendo variar com a idade. Sua função primária é secretar um fluido alcalino que forma parte do ejaculado, e que irá auxiliar na motilidade e nutrição do espermatozoide. A glândula é composta por estroma e parênquima glandular firmemente envolvido por uma pseudo-cápsula, sendo a face interior desta composta de uma camada fina de músculo liso e colágeno. A divisão da próstata é citada de várias formas e pode ser feita através de lobos laterais, anterior, posterior e mediano; divisão em

glândulas internas e externas; e divisão em zonas de transição, zona central e zona periférica, sendo esta última classificação a mais utilizada nos dias de hoje (BILLIS, 2007; DUNN e KAZER, 2011; LEE; AKIN-OLUGBADE e KIRSCHENBAUM, 2011).

Histologicamente, a próstata se apresenta como um órgão tubuloalveolar composto, com espaços glandulares que variam de tamanhos ora pequenos, ora grandes e revestidos por epitélio. Estas glândulas são constituídas de ácinos e ductos excretórios revestidos por células secretoras cúbicas ou cilíndricas altas, com núcleo em posição basal. Em muitas áreas há o aparecimento de pequenas invaginações papilares do epitélio, e próximo ou junto à uretra os ductos prostáticos são revestidos de urotélio. Todas as glândulas apresentam uma membrana basal distinta e são separadas por um estroma fibromuscular abundante. As células basais são responsáveis pela proliferação e são independentes de hormônios androgênicos, enquanto que as células secretoras dependem de estimulação androgênica (KUMAR, 2005; BILLIS, 2007; LEE; AKIN-OLUGBADE *et al.*, 2011).

1.3 Adenocarcinoma da Próstata

Com etiologia considerada indeterminada, o tipo de câncer de próstata mais incidente é o adenocarcinoma de próstata (CaP), que tem origem nos ácinos prostáticos e, se desenvolve com maior frequência na região periférica da glândula, na região posterior tornando-se palpável ao toque retal (TR) (EPSTEIN, 2004; POMPOE, 2007; LEE; AKIN-OLUGBADE *et al.*, 2011). Quanto ao comportamento biológico é classificado como carcinoma clínico e carcinoma latente. O carcinoma clínico é caracterizado pelo tumor que se não tratado irá evoluir para doença extraprostática e/ou metástases, e o carcinoma latente é o carcinoma histológico que não evolui para a forma clínica ou evolui mais lentamente (MOSTOFI; DAVIS e SESTERHENN, 1992; WHITMORE, 1994; BILLIS, 2007). Macroscopicamente o CaP se apresenta como um nódulo endurecido

ocasionado geralmente pela abundante presença de estroma fibroso de caráter cirroso, embora tal achado possa se fazer ausente, caracterizando uma lesão medular sem presença de nódulo endurecido (BILLIS, 2007). Histologicamente o CaP é caracterizado por lesões histológicas bem definidas e facilmente visíveis (EPSTEIN, 1995). As glândulas neoplásicas são comumente menores, com exceção de casos de câncer de próstata macroacinar, onde o desarranjo e as atipias são pouco freqüentes. Quase sempre amontoadas e não possuindo invaginações, os ácinos neoplásicos possuem como principal característica a ausência da camada de células basais, além de núcleos aumentados e nucléolos evidentes (EPSTEIN, 2004;BILLIS, 2007). Em aproximadamente 80% dos casos de CaP há presença concomitante de Lesão Intraepitelial Prostática (PIN). PIN é considerado uma lesão precursora de malignidade, caracterizada pela presença de células atípicas com nucléolos evidentes e núcleos volumosos, em ácinos que apresentam a camada basal preservada (BOSTWICK e BRAWER, 1987;BOSTWICK;AMIN;DUNDORE;MARSH *et al.*, 1993;BILLIS, 2007). A disseminação do CaP acontece por via direta ou através das correntes sanguíneas e linfáticas. Na extensão local é mais comum o acometimento de vesícula seminal, base da bexiga, uretra, colo e trígono vesical, podendo também ocorrer infiltração nos espaços perineurais. Há freqüente disseminação linfática de CaP, assim como disseminação hematogênica podendo resultar em metástases tumorais que geralmente acometem ossos do esqueleto axial com raros casos de acometimento visceral (POTTER;EPSTEIN e PARTIN, 2000;BILLIS, 2007). A ocorrência de metástases ósseas acomete cerca de 65% a 75% dos casos de CaP, e se apresentam como proliferações osteoblásticas (MOSTOFI;DAVIS *et al.*, 1992;BILLIS, 2007).

1.4 Diagnóstico do Adenocarcinoma de Próstata

A maioria dos pacientes com CaP são assintomáticos, principalmente nos estágios iniciais da doença. Estima-se que dentre nove pacientes com CaP apenas um irá apresentar sintomas. Os sintomas, também comuns em casos de

hiperplasia prostática benigna (HPB), geralmente se apresentam na forma de distúrbios no trato urinário inferior, tais como dificuldades para expelir a urina, jato fraco, aumento do número de micções e incontinência urinária. É essencial um completo exame histórico e físico destes homens, que devem também ser questionados sobre presença de hematúria, disfunção erétil e hematoespermia. Pacientes com doença avançada podem apresentar dores nos quadris, dorso e na pelve causadas por doença óssea metastática (DUNN e KAZER, 2011; INCA, 2011).

A determinação do escore de Gleason em biópsia guiada por ultrassonografia transretal, juntamente com dosagem sérica do Antígeno Prostático Específico (PSA) e toque retal são considerados os parâmetros atuais mais usados para predizer o risco da doença confinada ao órgão (COOKSON; FLESHNER; SOLOWAY e FAIR, 1997; BRAWER, 1999; BRAWER; CRAWFORD *et al.*, 2000; CHUN; STEUBER; ERBERSDOBLER; CURRLIN *et al.*, 2006; POMPOE, 2007; SCHRODER, 2009; KULKARNI; VALSANGKAR; JADHAV e SINGH, 2011).

O escore de Gleason, a classificação mais utilizada em todo mundo e recomendada pelos Estados Unidos, é considerado fator de grande impacto na decisão terapêutica e representa um fator importante em predizer doença não confinada ao órgão, progressão e sobrevida de pacientes com CaP submetidos a prostatectomia radical (PR), havendo também grande correlação entre o escore e o comportamento biológico do tumor (KOONTZ; TSIVIAN; MOURAVIEV; SUN *et al.*, 2012; LUGHEZZANI; GALLINA; LARCHER; BRIGANTI *et al.*, 2012). O escore de Gleason é obtido através da análise da arquitetura glandular em relação ao estroma adjacente não se considerando as atipias nucleares. Possui variação de 1 a 5, onde a soma dos dois padrões tumorais mais predominantes resultará no escore final (LEE; AKIN-OLUGBADE *et al.*, 2011; FINE; AMIN; BERNEY; BJARTELL *et al.*, 2012).

Tem sido apontado que espécimes prostáticos provenientes de biópsia com agulha (BaG) apresentam escore de Gleason comumente menor com relação à PR. Estima-se que mais de 50% apresentem escore de Gleason menor em relação à PR (COOKSON; FLESHNER *et al.*, 1997; BRAWER; CRAWFORD *et*

al., 2000;KULKARNI;VALSANGKAR *et al.*, 2011). Outros estudos demonstraram que cerca de 40% dos homens diagnosticados com tumores de baixo grau por BaG terão como diagnóstico final tumores de alto grau (BOSTWICK, 1994;GREGORI;VIEWEG;DAHM e PAULSON, 2001;CAM;YUCEL;TURKERI e AKDAS, 2002).

O PSA é uma protease sérica da família das Calicreínas, produzida pela próstata e que cliva e liquefaz o coágulo seminal após a ejaculação (EPSTEIN, 2004). Foi implantada na clínica desde 1980 e é largamente utilizada para diagnóstico precoce de CaP assintomático (GRETZER e PARTIN, 2003;DUNN e KAZER, 2011). Não é considerado câncer específico, podendo haver elevação dos níveis séricos não somente em casos de CaP como também em casos de HPB, infecções, traumas e idade avançada. Diminuição dos níveis de PSA também pode ser vistos em casos de castração, cirurgias da próstata, privação de hormônios androgênicos e radioterapia (EPSTEIN, 2004;DUNN e KAZER, 2011).

Juntamente com PSA e escore de Gleason, o toque retal é também considerado uma das ferramentas no diagnóstico inicial da doença, embora possua uma baixa confiabilidade e especificidade devido à impossibilidade de se palpar toda a glândula, inviabilizando a detecção de tumores pequenos que não tenham alcançado a cápsula prostática, ou ainda de lesões malignas que não se apresentem com aspecto cirroso (ILIC;O'CONNOR;GREEN e WILT, 2011).

Excetuando-se PSA, TR e escore de Gleason, o estágio tumoral é também importante parâmetro capaz de prever o risco da doença, contribuindo para eleição terapêutica e para a avaliação do prognóstico de CaP (EPSTEIN, 2004). D'Amico *et al* e outros estudos propõem a avaliação do risco tumoral baseado nos achados de escore de Gleason, PSA pré-operatório e estágio patológico tumoral, reforçando a importância de tais achados (D'AMICO;WHITTINGTON;MALKOWICZ;SCHULTZ *et al.*, 1998;D'AMICO;COTE;LOFFREDO; RENSHAW *et al.*, 2002). A classificação do estágio tumoral atualmente utilizada para o CaP é o modelo TNM, proposta pela International Union Against Cancer/Tumor Node Metastase em 2002 (INCA, 2011).

O tratamento para o câncer prostático avançado geralmente é constituído por quimioterapia e terapia hormonal, enquanto que para tumores primários preconiza-se geralmente a vigilância ativa, braquiterapia, radioterapia, crioterapia e prostatectomia radical (DUNN e KAZER, 2011). Do ponto de vista terapêutico, estudos anteriores apontam PR como o atual tratamento com capacidade curativa para CaP localizado quando detectado precocemente. No entanto os efeitos colaterais inerentes a PR, incontinência urinária e disfunção erétil, podem prejudicar a qualidade de vida. Estima-se que 80% dos casos de câncer de próstata submetidos a PR apresentem algum tipo de disfunção erétil (COOPERBERG;MOUL e CARROLL, 2005;GRAVAS e DE REIJKE, 2010).

