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

SAMARA RODRIGUES DUARTE

**Expressão da proteína BRCA2 em prostatectomia e sua correlação
com a biópsia em pacientes com câncer de próstata**

Ribeirão Preto

2016

SAMARA RODRIGUES DUARTE

**Expressão da proteína BRCA2 em prostatectomia e sua correlação
com a biópsia em pacientes com câncer de próstata**

Versão corrigida. A versão original está disponível no Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva

Ribeirão Preto – SP

2016

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Samara Rodrigues

Expressão da proteína BRCA2 em prostatectomia e sua correlação com a biópsia em pacientes com câncer de próstata. Ribeirão Preto, 2016.
65 p.: Il; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.
Orientador: Ribeiro-Silva, Alfredo

1. BRCA2; 2. Câncer de Próstata; 3. Escore de *Gleason*; 4. Imunohistoquímica

FOLHA DE ROSTO

Nome: Samara Rodrigues Duarte

Título: Expressão da proteína BRCA2 em prostatectomia e sua correlação com a biópsia em pacientes com câncer de próstata

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Patologia.

Opção: Patologia Experimental

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

“Deo omnis gloria”.

Aos meus pais, José Duarte e Selma;

Aos meus irmãos, Denis Alisson e Darlisson.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu Pai, meu melhor Amigo e ter me sustentado na fé quando houveram adversidades, principalmente quando apertou a saudade de casa e dos meus entes queridos.

Ao meu orientador, Prof Dr. Alfredo Ribeiro-Silva, que me recebeu em seu laboratório de Oncopatologia, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal. Serei sempre grata!

Ao Prof Dr. Rodolfo Borges dos Reis, que contribuiu desde o início com suas ideias para a execução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Oncopatologia pela ajuda, cafezinhos e amizade: Juliana Zanetti, Andressa Duarte, Monyk Braga, Giórgia Silveira, João Paulo Oliveira, Danilo Soave. As técnicas do laboratório, a qual tive o prazer de conhecer: Deisy Mara, Laura Kawasse e Márcia Oliveira. Obrigada a cada um de vocês, por todos os momentos e pela boa convivência!

Agradeço em especial à Juliana Zanetti, por ter contribuído grandemente com meu trabalho.

Ao Renan Augusto por ter me ajudado diversas vezes no decorrer do trabalho, obrigada pela paciência e por todo o apoio.

À Renata Nacasaki, o presente em forma de gente que ganhei na pós-graduação, por toda amizade sincera, conselhos e infinitas confidências.

Aos amigos e colegas do Departamento, em especial as meninas do NeuroLabs: Bruna Zanetti, Niele Mendes, Nathália Schiavotelo e Renata Nacasaki, pelos momentos de descontração e convivência.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP, Rosângela Paiva, Rodrigo Miotto, Neide Terezinha, Antônio de Pádua, Maria José, sempre que precisei me ajudaram com prontidão e gentileza, em especial a Camila Gimenes e Felipe Denipotte.

Ao Prof Dr. Francisco Carlos Pereira da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) que me incentivou a fazer pós-graduação na USP sempre mostrando a realidade no âmbito da pesquisa e a tarefa difícil de deixar meu “ninho”, mas que os frutos viriam tanto no crescimento profissional quanto no pessoal.

As que aos poucos se tornaram grandes amigas, que fizeram da minha estadia em Ribeirão uma viagem num trem de alegria, sempre compartilhando momentos bons e divertidos: Beatriz Willemsens, Karina Julia, Graziela Viol, Elisa Mendes, Patrícia Furlan, Natália Carelli, Regina Célia Gatto, Denise Campos, Maria Inês Regina, Fernanda Gomes,

Deborah Bulha, Karina Sarti, Jacqueline Faustino, Tereza Branco, Bruna Moraes e Verônica Argollo. Vocês são ESPECIAS demais!

As meninas e as cooperadoras do Clube Porto Seguro, por me ensinarem a viver com simplicidade, buscando a virtude da caridade, com o sorriso mais doce e o amor mais puro.

À Talita Maia (*in memoriam*), pela mãezona que foi para mim. Agradeço também a Alana Maia e a Sra. Rita por todos os momentos compartilhados, por me deixarem ser da família! Sem esquecer da Juliana Passos e da Ariane Costa.

À Sra. Cacilda Nacasaki, por me ensinar a se doar sempre pelo próximo, obrigada por toda generosidade!