A hemiablação da próstata tem sido sugerida como método alternativo capaz de diminuir a incidência de morbidade relacionada à PR (MOURAVIEV;MAYES;SUN;MADDEN *et al.*, 2007). Assim a lateralidade tumoral demonstrada em BaG tem sido apontada como importante fator para eleição de hemiablação, embora recentes estudos demonstrem que BaG tende a subestimar a lateralidade tumoral (MOURAVIEV;MAYES *et al.*, 2007;JEONG;KU;MOON; HONG *et al.*, 2012). Jeong *et al* num estudo envolvendo 316 pacientes afirma que cerca de 65% de sua amostra inicialmente diagnosticada como doença unilateral por BaG ou ressonância magnética, ou ambos juntos, não se apresentaram como doença unilateral no estágio patológico final. Tal achado é importante ao se considerar a conduta terapêutica, principalmente no que diz respeito a eleição de ressecções parciais ou totais da próstata (JEONG;KU *et al.*, 2012).

1.5 Marcadores Tumorais e Ciclina D1

Os marcadores tumorais permitem fazer o rastreamento do câncer, o diagnóstico diferencial entre uma neoplasia benigna e maligna, a avaliação de prognóstico e o acompanhamento terapêutico, assim como a detecção de recidiva tumoral. Cada vez mais, procura-se maior especificidade nos marcadores que permitam conhecer se a neoplasia vai desenvolver-se, assim como sua

agressividade. Já existem vários marcadores imunoistoquímicos (Mel-CAM), enzimáticos (tirosina), genéticos (p53, p21) e protéicos (integrinas, ICAM-1, Ciclina D1), que são utilizados no diagnóstico de várias neoplasias malignas como é no caso do melanoma (BALDIN;LUKAS;MARCOTE;PAGANO *et al.*, 1993; CORDON-CARDO, 1995; DONNELLAN e CHETTY, 1998; DIEHL, 2002; SAUTER;YEO; VON STEMM; ZHU *et al.*, 2002).

Existem três famílias de proteínas principais e seus genes, que regulam o ciclo celular: as ciclinas, ciclina quinase-dependente (Cdks) e as inibidoras de ciclina quinase-dependente (Cdkis). As Cdks participam da regulação do ciclo celular através do complexo Cdk/Ciclina que promove a fosforização de proteínas específicas (BALDIN;LUKAS *et al.*, 1993;DONNELLAN e CHETTY, 1998;DIEHL, 2002).

As ciclinas são importantes mediadores da atividade das Cdks e seus níveis são variáveis durante o ciclo celular. As ciclinas estão divididas em três classes específicas: ciclinas G1-S, ciclinas S e ciclinas M. O nível de ciclina é regulado pela expressão gênica e degradação protéica. Tem sido identificadas diferentes ciclinas (A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,T e algumas subdivididas em três tipos, por exemplo, ciclina D1, D2, D3) presentes em diferentes fases do ciclo celular, ativando suas quinases específicas que, através da fosforilação são então capazes de induzir a continuidade do ciclo celular (BALDIN;LUKAS *et al.*, 1993;DONNELLAN e CHETTY, 1998;DIEHL, 2002).

A ciclina D1 (CCND1) é uma proteína nuclear de vida curta que é destruída pela via da ubiquitina ATP dependente, e está envolvida na progressão celular da fase do ciclo G1 (repouso) para a fase S (síntese), tanto em células normais como em células neoplásicas, e é considerado o maior regulador do crescimento tumoral, que quando sofre mutação é capaz de atuar como oncogene. A proteína ciclina D1 foi originalmente descrita em adenomas de paratireóides e é derivada de um gene conhecido como bcl-1, CCND1 ou PRAD1, localizado no braço longo do cromossomo 11q13. A super expressão da proteína ciclina D1, como resultado de ativação do gene, remove a regulação normal do ciclo celular causando proliferação celular descontrolada, um crescimento anormal dos tecidos e a transformação para um fenótipo neoplásico (BALDIN;LUKAS *et al.*,

1993;CORDON-CARDO, 1995;DONNELLAN e CHETTY, 1998;DIEHL, 2002). A capacidade em dar continuidade ao ciclo celular por parte de ciclina D1 é fundamentada na capacidade de fosforilar a proteína do retinoblastoma (pRb). A proteína do retinoblastoma forma um complexo com proteínas ligantes de DNA, especialmente a família E2F, que são capazes de ativar a transcrição de genes indutores de progressão do ciclo celular. Com a fosforilação de pRb pela CCND1 as proteínas ligantes de DNA ficam livres e podem então ativar o ciclo celular (BALDIN;LUKAS *et al.*, 1993;CORDON-CARDO, 1995;DONNELLAN e CHETTY, 1998;DIEHL, 2002;SAUTER;YEO *et al.*, 2002).

1.6 Câncer de Próstata e Ciclina D1

As alterações da CCND1 têm sido observadas em diferentes tumores como nos cânceres de mama, esôfago, paratireóide, pulmão, tireóide, melanoma cutâneo e linfomas de células do manto (GILLET;SMITH;GREGORY;RICHARDS *et al.*, 1996;DONNELLAN e CHETTY, 1998;DIEHL, 2002;SAUTER;YEO *et al.*, 2002).

Estudos anteriores têm demonstrado que a super-expressão de CCND1 em câncer de próstata não é comum nem em tumores primários, e nem em cultura de células derivadas de tumor, mas quando há expressão geralmente está associado a tumores de fenótipo mais agressivo ou biologicamente diferentes (GUMBINER;GUMERLOCK;MACK;CHI *et al.*, 1999;DROBNJAK;OSMAN;SCHER;FAZZARI *et al.*, 2000). No entanto, especificamente em relação às culturas de células derivadas de CaP, alguns estudos apontam que tais células comumente apresentam elevada expressão de CCND1, muito embora os genes não estejam amplificados (DAY;MCCABE;ZHAO;WANG *et al.*, 2002).

Em relação à estudos imunoistoquímicos com tumores primários tem-se demonstrado que a expressão de CCND1 é moderada ou alta no parênquima

prostático de CaP, quando comparado ao parênquima normal (HE;FRANCO;JIANG;WILLIAMS *et al.*, 2007).

Também há relatos científicos apontando que o aumento de CCND1 está relacionado a aumento do número de receptores androgênicos em tumores de próstata, assim como achados referem correlação positiva entre alta expressão de CCND1 e baixas concentrações de pRb em tumores de escore de Gleason elevado (KOLAR;MURRAY;SCOTT;HARRISON *et al.*, 2000;CASABURI;AVENA;LANZINO; SISI *et al.*, 2012).

Num estudo anterior, Drobnjak *et al* detectou que dentre 22 casos de CaP com metástases ósseas hormônio independentes, 68% apontaram marcação positiva para CCND1, enquanto que tumores primários apresentaram apenas 11% de expressão de Ciclina D1, dando suporte para hipótese de que a super-expressão desta proteína representa importante papel na oncogênese e na avaliação prognóstica da doença (DROBNJAK;OSMAN *et al.*, 2000).

Outro estudo realizado por Aaltomaa *et al* com 211 casos, com seguimento médio de 7,3 anos, revelou que CCND1 e outros marcadores de ciclo celular podem ser significativos como fatores capazes de predizer prognóstico (AALTOMAA;KARJA;LIPPONEN;ISOTALO *et al.*, 2006).

A sobrevida de pacientes com CaP, demonstrada por Fleischmann *et al* num recente estudo, também aponta para a significativa diminuição na sobrevida geral de pacientes com alta expressão de CCND1 no citoplasma, especialmente em pacientes que apresentaram metástases ósseas, demonstrando que a expressão de CCND1 está relacionada a doença mais agressiva e de pior prognóstico (KOLAR;MURRAY *et al.*, 2000;FLEISCHMANN;ROCHA;SAXERSEKULIC;ZLOBEC *et al.*, 2011).

Em contrapartida há autores que têm demonstrado que o papel da CCND1 ainda permanece obscuro no câncer prostático, com estudos apontando que a super-expressão desta proteína é rara em tumores de próstata. Drobnjak demonstrou em um estudo que, mesmo com a hipótese de que a super-expressão de CCND1 esteja relacionada à doença metastática andrógeno independente, não houve correlação entre super-expressão de CCND1 com

escore de Gleason, falha bioquímica e tratamento hormonal neo-adjuvante (GUMBINER;GUMERLOCK *et al.*, 1999;DROBNJAK;OSMAN *et al.*, 2000; AALTOMAA; KARJA *et al.*, 2006).

No que diz respeito à clínica urológica, estudos anteriores apontam a escassez de marcadores biológicos para o diagnóstico de precisão do câncer de próstata, pois PSA que é largamente utilizado se apresenta como antígeno próstata específico e não tumor específico (BECKER;NOLDUS;DIAMANDIS e LILJA, 2001;AALTOMAA;KARJA *et al.*, 2006). Juntamente com este fator também tem sido apontado por outros pesquisadores que biópsia com agulha, também largamente utilizada no diagnóstico inicial da doença, chega a subestimar o escore de Gleason quando comparada a prostatectomia radical em aproximadamente 30-50% dos casos. Somando-se estes dois fatores à baixa sensibilidade apresentada pelo toque retal, alguns autores têm reforçado a busca por um novo marcador biológico que possa viabilizar um diagnóstico mais preciso e consistente (EPSTEIN, 2004;AALTOMAA;KARJA *et al.*, 2006;DUNN e KAZER, 2011).

Dentre as proteínas de maior interesse na busca para um biomarcador em câncer prostático estão as que estão envolvidas no ciclo celular. Especificamente em relação à CCND1, esta tem sido analisada por várias técnicas diferentes, principalmente por imunohistoquímica, considerada uma técnica de baixo custo, eficiente e que pode ser realizada em laboratórios de análise histopatológica.

2. OBJETIVO

Primários:

- 1 - Avaliar a expressão da Ciclina D1 no adenocarcinoma de próstata.
- 2 - Correlacionar a expressão de Ciclina D1 com o escore de Gleason e outros achados histológicos do adenocarcinoma de próstata.

Secundários:

- 1 - Correlacionar a expressão da Ciclina D1 com as características clínico-epidemiológicas dos pacientes estudados e com os fatores de riscos relacionados ao câncer prostático.
- 2 - Comparar escore de Gleason e lateralidade tumoral entre biópsias com agulha com 12 fragmentos e prostatectomia radical.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Amostra

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Dentre aproximadamente 500 casos de câncer de próstata levantados no período entre 2005 e 2010, foram selecionados 85 casos de adenocarcinoma de próstata para o ensaio imunoistoquímico com ciclina D1, todos submetidos à prostatectomia radical pelo serviço de urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP com diagnóstico prévio de CaP por biópsia pré cirúrgica e confirmação por anatomopatológico de prostatectomia radical. Para a comparação do escore de Gleason e lateralidade tumoral entre biópsias realizadas com agulha com 12 fragmentos e prostatectomia radical foram selecionados 308 casos de adenocarcinoma de próstata, dos quais 191 estiveram de acordo com os critérios para inclusão no estudo. O critério de exclusão se constituiu na ausência de algum dado epidemiológico, clínico e laboratorial que inviabilizasse os objetivos do estudo.

3.2 Ensaio Imunoistoquímico para Ciclina D1

O marcador para ciclina D1 foi usado em todos os casos da pesquisa para avaliação de sua expressão. A técnica utilizada baseou-se no método indireto de marcação com polímeros. Juntamente com os casos analisados foram submetidos a imunoistoquímica para ciclina D1 lâminas com espécimes prostáticos provenientes de autópsias de pacientes com idade inferior a 40 anos sem sinais de neoplasia prostática. Tais casos foram analisadas por dois patologistas e não apresentaram nenhum indício de processo neoplásico. A coleta do material proveniente das autópsias foi realizada pelo Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SERPAT, e concomitantemente também foram utilizadas espécimes de tonsilas palatinas como controle positivo para ciclina D1.

Após a escolha do material, que se baseou em uma pesquisa prévia dos casos em banco de dados, prontuários médicos, revisão de lâminas e confirmação do diagnóstico de CaP por um patologista, os blocos de parafina foram seccionados gerando cortes de 4 µm de espessura, que posteriormente foram aderidos sobre lâminas previamente banhadas com solução de Poly-L-Lysina. Estas lâminas foram dispostas em estufa com temperaturas de aproximadamente 65°C durante a noite que precede o ensaio imunoistoquímico. Segue abaixo de forma detalhada a descrição dos procedimentos desenvolvidos durante o ensaio imunoistoquímico:

DESPARAFINIZAÇÃO: o tecido estudado proveniente das biópsias foi desparafinado com imersões em xilol e reidratado com banhos de álcool com concentrações decrescentes. Depois foi lavado em água corrente e água destilada durante 5 minutos.

RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA: posteriormente as lâminas foram dispostas em cubetas de material resistente acrescidas de solução tampão, a fim de conservar o material durante o processo de recuperação antigênica. A solução tampão utilizada foi Tris-EDTA pH 9,0, sendo sua escolha proveniente da recomendação sugerida pelo fabricante do anticorpo. Após a desparafinização as lâminas foram colocadas em aparelho de aquecimento a vapor, previamente aquecido e configurado para promover temperatura com variações entre 90 a 100°C durante 45 minutos para realização da recuperação antigênica por calor. Segue-se então com tempo de resfriamento de aproximadamente 20 minutos, com posterior banho de solução de PBS (NaCl 0,15M, tampão fosfato 0,01M, pH 7,4).

BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA: A seguir, realizou-se o bloqueio da enzima peroxidase endógena com solução previamente preparada de peróxido de hidrogênio (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) a 3% que foi adicionada as cubetas durante 10 minutos. Após o tempo previsto as lâminas foram então duas vezes banhadas em solução de PBS e uma vez em solução TBS-Tween 20 (NaCl, Tris, HCl 1M, Água Destilada, pH 7,4 + Tween 20).

BLOQUEIO DE SÍTIOS INESPECÍFICOS: posteriormente as lâminas foram dispostas em câmaras úmidas para o prosseguimento do experimento. Durante o processo de disposição das lâminas na bandeja foi utilizada, quando necessário, solução de TBS-Tween 20 a fim de evitar que os cortes secassem. As lâminas foram enxugadas, com devido cuidado em relação aos cortes histológicos, e em seguida os mesmos foram delimitados com caneta hidrofóbica a fim de proporcionar melhor exposição aos reagentes aplicados na lâmina evitando a dispersão dos mesmos. Seguiu-se a aplicação de solução de leite desnatado Molico (Nestlé Brasil LTDA), devidamente preparado numa diluição de 3% em solução de Tris-HCl (Tris + Água Destilada, pH 7,6), sendo utilizado especificamente para o bloqueio de sítios inespecíficos de ligação o sobrenadante desta solução, que foi obtido após centrifugação em velocidade de 3000 rpm por 10 minutos. O tempo de exposição ao leite desnatado foi de 10 minutos, com posterior e imediata aplicação dos anticorpos primários.

APLICAÇÃO DO ANTICORPO PRIMÁRIO: aplicou-se quantidade suficiente do anticorpo primário Monoclonal de Coelho Ciclina D1 clone SP4 (Cell Marque, Rocklin, CA, USA), diluído numa proporção de 1:200 com diluente BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 0,005% em solução de Tris HCl pH 7,6 com Tween 20. O tempo de incubação foi de 2 horas. Após o tempo de incubação as lâminas foram devidamente lavadas com solução de TBS-Tween 20 por três vezes.

APLICAÇÃO DO BLOQUEADOR PÓS-PRIMÁRIO: posteriormente as lâminas foram incubadas com quantidades adequadas de bloqueador pós-primário (Novocastra, Newcastle, UK) por 30 minutos. Foram então novamente lavadas com solução de TBS-Tween 20 por três vezes.

AMPLIFICAÇÃO: a amplificação da expressão do anticorpo primário foi feita se utilizando de método indireto através do uso de Polímeros (Novocastra, Newcastle, UK) que foram aplicados aos cortes em quantidades suficientes com exposição de 30 minutos. Seguiram-se então duas lavagens, uma utilizando a solução de TBS-Tween 20 e a outra se utilizando a solução de Tris-HCl.

REVELAÇÃO: as reações foram reveladas incubando-se cada corte durante 6 a 10 minutos com quantidade suficiente do cromógeno 3,3'

Diaminobenzidina (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA, D5637-1G), que foi diluído em Tris-HCl na concentração de 1% para ser congelado e estocado em refrigerador, e apenas no dia do experimento foram feitas diluições da solução de estoque numa proporção de 1:24 também em tampão Tris-HCl, sendo acrescido de 2 a 4 microlitros de peróxido de hidrogênio para ativar as propriedades do cromógeno. Após o tempo de exposição, as lâminas foram lavadas com água destilada e posteriormente com água corrente em abundância. Os resíduos do cromógeno utilizado foram desprezados em recipiente específico para posterior tratamento e encaminhamento ao Laboratório de Resíduos Químicos da instituição.

CONTRA-COLORAÇÃO E MONTAGEM: a contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris (MERCK KgaA Darmstadt, Germany). As lâminas com os cortes foram desidratados em soluções de álcool e xilol, e posteriormente houve a adição de lamínulas de tamanho 24,0 x 32,0 mm se utilizando de meio de montagem rápida Entellan (MERCK KgaA Darmstadt, Germany).

3.3 Análise das Lâminas

As lâminas submetidas a imunoistoquímica para ciclina D1 foram lidas em microscópio óptico convencional avaliando-se de forma semi-quantitativa em porcentagem a expressão da proteína em questão. A expressão foi avaliada tendo-se como 100% de imunoreatividade a lâmina que apresentava marcação nuclear para ciclina D1 presente em toda região tumoral, e 0% a lâmina que não apresentava imunoreatividade para ciclina D1 em células tumorais.

3.4 Análise Estatística

Análises descritivas foram realizadas para fatores demográficos, clínicos e histopatológicos. Foram realizadas análises exploratórias para comparações entre grupos de interesse utilizando o Teste T de Fisher e Chi Quadrado para variáveis qualitativas. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para comparar variáveis de distribuições independentes. Também foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman, a fim de quantificar a associação de duas variáveis quantitativas, e houve a elaboração de uma curva ROC que descreve quantitativamente o desempenho de um teste a ser avaliado. Todas as análises foram realizadas se utilizando o *software* SAS® 9 e o *software* R.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados do Ensaio com a Ciclina D1

A idade média dos 85 pacientes cujo foram avaliados a expressão de ciclina D1 foi de $62,7 \pm 7$ anos, com média de PSA total pré-operatório de $8,68 \pm 5,16$ ng/DL. Em 63 (72,4%) casos foi notada alguma alteração ao toque retal, a prevalência na cor de pele dos pacientes foi branca (81,2%) e o estágio patológico tumoral (TNM) mais evidenciado foi pT2c (60%). Nossa amostra possuía quatro casos de metástases ósseas e um óbito. Demais dados descritivos vide tabela 1.

Foi estabelecido um ponto de corte para a expressão de CCND1 nos tumores de próstata utilizando-se teste estatístico de curva ROC (Figura 1). A curva revelou ponto de corte de significância estatística em relação ao escore de Gleason com alta sensibilidade entre 5 e 10% de expressão de CCND1 (Tabela 4). Em nossas análises estatísticas subseqüentes foi adotado como ponto de corte de maior sensibilidade (0,907 - tabela 4) o valor de 5% de expressão de CCND1 e realizada divisão em dois grupos para fins de análise estatística. O grupo cuja expressão foi menor ou igual a 5% foi chamado de Ciclina D1 negativo (CCND1-) e o segundo grupo cujo a expressão de ciclina D1 foi maior que 5% foi chamado de Ciclina D1 positivo (CCND1+).

Assim, com o estabelecimento do ponto de corte em nossa amostragem, foram realizados testes de associação entre a expressão da CCND1 em relação a variáveis histológicas e achados clínicos.