Aos meus tios Sr. Sebastião Leal, Sra. Ana Lúcia e Sra. Silene Oliveira, pelo carinho, incentivo e apoio constantes. Vocês são parte dessa trajetória!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E, *at last but not least*, agradeço a todos das famílias Rodrigues e Duarte, em especial meus pais, Sr. José Duarte e Sra. Selma, por toda grande e incansável dedicação na minha criação e formação e aos meus irmãos, Denis Alisson e Darlisson (meu exemplo), que sempre estiveram ao meu lado apesar da distância, me encorajando e ajudando inúmeras vezes. Eu amo todos vocês!

O que é preciso para ser feliz não é uma vida cômoda,
mas um coração enamorado.

São Josemaria Escrivá

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Uma visão geral da pelve masculina, evidenciando a próstata. Adaptada de Netter F. H., 2014(3).....	16
Figura 2. Zonas da Próstata: ED: ductos ejaculatórios; SV: vesículas seminais; AFS: estroma fibromuscular anterior, zona de transição, zona periférica e zona central(5).....	17
Figura 3 - Esquema representativo das mudanças que ocorrem nos microambientes da célula, até originar-se no CaP. Adaptado de Packer JR (2016) (17).....	19
Figura 4 – Esquema representativo da avaliação do EG antigo e EG atual.	22
Figura 5- Modelo de transdução de sinais em resposta a danos ao DNA mediado por ATM e Chek2. Adaptado de Bartek et al. (2001) (31).....	25
Figura 6 - Exemplos de células neoplásicas de câncer de próstata positivas para o marcador de BRCA2. Marcações citoplasmáticas e nuclear. A - B: <i>Gleason</i> 3+4; C - D: <i>Gleason</i> 4+3; E - F: <i>Gleason</i> =8 e G - H: <i>Gleason</i> 9-10. Imunohistoquímica – aumento de 200x.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e fatores demográficos e clínicos, com o <i>cut-off</i> de BRCA2 15%.....	36
Tabela 2 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e os valores de <i>Gleason</i> , com o <i>cut-off</i> para BRCA2 de 15% e classificação da primeira redefinição do Escore de <i>Gleason</i> (2005).	37
Tabela 3 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e variáveis clinicopatológicas, com o <i>cut-off</i> para BRCA2 de 15%.	38
Tabela 4 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e fatores demográficos e clínicos, com o <i>cut-off</i> de BRCA2 56%.....	41
Tabela 5 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e os valores de <i>Gleason</i> , com o <i>cut-off</i> para BRCA2 de 56% e com classificação de EG atual (2014).....	42
Tabela 6 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e variáveis clinicopatológicas, com o <i>cut-off</i> para BRCA2 de 56%.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*

ATR: *Ataxia telangiectasia and Rad3-related*

BRCA1: *Breast Cancer Gene 1*

BRCA2: *Breast Cancer Gene 2*

CaP: Câncer de Próstata

Chk2: *Checkpoint kinase 2*

DAB: Diaminobenzidina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DSBs: Danos de fita simples

EG: Escore de *Gleason*

FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization*

H&E: Hematoxilina e eosina

HCFMRP – USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –
Universidade de São Paulo

INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

ISUP: Sociedade Internacional de Patologia Urinária

P53: *Tumor Protein 53*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PIN: Lesão Intraepitelial Prostática

PSA: Antígeno Específico Prostático

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

SAM: Serviço de Arquivo Médico

SERPAT: Serviço de Patologia

SSA: Anelamento de fita simples

SSBs: Danos de fita simples

TMA: Microarranjo tecidual

TMPRSS2-ERG: *Transmembrane protease, serine 2*

TNM: Tumor Nódulo Metástase

TR: Toque Retal

UV: Ultravioleta

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Anatomia e Histologia da Próstata.....	16
1.2 Epidemiologia do câncer de Próstata.....	17
1.3 Etiologia e evolução do Câncer de Próstata.....	18
1.4 Diagnóstico do Câncer de Próstata	19
1.4.1 Antígeno Prostático Específico.....	20
1.4.2 Escore de <i>Gleason</i>	21
1.5 BRCA2.....	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos:	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Aspectos éticos	29
3.2 Coleta de dados	29
3.3 Casuística	29
3.4 Microarranjos teciduais (TMA)	30
3.5 Imunohistoquímica (IHQ).....	30
3.6 Análise estatística	31
4. RESULTADOS	33
4.1 Resultado da expressão imunohistoquímica do BRCA2	34
4.2 Relação entre a expressão de BRCA2 e fatores clinicopatológicos com <i>cut-off</i> de BRCA2 15% e classificação do Escore de <i>Gleason</i> antiga (2005).....	35
4.3 Relação entre a expressão de BRCA2 e fatores clinicopatológicos com <i>cut-off</i> de BRCA2 56% e com classificação do Escore de <i>Gleason</i> atual (2014).....	40
5. DISCUSSÃO.....	50

6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS	58
8. ANEXO – COMITÊ DE ÉTICA.....	64

RESUMO

DUARTE, S. R. **Expressão da proteína BRCA2 em prostatectomia e sua correlação com a biópsia em pacientes com câncer de próstata.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O câncer de próstata (CaP) é o tumor maligno mais frequente e uma das principais causas de morte por câncer na população masculina no mundo e no Brasil. Três fatores são de fundamental importância no prognóstico da doença: o estadiamento, o grau histológico (avaliado pelo escore de *Gleason*) e o antígeno prostático específico (*Prostate Specific Antigen* – PSA). Há fatores adicionais descritos que podem influenciar na evolução do câncer, como invasão perineural, invasão angiolinfática, acometimento da cápsula, lateralidade do tumor, estágio tumoral e invasão de linfonodos. Embora a associação entre mutações do BRCA2 e o risco de câncer de próstata esteja bem documentado, pouco se sabe sobre o papel do BRCA2 na progressão do câncer de próstata após o diagnóstico inicial. O presente trabalho se propõe a melhor elucidar o papel da proteína BRCA2 nos carcinomas prostáticos comparando os resultados da expressão proteica de BRCA2 com dados clinicopatológicos de pacientes acometidos por Câncer de Próstata, além de avaliar a expressão de BRCA2 com escore de *Gleason* ≥ 7 após a prostatectomia, tanto na classificação de *Gleason* segundo Epstein 2005, quanto na classificação do grau de *Gleason* definida em 2014 com suas respectivas biópsias por agulha. Dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, foram selecionados 125 blocos de parafina com amostras de câncer de próstata diagnosticados entre 2005 e 2010. As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram utilizadas para a construção de microarranjos teciduais (TMAs). Nesses TMAs foi realizado estudo imunohistoquímico para BRCA2. A proteína BRCA2 com ponto de corte de 15% (classificação antiga) foi superexpressa em 118 casos (94,4%), enquanto a expressão de BRCA2 com *cut-off* de 56% (classificação nova) foi expressa em 63 (51,2%) de 125 casos. A superexpressão de BRCA2 associada a classificação antiga de *Gleason* correlacionou-se com bilateralidade do tumor e com estágio tumoral, em contrapartida a expressão de BRCA2 associada a atual classificação se correlacionou apenas com lesão intraepitelial prostática (PIN). Nossos resultados indicam que a expressão de BRCA2 pode ser um biomarcador importante de progressão tumoral nos carcinomas de próstata.

Palavras – chave: BRCA2. Câncer de Próstata. Escore de *Gleason*. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

DUARTE, S. R. **Expression of BRCA2 protein in prostatectomy and its correlation with biopsy in patients with prostate cancer.** 2016. Dissertation (M.Sc.) - Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirao Preto, 2016.

Prostate cancer (PCa) is the most common malignancy and a major cause of cancer death in male population in the world and in Brazil. Three factors are of fundamental importance in the prognosis of the disease: the staging, histological grade (measured by *Gleason* score) and the Prostate Specific Antigen (PSA). There are additional factors described that may influence the development of cancer, such as perineural invasion, angiolymphatic invasion, capsule involvement, tumor laterality, tumor stage and lymph node invasion. Although the association between mutations in Breast Cancer Gene 2 (BRCA2) and the risk of prostate cancer is well documented, little is known about the role of BRCA2 in the progression of prostate cancer after initial diagnosis. This study aims to elucidate the role of BRCA2 protein in prostate carcinomas comparing the results of the BRCA2 protein expression with clinicopathological data of patients with prostate cancer. For that reason, we evaluated the expression of BRCA2 with *Gleason* score ≥ 7 after prostatectomy, both in the second Epstein 2005 *Gleason* score, and in the classification of *Gleason* grade set in 2014 with their respective needle biopsies. 125 paraffin blocks with prostate cancer samples diagnosed between 2005 and 2010 were selected from the archives of Hospital Pathology Service of the Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo. The slides stained with hematoxylin and eosin (H&E) were used for the construction of the tissue microarrays (TMAs). These TMAs was performed immunohistochemical study for BRCA2. The BRCA2 protein with a *cut-off* point of 15% (old classification) was overexpressed in 118 cases (94.4%), while the expression of BRCA2 *to cut off* 56% (new classification) was expressed in 63 (51.2%) of 125 cases. The BRCA2 associated overexpression of the old classification of *Gleason* presented correlation with tumor bilateralism and tumor stage, however BRCA2 expression associated with the current classification was correlated only with Prostatic Intraepithelial Lesion (PIN). Our results indicate that BRCA2 expression can be an important marker of tumor progression in prostate carcinomas.