Tabela 4

Gleason			
cutoff	sens	spec	1-spec
0	1	0	1
5	0,907	0,262	0,738
10	0,86	0,357	0,643
15	0,791	0,429	0,571
20	0,721	0,476	0,524
25	0,698	0,5	0,5
30	0,628	0,5	0,5
35	0,558	0,571	0,429
40	0,465	0,738	0,262
45	0,395	0,762	0,238
50	0,372	0,762	0,238
55	0,256	0,786	0,214
60	0,233	0,786	0,214
65	0,233	0,833	0,167
70	0,233	0,929	0,071
75	0,186	0,952	0,048
80	0,14	0,976	0,024
85	0,116	1	0
90	0,07	1	0
95	0,047	1	0
100	0,023	1	0
ASC (IC 95%) 63,62% (51,82%-75,42%)			

Figura 1

De um modo geral, 64 casos (75,3%) apresentaram expressão de CCND1 positivo. Dentre os 21 pacientes com expressão de CCND1 negativo, 15 (71,4%) não apresentaram nenhuma imunoreatividade para CCND1. A média de expressão bruta de CCND1 geral foi de 33,5%, sendo que no grupo CCND1 negativo foi de 1,4% e no grupo CCND1 positivo foi de 44%. O grupo de escore de Gleason baixo grau apresentou média de expressão bruta de CCND1 de 26,9%, e o grupo com escore de Gleason de alto grau apresentou média de 39,9%. Dez próstatas sem sinais de malignidade provenientes de

autópsias não apresentaram nenhuma imunoreatividade para CCND1 (Figura 3), assim como os casos de tonsilas palatinas utilizadas como controle positivo apresentaram alta imunoreatividade para CCND1 (Figura 4). Dos quatro casos que apresentaram metástase, 3 (75%) foram CCND1 positivo.

O escore de Gleason apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) em relação a expressão de CCND1 para o teste de associação entre variáveis qualitativas. Dos 43 casos considerados tumores de alto grau, 37 casos (86,05%) apresentaram expressão de CCND1 positiva. Pouco mais da metade (64,29%) dos tumores classificados como baixo grau apresentaram expressão CCND1 positiva (tabela 2). Ainda em relação ao escore de Gleason, a análise das expressões em porcentagem bruta, ou seja, sem a utilização de um ponto de corte, revelou que os tumores de alto grau apresentam média de expressão de CCND1 maior ($p < 0,05$) em relação aos tumores de baixo grau (tabela 3 e figura 2).

O PSA pré-operatório também foi associado a expressão de CCND1 (tabela 2), e os resultados demonstraram que 8 pacientes (9,4%) com PSA abaixo de 4ng/DL apresentaram expressão de CCND1 positiva; cinquenta e seis pacientes (65,9%) possuíam valores de PSA maior que 4ng/DL no grupo com expressão de CCND1 positiva ($p > 0,05$). Não houve associação entre PSA pré-operatório e expressão bruta de CCND1 pelo teste de associação de Spearman (gráfico 1).

O estágio patológico da doença, dividido entre tumores confinados à próstata (doença órgão confinada) e tumores extraprostáticos (doença avançada) também foi comparado com a expressão de CCND1. Oitenta e cinco por cento dos tumores considerados extraprostáticos tiveram expressão de CCND1 positiva ($p > 0,05$).

Mais da metade (58,8%) dos casos considerados com alguma alteração ao TR tiveram expressão de CCND1 positiva. A associação entre cor e expressão de CCND1 demonstrou que 72,5% dos brancos presentes no estudo tiveram expressão de CCND1 positiva. Todos os pacientes negros apresentaram marcação positiva para CCND1, assim como no grupo de pacientes de cor parda, 84,6% apresentaram positividade para CCND1 ($p > 0,05$).

Também foram realizados testes estatísticos a fim de avaliar se havia associação com outros achados histopatológicos importantes em relação a expressão de CCND1 (tabela 2). No grupo CCND1+, a ausência de invasão perineural foi vista em 25 casos (39,06%) e a presença deste achado histológico correspondeu a 60,94%, 39 pacientes ($p=0,07$).

Tabela 2 - Parâmetros Clinicopatológicos em relação a Expressão de Ciclina D1 no CaP

Parâmetro	Ciclina D1 < 5%		Ciclina D1 > 5%		Total	P
	No.	(%)	No.	(%)		
Total	21	24,7	64	75,3	85	
Gleason						
<i>Baixo Grau</i>	15	35,71	27	64,29	42	
<i>Alto Grau</i>	6	13,95	37	86,05	43	0,02
Invasão Perineural						
<i>Ausência</i>	13	61,9	25	39,06	38	
<i>Presença</i>	8	38,1	39	60,94	47	0,07
Invasão Angiolinfática						
<i>Ausência</i>	21	26,25	59	73,75	80	
<i>Presença</i>	0	0	5	100	5	0,19
Estágio Patológico						
<i>Inicial (Órgão Confinado)</i>	18	27,7	47	72,3	65	
<i>Avançado (Extracapsular)</i>	3	15	17	85	20	0,25
Lateralidade Tumoral						
<i>Uni</i>	4	28,57	10	71,43	14	
<i>Bi</i>	17	23,94	54	76,06	71	0,71
Lesão Intra-Epitelial (PIN)						
<i>Ausência</i>	13	29,54	31	70,46	44	
<i>Presença</i>	8	19,5	33	80,5	41	0,28
PSA Pré-Operatório						
< 4	1	11,1	8	88,9	9	
4 ~10	15	28,85	37	71,15	52	0,46
>10	5	20,83	19	79,17	24	
Hiperplasia Prostática Benigna						
<i>Ausência</i>	5	23,8	16	76,2	21	
<i>Presença</i>	16	25	48	75	64	0,91
Atrofia Acinar						
<i>Ausência</i>	11	21,15	41	78,85	52	
<i>Presença</i>	10	30,3	23	69,7	33	0,34

Tabela 3 - Associação quantitativa da Expressão de Ciclina D1 e Escore de Gleason

% Expressão Ciclina D1							
Gleason	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor p
Baixo Grau	42	26,9	25,78	0	25	80	0,03
Alto Grau	43	39,65	28,73	0	35	100	

Figura 2

A presença de PIN nos casos analisados não apresentou correlação estatística positiva ($p>0,05$), sendo que dentro do grupo CCND1+, 31 casos (48,4%) não apresentavam a lesão no material analisado, e 33 casos (51,6%) apresentaram a lesão. A análise da expressão bruta de CCND1 em relação a presença ou ausência de PIN revelou média e desvio padrão do grupo com PIN positivo um pouco maior do que no grupo PIN negativo, porém sem correlação estatística positiva ($p>0,05$). (Tabela 4, Figura 3)

Gráfico 1 - Correlação de Spearman entre PSA pré-operatório e Expressão de Ciclina D1.

Ainda em se tratando de achados histopatológicos, atrofia acinar (ATA) e hiperplasia prostática benigna (HPB) foram estudadas em relação a CCND1. Trinta e três pacientes apresentaram presença concomitante de neoplasia e ATA. A presença de ATA no grupo CCND1+ foi de 23 casos (69,7%), e em relação a HPB, quarenta e oito casos (75%) apresentaram CCND1 positiva juntamente com a hiperplasia (Tabela 2). Em relação ao volume prostático, o grupo CCND1+ demonstrou volume menor ($66,82\text{cm}^3 \pm 43,18$) em relação ao grupo com expressão de CCND1- ($p<0,01$), (Tabela 5).

Tabela 4 - Associação Quantitativa da Expressão de Ciclina D1 e Lesão Intraepitelial Prostática

% Expressão Ciclina D1							
PIN	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor p
Negativo	44	31,25	27,52	0	30	85	0,52
Positivo	41	35,61	28,46	0	35	100	

Figura 3

Tabela 5 - Associação Quantitativa entre Volume Prostático e Expressão de Ciclina D1

Variável	Expressão Ciclina D1 (%)	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor p
Volume Prostático (cm³)	Negativo	21	84,46	35,41	31,5	81	165	<0,01
	Positivo	64	66,82	43,18	15,5	59,95	295,7	

4.2 Resultados da Comparação entre Biópsia e Prostatectomia Radical.

Foram analisados 191 casos . A média de idade foi de 63 anos $\pm 6,8$ e os valores médios de PSA total pré-operatório foram de 9,32 ng/DL $\pm 6,3$. Tivemos variação no escore de Gleason entre 5 e 10, com um número de 76 pacientes (39,8%) com Gleason menor ou igual 6, e 115 pacientes (60,2%) com Gleason igual ou maior que 7.

Foram realizados cálculos de especificidade e sensibilidade destes 191 pacientes comparando-se BaG e PR, demonstrados na tabela 6. Dos 76 casos classificados como tumor de baixo grau pela PR, houve 65 casos (85,5%) onde BaG foi fidedigna, e 11 casos (14,5%) de BaG que superestimaram o grau apresentado pela PR. Dos 115 casos classificados como alto grau na PR, tivemos uma concordância no grau entre BaG e PR em 69 casos (60%), e um montante de 46 casos (40%) onde as análises por BaG subestimaram o grau apresentado pela PR.

Em relação ao potencial de BaG em determinar uni ou bilateralidade tumoral, 7 casos (15,5%) de BaG apontam para a presença de bilateralidade tumoral enquanto PR aponta para unilateralidade. Noventa e um casos (62,3%) são apontados como tumores unilaterais pela BaG, que quando confrontados a PR se apresentam bilateralmente, também demonstrados na tabela 6.

Tabela 1 - Dados Epidemiológicos Descritivos do Ensaio em Imunoistoquímica para Ciclina D1.

Dados	Número (n = 85)	%	Dados	Número (n = 85)	%
Faixa Etária			HPB		
Até 49	2	2,4	Positivo	64	75,3
50 a 59	29	34,1	Negativo	21	24,7
60 a 69	36	42,3	Atrofia Acinar		
70 ou mais	18	21,2	Positivo	33	38,8
PSA (ng/DL)			Negativo	52	61,2
< 4,0	9	10,6	Cor		
4,0 a 9,9	52	61,2	Branco	69	81,2
10 a 19,9	21	24,7	Preto	13	15,3
20 ou maior	3	3,5	Mulato	3	3,5
Escore de Gleason			Estágio Patológico		
Até 6	42	49,4	pT1a	3	3,5
Maior ou Igual a 7	43	50,6	pT1c	1	1,2
PIN			pT2a	5	5,9
Positivo	41	48,2	pT2b	5	5,9
Negativo	44	51,8	pT2c	51	60
			pT3a	9	10,6
			pT3b	11	12,9

Tabela 6 - Sensibilidade e Especificidade da BaG em Relação à PR, na Detecção de Tumores Bilaterais e de Alto Grau

	BaG				BaG		
	Baixo Grau	Alto Grau	Total(PR)		Uni*	Bi*	Total (PR)
PR				PR			
Baixo Grau	65	11	76	Uni*	38	7	45
Alto Grau	46	69	115	Bi*	91	55	146
Total (BaG)	111	80	191	Total	129	62	191
Espec.*			86%	Espec.*			29%
Sens.*			57%	Sens.*			89%

Figura 3: Imunoistoquímica negativa para ciclina D1 em próstatas normais.

Figura 4: imunoreatividade para ciclina D1 nos controle positivos (tonsilas).

Figura 5: marcação positiva de ciclina D1 em adenocarcinoma de próstata.

5. DISCUSSÃO

Nós estudamos a expressão de ciclina D1 em adenocarcinomas de próstata em 85 pacientes correlacionando nossos achados com parâmetros clínicos, epidemiológicos e histológicos. Também comparamos sensibilidade e especificidade entre biópsia prostática de 12 fragmentos e prostatectomia radical em 191 pacientes.

A idade média dos nossos 85 pacientes ($62,7 \pm 7$ anos) no ensaio imunoistoquímico para ciclina D1 esteve em concordância com estudo desenvolvido por Aaltomaa *et al* ($64,2 \pm 5,5$ anos) e Fleischmann *et al* (65 anos) (AALTOMAA;KARJA *et al.*, 2006;FLEISCHMANN;ROCHA *et al.*, 2011;NAKAMURA;FELIZOLA;KUROTAKI;FUJISHIMA *et al.*, 2012). De um modo geral nós obtivemos expressão ciclina D1 positiva em 75% dos casos analisados, concordando com recente estudo de Nakamura *et al* que demonstrou positividade para ciclina D1 em 70% dos casos analisados (NAKAMURA;FELIZOLA *et al.*, 2012). As próstatas sem CaP não apresentaram nenhuma marcação para CCND1, concordando com estudos anteriores (HAN;LIM;ARBER;RUBIN *et al.*, 1998). Em relação ao estágio patológico tumoral houve concordância com estudo realizado por Nassif no Brasil (65% pT2c), porém houve discrepância entre nossos achados e de recentes estudos internacionais (NASSIF;TAMBARA FILHO *et al.*, 2009). Num estudo com 379 pacientes realizado nos Estados Unidos, Freedland *et al* apontou o estágio pT2a como mais predominante em sua amostra (34%), e em outro estudo realizado na Suíça por Fleischmann *et al* apontou predominância para tumores pT3a (FLEISCHMANN;ROCHA *et al.*, 2011). Também nos Estados Unidos, Makarov *et al* em outro estudo com 5730 pacientes que foram submetidos a PR, apresentou como estágio tumoral predominante pT1c (77%), enquanto que nosso estudo tem como predominância o estágio pT2c (60%) (FREEDLAND;HUMPHREYS;MANGOLD;EISENBERGER *et al.*, 2005;MAKAROV;TROCK;HUMPHREYS;MANGOLD *et al.*, 2007). Considerando-se que nossa amostra é proveniente de pacientes atendidos em sistema público de saúde, tal discrepância entre nosso estudo e estudos internacionais no que diz respeito ao estágio tumoral, pode ser explicada pelo recente estudo de Nardi *et al* realizado no Brasil que sugere que pacientes com CaP atendidos por sistema

público de saúde apresentam maior probabilidade de doença metastática, PSA mais elevado e portanto doença mais grave (NARDI;REIS *et al.*, 2012).

Os valores de PSA pré-operatório em nosso estudo (8,68ng/DL) não estiveram em concordância com outros estudos que avaliaram a expressão de ciclina D1 em CaP. Aaltomaa *et al* em um estudo realizado no ano de 2006 obteve como média de PSA pré-operatório em sua amostra 15,7ng/DL, e Nakamura *et al* em um recente estudo em 2012 obteve média do antígeno prostático específico de aproximadamente 11,4ng/DL para pacientes ciclina D1 positivo, e 10 ng/DL para pacientes ciclina D1 negativo, apresentando ambos os estudos médias de PSA pré-operatório maiores que as de nosso estudo (AALTOMAA;KARJA *et al.*, 2006;NAKAMURA;FELIZOLA *et al.*, 2012). O fato da média de PSA de nossos casos se apresentarem relativamente menor em relação a outros estudos internacionais pode ser devido a outros fatores envolvidos que não a ciclina D1. Tem-se discutido muito a influência da obesidade em relação às dosagens de PSA. Em um estudo de coorte realizado nos Estados Unidos por Rundle *et al* com mais de 10 mil pacientes entre os anos de 2004 e 2006 demonstrou que homens obesos apresentam dosagens de PSA mais baixas, sugerindo que o aumento de volume do plasma presente em pacientes obesos é o causador desta diminuição (RUNDLE e NEUGUT, 2008). Em contrapartida um recente estudo realizado na Itália por Banez *et al*, com 917 pacientes demonstra que em homens italianos a obesidade não é capaz de prejudicar a capacidade geral das dosagens de PSA predizerem uma lesão maligna (BANEZ;ALBISINNI;FREEDLAND;TUBARO *et al.*, 2012). No que diz respeito ao nosso estudo, não houve outros fatores analisados, tais como obesidade entre outros fatores sócio-ambientais que pudessem indicar influência sobre os valores de PSA.

Especificamente em relação à ciclina D1, nossos achados indicam que o aumento dos valores de PSA não possui relação com aumento na expressão de ciclina D1, muito embora quase 80% dos casos que possuíam PSA acima de 10ng/DL foram CCND1 positivos, concordando com estudo realizado por Drobnjak *et al* que relata maior expressão de CCND1 em tumores primários que apresentaram PSA maior que 10ng/DL antes do tratamento (DROBNJAK;OSMAN

et al., 2000). Ainda em relação ao estudo realizado por Nakamura *et al.*, a média de PSA encontrado em pacientes ciclina D1 positivo (11,4 ng/DL) e ciclina D1 negativo (10 ng/DL) não apresenta diferença significativamente importante do ponto de vista clínico baseado-se em nomogramas clínicos já bem estabelecidos (D'AMICO;WHITTINGTON *et al.*, 1998;D'AMICO;COTE *et al.*, 2002). Visto que ciclina D1 está diretamente ligada ao processo de mitose, na passagem de G1 para S, a não existência de correlação entre aumento de PSA e ciclina D1 demonstrado em nosso estudo pode sugerir que PSA não esteja intrinsecamente envolvido no processo de transformação neoplásica, especificamente nas vias moleculares que envolvem o processo de ciclo celular. Assim pode-se ainda sugerir que o aumento de PSA observado em neoplasias da próstata não seja produto direto do processo de transformação neoplásica no epitélio prostático, mas sim consequência do aumento da capacidade hormônio receptiva vista em tumores malignos da próstata e que pode vir a aumentar a produção de calicreínas, e por conseguinte de PSA. Portanto, talvez a única relação existente entre CCND1 e PSA seja mediada pela função reguladora de hormônios androgênicos e estrogênicos sobre o funcionamento de CCND1, que tem sido demonstrado em estudos anteriores (NAKAMURA;FELIZOLA *et al.*, 2012).

Nossas hipóteses a respeito do PSA podem ser ainda mais sustentadas pelo fato de PSA não ser considerado câncer específico, podendo estar alterado em outros processos patológicos na próstata, reforçando nossa ideia de que o aumento do PSA visto em tumores da próstata não esteja diretamente relacionado ao processo neoplásico, diminuindo a confiabilidade da utilização do PSA no diagnóstico de câncer prostático, fato que tem sido cada vez mais sugerido por estudiosos da área (BECKER;NOLDUS *et al.*, 2001;AALTOMAA;KARJA *et al.*, 2006).

Também em relação à ciclina D1 e PSA, Drobnjak *et al.* reporta que não houve associação entre CCND1 e falha bioquímica, todavia um recente estudo realizado por Fleischmann *et al.* demonstra que alta expressão de ciclina D1 citoplasmática em linfonodos com metástases provenientes de tumores primários de próstata é capaz de prever de forma independente morte e falha bioquímica precoce, sugerindo que ciclina D1 pode vir a ser um biomarcador importante no

âmbito de neoplasias que envolvem a próstata, mas inviabilizando conclusões em relação a expressão de ciclina D1 e PSA, demandando assim a necessidade de mais estudos capazes de elucidar o papel e o envolvimento do PSA nos distúrbios que envolvem o ciclo celular no que diz respeito a formação de tumores, assim como a relação entre estimulação hormonal do epitélio prostático e produção de PSA (FLEISCHMANN;ROCHA *et al.*, 2011).

Nós correlacionamos expressão de ciclina D1 em relação a achados histopatológicos comumente apresentados em biópsias prostáticas. A Invasão angiolinfática, atrofia acinar, hiperplasia prostática benigna e lesão intraepitelial prostática não apresentaram correlação estatística positiva, concordando com estudos anteriores (DROBNJAK;OSMAN *et al.*, 2000;FLEISCHMANN;ROCHA *et al.*, 2011). Ainda em relação a parâmetros histopatológicos analisados, foi evidenciado que mais da metade dos casos ciclina D1 positivo apresentaram invasão perineural com uma tendência de correlação estatística ($p=0,07$). Estudos têm demonstrado que o parâmetro histológico mais correlacionado a expressão de ciclina D1 é a invasão perineural, e este é clinicamente relevante, pois prediz um pior prognóstico clínico (AALTOMAA;KARJA *et al.*, 2006;ASHER;O'LEARY;RUGOWSKI; ARENDT *et al.*, 2012; HSIAO; CORTADA; COLOMO; YE *et al.*, 2012; NAKAMURA; FELIZOLA *et al.*, 2012; TOBIN; LUNDGREN; CONWAY; ANAGNOSTAKI *et al.*, 2012). Tem-se sugerido evidências de que invasão perineural é mediada por fatores de crescimento, e interações entre receptores de fator de crescimento e ciclina D1 têm sido reportadas na literatura (FROMONT;GODET;PIRES;YACOUN *et al.*, 2012;HSIAO;CORTADA *et al.*, 2012;MUNDLE, 2012). De qualquer forma a hipótese de envolvimento entre fatores de crescimento, invasão perineural e ciclina D1 demanda pesquisas futuras.

O escore de Gleason, o parâmetro histológico pré-cirúrgico mais utilizado em biópsia prostática pelo mundo todo, é considerado o parâmetro clinicopatológico isolado de maior relevância (AALTOMAA;KARJA *et al.*, 2006;BILLIS, 2007). A revisão bibliográfica evidencia estudos que demonstram correlação positiva entre ciclina D1 e escore de Gleason, mas também apresenta em maior número estudos onde não houve essa correlação estatística

(DROBNJAK;OSMAN *et al.*, 2000;AQUINO;FRANCO;RONCONI; ANNICIELLO *et al.*, 2012; FORMENTINI; HENNE-BRUNS e KORNMAN, 2012; NAKAMURA; FELIZOLA *et al.*, 2012). Em nosso estudo obtivemos correlação estatística positiva, e evidenciamos que os tumores classificados como alto grau apresentaram expressões de ciclina D1 mais elevadas. Se tumores de escore mais elevado apresentam expressão de ciclina D1 aumentada, podemos inferir que ciclina D1 em CaP primário desempenha papel importante no desenvolvimento de um fenótipo maligno mais agressivo. Já foi demonstrado que cultura de células de câncer prostático ciclina D1 positivo são mais refratários a terapias de ablação androgênica quando comparado com tumores ciclina D1 negativo, que regredem após castração. Além disso, essas culturas de células apresentam maior potencial replicativo e menor requerimento de fatores de crescimentos necessários ao processo de mitose (DING;LIU;FENG;JIANG *et al.*, 2012). He *et al* demonstrou que cultura de células malignas de próstata possuem alta expressão de ciclina D1 e por conseguinte apresentam alta motilidade, alta taxa de crescimento e maior habilidade invasiva, além de demonstrar que células do estroma prostático também sofrem alterações em seu comportamento quando estimuladas por ciclina D1, conferindo papel importante na relação epitélio/estroma no processo de tumorigênese prostática (HE;FRANCO *et al.*, 2007;YANG;LIU e FU, 2012). Em nosso estudo não avaliamos a expressão de ciclina D1 no estroma prostático. Embora em nosso estudo não fora possível avaliar expressão de CCND1 em material proveniente de metástases de tumores de próstata, devido a escassez destes, há relatos em estudos anteriores de associação entre a super-expressão de CCND1 em metástases provenientes de câncer de próstata, especialmente em tumores andrógeno-independentes. Especificamente em relação às lesões ósseas, tem sido observada a expressão de CCND1 também em lesões osteoblásticas em casos de osteosarcomas, linfoma de células do manto e câncer de mama (HALL;WILLIAMS;WU;WU *et al.*, 1993;AGUILERA;UUSAFR;WENIG e ABBONDANZO, 1998;CHHIENG;CRANOR; LESSER e ROSEN, 1998; SUNTERS; MCCLUSKEY e GRIGORIADIS, 1998). Estudos com lesões osteolíticas em pacientes com mieloma também apresentam positividade para CCND1, além de um alto perfil proliferativo, sugerindo que CCND1 tem papel importante na gênese de lesões metastáticas em ossos,

ocasionadas pelo câncer prostático (LAI;MEDEIROS;WILSON;SUN *et al.*, 1998;DROBNJAK;OSMAN *et al.*, 2000). Tem sido sugerido por estudiosos que as altas expressões de CCND1 observadas em culturas de células de câncer prostático são devido ao fato de que tais culturas são advindas de células metastáticas, podendo não refletir as características tumorais *in vivo* (HAN;LIM *et al.*, 1998). No entanto estudos imunoistoquímicas com biópsias com espécimes ósseos apresentando lesões osteoblásticas ocasionadas por câncer prostático apresentam forte imunoreatividade para CCND1, sugerindo fortemente que positividade de CCND1 está relacionada ao câncer prostático mais agressivo e de evolução clínica ruim (GUMBINER;GUMERLOCK *et al.*, 1999; DROBNJAK; OSMAN *et al.*, 2000).

Espécimes provenientes de BaG apresentam um escore de Gleason comumente menor com relação à prostatectomia radical. Estima-se que mais de 50% apresentem um escore menor em relação à PR (COOKSON;FLESHNER *et al.*, 1997;BRAWER;CRAWFORD *et al.*, 2000;KULKARNI;VALSANGKAR *et al.*, 2011). Outros estudos demonstraram que cerca de 40% dos homens diagnosticados com tumores de baixo grau por BaG terão como diagnóstico final tumores de alto grau (BOSTWICK, 1994;GREGORI;VIEWEG *et al.*, 2001;CAM;YUCEL *et al.*, 2002). Em relação à avaliação das biópsias realizadas em nosso estudo, foi possível demonstrar que em relação ao escore de Gleason as biópsias possuem baixos índices de superestimação e taxas de subestimação altas. Cookson *et al* num estudo com 226 pacientes demonstrou uma subestimação de Gleason por BaG em 54% dos casos, sustentando assim nossos achados (COOKSON;FLESHNER *et al.*, 1997;BRAWER, 1999;BRAWER; CRAWFORD *et al.*, 2000; ANDRADE, 2007). Assim os achados de sensibilidade e especificidade em nosso estudo apontam para grandes chances de BaG apresentar resultados falso-negativos, ou seja, de apontar tumores de alto grau como sendo tumores de baixo grau.

A subestimação do escore de Gleason pode inviabilizar o uso de nomogramas clínicos já bem estabelecidos, e que se utilizam do escore de Gleason como parâmetro para classificar a doença como indolente ou agressiva, além de poder inviabilizar a escolha terapêutica mais eficaz

(D'AMICO;WHITTINGTON *et al.*, 1998;D'AMICO;COTE *et al.*, 2002). Visto que em nosso estudo ciclina D1 apresentou uma expressão maior em tumores com escore de Gleason acima de 7, e que as taxas de subestimação do escore chegam a 40%, podemos sugerir o uso da expressão de ciclina D1 como um marcador adjuvante em biópsias prostáticas em tumores primários, especialmente em biópsias com poucos fragmentos, afim de se poder direcionar o patologista para uma gradação histológica mais fidedigna e apontar com maior acurácia se determinado tumor é indolente ou agressivo. Invasão perineural também tem sido fortemente associada a expressão de ciclina D1, e por se tratar de um parâmetro histológico que aponta para doença mais agressiva também contribui para nossa sugestão de um possível uso da avaliação da expressão de ciclina D1 em biópsias de tumores de próstata com vistas a trazer maior precisão em determinar tumor agressivo ou indolente. Ainda com relação a nossa hipótese da utilização de ciclina D1 em biópsias prostáticas, mesmo não havendo correlação estatística entre o aumento das dosagens de PSA, que também é utilizado em larga escala nos nomogramas clínicos em urologia, e de ciclina D1, ainda sim ciclina D1 obteve expressão considerada positiva em grande parte dos tumores analisados em nosso estudo que possuíam PSA acima de 10ng/DL, tornando ainda mais relevante do ponto de vista clínico nossa sugestão da utilização de ciclina D1 como um marcador adjuvante indicador de tumor de próstata mais agressivo em biópsias com agulha. (D'AMICO;WHITTINGTON *et al.*, 1998;D'AMICO;COTE *et al.*, 2002) Além disso tem sido cada vez mais discutido a urgência em se desenvolver biomarcadores moleculares que possam auxiliar na avaliação de parâmetros histológicos em câncer de próstata a fim de melhorar prognóstico e curso clínico individual da doença (DIMITRIADIS;KALOGEROPOULOS;VELAETI;SOTIRIOU *et al.*, 2013).

A capacidade de avaliar lateralidade tumoral em biópsias também foi analisada, e nossos resultados demonstraram índices de superestimação baixos e índices de subestimação altos em BaG. As análises de sensibilidade e especificidade demonstram novamente que as possibilidades de BaG apresentar resultados falso-negativos são altamente significativas, em relação à lateralidade tumoral. Jeong *et al* num estudo envolvendo 316 pacientes afirma que cerca de

65% de sua amostra inicialmente diagnosticada como doença unilateral por BaG ou ressonância magnética, ou ambos juntos, não se apresentaram como doença unilateral no estágio patológico final, concordando com nossos achados (JEONG;KU *et al.*, 2012).

A prostatectomia radical é considerada a eleição terapêutica padrão ouro no tratamento para câncer de próstata primário e localizado. No entanto a ressecção total da glândula acarreta o surgimento de disfunção erétil e incontinência urinária, trazendo prejuízo na qualidade de vida para estes pacientes (MOURAVIEV;MAYES *et al.*, 2007;DUNN e KAZER, 2011). A preservação do lobo contralateral em ressecções da próstata, também chamada de hemiablação, tem sido sugerida como método alternativo capaz de diminuir a incidência de morbidade relacionada à PR (MOURAVIEV;MAYES *et al.*, 2007). A terapia focal que emprega a hemiablação em tumores de próstata foi inicialmente descrita por Onik *et al*, num estudo piloto com 9 pacientes onde, em 3 anos de seguimento, 7 pacientes apresentaram níveis de PSA estáveis e biópsias negativas (ONIK;NARAYAN;VAUGHAN;DINEEN *et al.*, 2002;MOURAVIEV;MAYES *et al.*, 2007). Outro estudo com 20 pacientes, realizado por Masson *et al*, demonstrou que 95% dos pacientes em cerca de 3 meses recuperaram potência e atividade geniturinária normais (PREPELICA;OKEKE;MURPHY e KATZ, 2005). Estudos recentes tem apontado BaG unilateral como a ferramenta mais eficaz em indicar a hemiablação em pacientes com tumores de baixo risco, e mais pesquisadores continuam elegendo terapia focal de hemiablação para pacientes com BaG unilateral (ELLIS;MANNY e REWCASTLE, 2007;LAMBERT;BOLTE;MASSON e KATZ, 2007; POLASCIK; MAYES; SCHROECK; SUN *et al.*, 2009). Visto o importante papel desempenhado pela BaG em terapias focais em câncer de próstata, a subestimação da lateralidade demonstrada em nosso estudo torna-se um ponto crítico na decisão terapêutica, podendo inviabilizar a eleição de hemiablação da próstata. Assim, novos estudos devem ser realizados a fim de se tentar desenvolver técnicas capazes de diminuir as chances de BaG subestimar a lateralidade tumoral. Epstein *et al* já demonstrou em estudo que BaG com 44 fragmentos aumenta consideravelmente a especificidade (~95%) em detectar tumor de tamanho significativo e diminuir a chance de resultados falso-negativos

(EPSTEIN;SANDERSON;CARTER e SCHARFSTEIN, 2005;BOCCON-GIBOD;DE LONGCHAMPS;TOUBLANC;BOCCON-GIBOD *et al.*, 2006). Portanto, talvez a padronização de um número maior de fragmentos (18 ou 24 fragmentos), ou ainda de biópsias saturadas com 30 fragmentos ou mais em próstatas de tamanho aumentado, evite a subestimação da lateralidade por BaG e viabilize sua utilização na eleição da hemiablação, muito embora sangramento, processos infecciosos e inflamações locais possam ocorrer em decorrência do uso de biópsias saturadas.

Também avaliamos a expressão de ciclina D1 em relação ao volume prostático. Pudemos notar que a média de volume das próstatas com expressão de CCND1 positiva foi menor quando comparado ao grupo com expressão CCND1 negativo ($p<0,01$). Isso pode sugerir que a expressão de ciclina D1 seja inversamente proporcional ao volume prostático, mas ainda assim ressaltamos que em nosso estudo próstatas com expressão aumentada de ciclina D1 tiveram variações de volume maiores (FLEISCHMANN;ROCHA *et al.*, 2011). Assim, é válido salientar que não podemos inferir com certeza tal relação de inversão de proporcionalidade entre ciclina D1 e volume prostático uma vez que nossa amostra é relativamente escassa. Mesmo sabendo que cultura de células provenientes de CaP ciclina D1 positivo possuem taxas de crescimento mais elevada, isso não significa necessariamente que a glândula terá um volume maior devido a este fator, pois ainda pode haver influência de hipertrofia prostática benigna associada. HPB pode ser relatado em até 20% dos homens com até 40 anos, sendo que esta porcentagem aumenta progressivamente com a idade podendo chegar a aproximadamente 90% aos 70 anos (EPSTEIN, 2004). Vale ressaltar que em nosso estudo, o grupo CCND1 negativo e o grupo CCND1 positivo obtiveram média de idade praticamente iguais (62,7 e 62,6 anos, respectivamente), não nos autorizando a atribuir as alterações de volume prostático ao fator idade. Um estudo realizado por Gumbiner *et al* demonstrou que em tecidos prostáticos que apresentavam apenas HPB, não houve expressão de ciclina D1, e Han *et al* também reportou que células com HPB expressam baixas quantidades de CCND1 (HAN;LIM *et al.*, 1998;FORMENTINI;HENNE-BRUNS *et al.*, 2012). Em nosso estudo, não foi possível analisar especificamente a

expressão de ciclina D1 em regiões do epitélio prostático acometidas por HPB, sendo apenas realizado correlação entre a presença ou ausência deste achado histológico em relação à ciclina D1. Todavia os achados de Gumbiner *et al* e outros estudos quando contrastados aos nossos sugerem fortemente que a expressão de ciclina D1 esteja intimamente envolvida no processo de tumorigênese, e não ao desenvolvimento de HPB, fazendo com que nossos achados relacionados ao volume prostático e ciclina D1 tornem-se plausíveis, mais ainda sim demandando futuros estudos com número maior de pacientes (HAN; LIM *et al.*, 1998; GUMBINER; GUMERLOCK *et al.*, 1999; HE; FRANCO *et al.*, 2007; DING; LIU *et al.*, 2012; FORMENTINI; HENNE-BRUNS *et al.*, 2012).

6. CONCLUSÃO

Ciclina D1 demonstrou imunoreatividade nuclear em 75% dos casos analisados e tumores de alto grau, com escore de Gleason ≥ 7 , apresentaram expressão maior de ciclina D1, sugerindo que alta expressão de ciclina D1 está associado a fenótipos de adenocarcinoma de próstata mais agressivos.

A biópsia subestimou escore de Gleason e lateralidade tumoral podendo inviabilizar diagnóstico e escolha terapêutica adequada, principalmente na eleição da terapia focal de hemiablação da próstata. Com altas taxas de subestimação de escore de Gleason em biópsia, sugerimos que imunoistoquímica para ciclina D1 possa ser utilizada como marcador histológico a fim de diminuir resultados histopatológicos falso-negativos.

REFERÊNCIAS

- AALTOMAA, S. et al. Expression of Ki-67, cyclin D1 and apoptosis markers correlated with survival in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. **Anticancer Res**, v. 26, n. 6C, p. 4873-8, Nov-Dec 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17214354> >.
- AGUILERA, N. S. et al. The blastic variant of mantle cell lymphoma arising in Waldeyer's tonsillar ring. **J Laryngol Otol**, v. 112, n. 10, p. 991-4, Oct 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211231> >.
- ANDRADE, R. T. Gleason score: the relationship between prostate biopsy and histologic findings after radical prostatectomy. 2007.
- AQUINO, G. et al. Peripheral T-cell Lymphoma with Cyclin D1 overexpression: a case report. **Diagn Pathol**, v. 7, p. 79, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22770229> >.
- ASHER, J. M. et al. Prolactin promotes mammary pathogenesis independently from cyclin D1. **Am J Pathol**, v. 181, n. 1, p. 294-302, Jul 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658484> >.
- BALDIN, V. et al. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. **Genes Dev**, v. 7, n. 5, p. 812-21, May 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8491378> >.
- BANEZ, L. L. et al. The impact of obesity on the predictive accuracy of PSA in men undergoing prostate biopsy. **World J Urol**, Jul 31 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847453> >.
- BECKER, C. et al. The role of molecular forms of prostate-specific antigen (PSA or hK3) and of human glandular kallikrein 2 (hK2) in the diagnosis and monitoring of prostate cancer and in extra-prostatic disease. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 38, n. 5, p. 357-99, Oct 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11720279> >.
- BILLIS, A. Patologia Cirúrgica da Próstata. n. 2^a, 2007.
- BOCCON-GIBOD, L. M. et al. Prostate saturation biopsy in the reevaluation of microfocal prostate cancer. **J Urol**, v. 176, n. 3, p. 961-3; discussion 963-4, Sep 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890668> >.

- BOSTWICK, D. G. Gleason grading of prostatic needle biopsies. Correlation with grade in 316 matched prostatectomies. **Am J Surg Pathol**, v. 18, n. 8, p. 796-803, Aug 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8037294> >.
- BOSTWICK, D. G. et al. Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Hum Pathol**, v. 24, n. 3, p. 298-310, Mar 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8454275> >.
- BOSTWICK, D. G.; BRAWER, M. K. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. **Cancer**, v. 59, n. 4, p. 788-94, Feb 15 1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2433020> >.
- BRAWER, M. K. Prostate cancer: epidemiology and screening. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v. 2, n. S1, p. 2-6, Jan 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496849> >.
- BRAWER, M. K. et al. Prostate cancer: epidemiology and screening. **Rev Urol**, v. 2 Suppl 4, p. S5-9, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16986040> >.
- CAM, K. et al. Accuracy of transrectal ultrasound guided prostate biopsy: histopathological correlation to matched prostatectomy specimens. **Int J Urol**, v. 9, n. 5, p. 257-60, May 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060438> >.
- CASABURI, I. et al. Chenodeoxycholic acid through a TGR5-dependent CREB signaling activation enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer cell proliferation. **Cell Cycle**, v. 11, n. 14, p. 2699-710, Jul 15 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22751440> >.
- CHHIENG, C. et al. Metaplastic carcinoma of the breast with osteocartilaginous heterologous elements. **Am J Surg Pathol**, v. 22, n. 2, p. 188-94, Feb 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500219> >.
- CHUN, F. K. et al. Development and internal validation of a nomogram predicting the probability of prostate cancer Gleason sum upgrading between biopsy and radical prostatectomy pathology. **Eur Urol**, v. 49, n. 5, p. 820-6, May 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439050> >.

- COOKSON, M. S. et al. Correlation between Gleason score of needle biopsy and radical prostatectomy specimen: accuracy and clinical implications. **J Urol**, v. 157, n. 2, p. 559-62, Feb 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8996356> >.
- COOPERBERG, M. R.; MOUL, J. W.; CARROLL, P. R. The changing face of prostate cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 32, p. 8146-51, Nov 10 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16278465> >.
- CORDON-CARDO, C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. **Am J Pathol**, v. 147, n. 3, p. 545-60, Sep 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7677168> >.
- D'AMICO, A. V. et al. Determinants of prostate cancer-specific survival after radiation therapy for patients with clinically localized prostate cancer. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 23, p. 4567-73, Dec 1 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454114> >.
- D'AMICO, A. V. et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. **JAMA**, v. 280, n. 11, p. 969-74, Sep 16 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749478> >.
- DAY, K. C. et al. Rescue of embryonic epithelium reveals that the homozygous deletion of the retinoblastoma gene confers growth factor independence and immortality but does not influence epithelial differentiation or tissue morphogenesis. **J Biol Chem**, v. 277, n. 46, p. 44475-84, Nov 15 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191999> >.
- DIEHL, J. A. Cycling to cancer with cyclin D1. **Cancer Biol Ther**, v. 1, n. 3, p. 226-31, May-Jun 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432268> >.
- DIMITRIADIS, E. et al. Study of genetic and epigenetic alterations in urine samples as diagnostic markers for prostate cancer. **Anticancer Res**, v. 33, n. 1, p. 191-7, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267145> >.
- DING, G. X. et al. Slug regulates Cyclin D1 expression in by ubiquitin-proteasome pathway in prostate cancer cells. **Panminerva Med**, v. 54, n. 3, p. 219-23, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22801439> >.

DONNELLAN, R.; CHETTY, R. Cyclin D1 and human neoplasia. **Mol Pathol**, v. 51, n. 1, p. 1-7, Feb 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624412> >.

DROBNJAK, M. et al. Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 5, p. 1891-5, May 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815912> >

DUNN, M. W.; KAZER, M. W. Prostate cancer overview. **Semin Oncol Nurs**, v. 27, n. 4, p. 241-50, Nov 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018403> >.

ELLIS, D. S.; MANNY, T. B., JR.; REWCASTLE, J. C. Focal cryosurgery followed by penile rehabilitation as primary treatment for localized prostate cancer: initial results. **Urology**, v. 70, n. 6 Suppl, p. 9-15, Dec 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18194712> >.

EPSTEIN, J. I. Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. **Hum Pathol**, v. 26, n. 2, p. 223-9, Feb 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7860053> >.

EPSTEIN, J.I. O Trato Urinário Inferior e o Sistema Genital Masculino. In: (Ed.). **Bases Patológicas das Doenças, Robins e Cotran, Patologia**. 7ª. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 21,

EPSTEIN, J. I. et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. **Scand J Urol Nephrol Suppl**, n. 216, p. 34-63, May 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16019758> >.

EPSTEIN, J. I. et al. Utility of saturation biopsy to predict insignificant cancer at radical prostatectomy. **Urology**, v. 66, n. 2, p. 356-60, Aug 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040085> >.

FINE, S. W. et al. A Contemporary Update on Pathology Reporting for Prostate Cancer: Biopsy and Radical Prostatectomy Specimens. **Eur Urol**, Mar 8 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421083> >.

- FLEISCHMANN, A. et al. High-level cytoplasmic cyclin D1 expression in lymph node metastases from prostate cancer independently predicts early biochemical failure and death in surgically treated patients. **Histopathology**, v. 58, n. 5, p. 781-9, Apr 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21438905> >.
- FORMENTINI, A.; HENNE-BRUNS, D.; KORNMAN, M. Thymidylate synthase and cyclin D1 protein expression in lymph node negative colorectal cancer: role as prognostic factors? **Hepatogastroenterology**, v. 59, n. 118, p. 1859-64, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819905> >.
- FOSTER, C. S.; KE, Y. Stem cells in prostatic epithelia. **Int J Exp Pathol**, v. 78, n. 5, p. 311-29, Oct 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9462229> >.
- FREEDLAND, S. J. et al. Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. **JAMA**, v. 294, n. 4, p. 433-9, Jul 27 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046649> >.
- FROMONT, G. et al. Biological significance of perineural invasion (PNI) in prostate cancer. **Prostate**, v. 72, n. 5, p. 542-8, Apr 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21748758> >.
- GILLET, C. et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. **Int J Cancer**, v. 69, n. 2, p. 92-9, Apr 22 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608989> >.
- GOMES, R. et al. [Prostate cancer prevention: a review of the literature]. **Cien Saude Colet**, v. 13, n. 1, p. 235-46, Jan-Feb 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813537> >.
- GRAVAS, S.; DE REIJE, T. Is focal therapy an alternative to active surveillance? **J Endourol**, v. 24, n. 5, p. 855-60, May 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20367407> >.
- GREGORI, A. et al. Comparison of ultrasound-guided biopsies and prostatectomy specimens: predictive accuracy of Gleason score and tumor site. **Urol Int**, v. 66, n. 2, p. 66-71, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223746> >.

- GRETZER, M. B.; PARTIN, A. W. PSA markers in prostate cancer detection. **Urol Clin North Am**, v. 30, n. 4, p. 677-86, Nov 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14680307> >.
- GUMBINER, L. M. et al. Overexpression of cyclin D1 is rare in human prostate carcinoma. **Prostate**, v. 38, n. 1, p. 40-5, Jan 1 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973108> >.
- HALL, F. L. et al. Two potentially oncogenic cyclins, cyclin A and cyclin D1, share common properties of subunit configuration, tyrosine phosphorylation and physical association with the Rb protein. **Oncogene**, v. 8, n. 5, p. 1377-84, May 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8479754> >.
- HAN, E. K. et al. Cyclin D1 expression in human prostate carcinoma cell lines and primary tumors. **Prostate**, v. 35, n. 2, p. 95-101, May 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9568672> >.
- HE, Y. et al. Tissue-specific consequences of cyclin D1 overexpression in prostate cancer progression. **Cancer Res**, v. 67, n. 17, p. 8188-97, Sep 1 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804732> >.
- HSIAO, S. C. et al. SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma. **Histopathology**, May 29 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22642745> >.
- ILIC, D. et al. Screening for prostate cancer: an updated Cochrane systematic review. **BJU Int**, v. 107, n. 6, p. 882-91, Mar 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21392207> >.
- INCA. **Estimativa 2012**. Incidência de Câncer no Brasil. SAÚDE, M. D. Rio de Janeiro, RJ 2011.
- JEONG, C. W. et al. Can conventional magnetic resonance imaging, prostate needle biopsy, or their combination predict the laterality of clinically localized prostate cancer? **Urology**, v. 79, n. 6, p. 1322-8, Jun 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22656409> >.
- KOLAR, Z. et al. Relation of Bcl-2 expression to androgen receptor, p21WAF1/CIP1, and cyclin D1 status in prostate cancer. **Mol Pathol**, v. 53, n. 1, p. 15-8, Feb 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884916> >.

KOONTZ, B. F. et al. Impact of primary Gleason grade on risk stratification for Gleason score 7 prostate cancers. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 82, n. 1, p. 200-3, Jan 1 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21237582> >.

KULKARNI, J. N. et al. Impact of Gleason pattern up gradation after radical prostatectomy for carcinoma prostate patients with low biopsy score (≤ 6). **J Cancer Res Ther**, v. 7, n. 4, p. 459-62, Oct-Dec 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22269410> >

KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Bases Patológicas das Doenças**. 7ª. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.

LAI, R. et al. Expression of the cell-cycle-related proteins E2F-1, p53, mdm-2, p21waf-1, and Ki-67 in multiple myeloma: correlation with cyclin-D1 immunoreactivity. **Mod Pathol**, v. 11, n. 7, p. 642-7, Jul 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688185> >.

LAMBERT, E. H. et al. Focal cryosurgery: encouraging health outcomes for unifocal prostate cancer. **Urology**, v. 69, n. 6, p. 1117-20, Jun 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572198> >.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 40, n. 3, p. 565-75, viii-ix, Sep 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889721> >.

LUGHEZZANI, G. et al. Radical prostatectomy represents an effective treatment in patients with specimen-confined high pathological Gleason score prostate cancer. **BJU Int**, Apr 4 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487441> >

MAKAROV, D. V. et al. Updated nomogram to predict pathologic stage of prostate cancer given prostate-specific antigen level, clinical stage, and biopsy Gleason score (Partin tables) based on cases from 2000 to 2005. **Urology**, v. 69, n. 6, p. 1095-101, Jun 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572194> >.

- MARSHALL, J. R. Diet and prostate cancer prevention. **World J Urol**, v. 30, n. 2, p. 157-65, Apr 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22249340> >.
- MOSTOFI, F. K.; DAVIS, C. J., JR.; SESTERHENN, I. A. Pathology of carcinoma of the prostate. **Cancer**, v. 70, n. 1 Suppl, p. 235-53, Jul 1 1992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1376194> >.
- MOURAVIEV, V. et al. Prostate cancer laterality as a rationale of focal ablative therapy for the treatment of clinically localized prostate cancer. **Cancer**, v. 110, n. 4, p. 906-10, Aug 15 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17587207> >.
- MUNDLE, S. D. Targeting cyclin D1 for high risk myelodysplastic syndromes. **Leuk Res**, v. 36, n. 8, p. 964-5, Aug 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22607960> >.
- NAKAMURA, Y. et al. Cyclin D1 (CCND1) expression is involved in estrogen receptor beta (ERbeta) in human prostate cancer. **Prostate**, Oct 11 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23060014> >.
- NARDI, A. C. et al. 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**, v. 38, n. 2, p. 155-66, Mar 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22555039> >.
- NASSIF, A. E. et al. [Epidemiologic profile and prognostic factors in clinically localized prostate adenocarcinoma submitted to surgical treatment]. **Rev Col Bras Cir**, v. 36, n. 4, p. 327-31, Aug 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20076923> >.
- ONIK, G. et al. Focal "nerve-sparing" cryosurgery for treatment of primary prostate cancer: a new approach to preserving potency. **Urology**, v. 60, n. 1, p. 109-14, Jul 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12100934> >.
- PASCHOALIN, E. L. et al. Racial influence on the prevalence of prostate carcinoma in Brazilian volunteers. **Int Braz J Urol**, v. 29, n. 4, p. 300-5, Jul-Aug 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15745552> >.

POLASCIK, T. J. et al. Patient selection for hemiablativ focal therapy of prostate cancer: variables predictive of tumor unilaterality based upon radical prostatectomy. **Cancer**, v. 115, n. 10, p. 2104-10, May 15 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19288576> >.

POMPOE, A. C. L., WROCLAWSKI, E.R., SADI, M.V. **Algoritmos em Uro-Oncologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

POTTER, S. R.; EPSTEIN, J. I.; PARTIN, A. W. Seminal vesicle invasion by prostate cancer: prognostic significance and therapeutic implications. **Rev Urol**, v. 2, n. 3, p. 190-5, Summer 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985773> >.

PREPELICA, K. L. et al. Cryosurgical ablation of the prostate: high risk patient outcomes. **Cancer**, v. 103, n. 8, p. 1625-30, Apr 15 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15747374> >.

RUNDLE, A.; NEUGUT, A. I. Obesity and screening PSA levels among men undergoing an annual physical exam. **Prostate**, v. 68, n. 4, p. 373-80, Mar 1 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18189231> >.

SAUTER, E. R. et al. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. **Cancer Res**, v. 62, n. 11, p. 3200-6, Jun 1 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036934> >.

SCHRODER, F. H. PSA screening--a review of recent studies. **Eur J Cancer**, v. 45 Suppl 1, p. 402-4, Sep 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19775647> >.

SIMARD, J. et al. Perspective: prostate cancer susceptibility genes. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2029-40, Jun 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021166> >.

SROUGI, M. **Próstata: isso é com você**. São Paulo: Publifolha, 2003.

SUNTERS, A.; MCCLUSKEY, J.; GRIGORIADIS, A. E. Control of cell cycle gene expression in bone development and during c-Fos-induced osteosarcoma formation. **Dev Genet**, v. 22, n. 4, p. 386-97, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9664690> >.

TOBIN, N. P. et al. Automated image analysis of cyclin D1 protein expression in invasive lobular breast carcinoma provides independent prognostic information. **Hum Pathol**, v. 43, n. 11, p. 2053-61, Nov 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22647349> >.

WHITMORE, W. F., JR. Localised prostatic cancer: management and detection issues. **Lancet**, v. 343, n. 8908, p. 1263-7, May 21 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7910280> >.

YANG, C.; LIU, H. Z.; FU, Z. X. Effects of PEG-liposomal oxaliplatin on apoptosis, and expression of Cyclin A and Cyclin D1 in colorectal cancer cells. **Oncol Rep**, v. 28, n. 3, p. 1006-12, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710431> >.