Keywords: BRCA2. Prostate cancer. *Gleason* score. Immunohistochemistry.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia e Histologia da Próstata

A próstata é a maior glândula acessória do aparelho reprodutor masculino. A função primordial da próstata é secretar um fluido alcalino que forma parte do ejaculado, e que irá auxiliar na motilidade e nutrição do espermatozoide (Figura 1) (1). A próstata normal, em homens adultos, apresenta aproximadamente vinte gramas, podendo ser sentida através do toque retal e mede cerca de três centímetros de comprimento, quatro centímetros de largura e dois centímetros de profundidade, podendo variar com a idade. A parte glandular ocupa cerca de dois terços da próstata, o outro terço é fibromuscular (2).

Figura 1. Uma visão geral da pelve masculina, evidenciando a próstata. Adaptada de Netter F. H., 2014(3).

A divisão da próstata, comumente, mais conhecida e utilizada nos dias de hoje é constituída por zonas, da seguinte forma (Figura 2) (4, 5):

- Zona de transição: A zona de transição constitui apenas 5% do tecido glandular /e consiste em dois lóbulos pequenos de tecido glandular que circundam apenas a uretra prostática proximal.

- Zona central: A zona central está localizada na base da próstata entre as zonas periféricas e de transição e conta com aproximadamente 25% de tecido glandular. É uma estrutura com formato de cone que envolve os ductos ejaculatórios.
- Zona periférica: A zona periférica é a maior das zonas, que compreende cerca de 70% do tecido glandular. Estende-se desde a base até o vértice ao longo da superfície posterior e rodeia a uretra (5).

Figura 2. Zonas da Próstata: ED: ductos ejaculatórios; SV: vesículas seminais; AFS: estroma fibromuscular anterior, zona de transição, zona periférica e zona central(5).

A próstata pode ser dividida também em grupos glandulares internos e externos. No grupo glandular interno incluem as glândulas mucosas e as submucosas. Enquanto que no grupo externo, as glândulas externas, podem ser chamadas de glândulas prostáticas. Essas glândulas prostáticas são constituídas por ácinos e ductos excretores revestidos por células cúbicas ou cilíndricas altas com núcleo em posição basal. As células basais da próstata, ao contrário do que ocorre na mama e nas glândulas salivares, não tem função mioepitelial (função de eliminar a secreção do interior da célula para o interior do ácino), exercendo o papel de células de reserva e diferenciando-se em células epiteliais secretoras. O estroma prostático é constituído por tecido fibroso e muscular liso, com quantidade variável de fibras elásticas (6)(7).

1.2 Epidemiologia do câncer de Próstata

O câncer de próstata é um dos tumores sólidos mais graves e de maior incidência nos homens. Segundo dados disponíveis até o momento, o câncer de próstata é considerado o segundo câncer mais comum em homens em todo o mundo, com mais de 1,1 milhões de casos registrados no ano de 2012, sendo dois terços dos casos diagnosticados nas regiões mais desenvolvidas. É a 15ª principal causa de morte por neoplasias, em homens, com uma estimativa de 307.000 mortes em todo o mundo em 2012 (8).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva (INCA) estima-se para o Brasil no ano de 2016 que 61.200 casos novos de câncer de próstata em homens sejam diagnosticados. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais incidente em todas as regiões do país, com 95,63/100 mil no Sul, 67,59/100 mil no Centro-Oeste, 62,36/100 mil no Sudeste, 51,84/100 mil no Nordeste e 29,50/100 mil na região Norte. A explicação para esse aumento das taxas de incidência ao longo dos anos é atribuída ao aumento da expectativa de vida, a melhoria e evolução tanto dos métodos diagnósticos, quanto da qualidade dos sistemas de informação do país, além da ocorrência de sobrediagnóstico, em função da disseminação do rastreamento de câncer de próstata com o Antígenos Específico Prostático (PSA) e toque retal, influenciando na magnitude da doença (9).

O índice de mortalidade dessa neoplasia demonstra um perfil ascendente, porém de magnitude menor do que o índice verificado para sua incidência. No Brasil, em 2013, ocorreram quase 14 mil mortes por câncer de próstata. Os programas de controle da doença também contribuem para a redução da mortalidade, porém em menor escala, pois, os métodos de rastreamentos atuais, como o PSA, não mostraram, até o momento, sucesso na redução da mortalidade [9].

1.3 Etiologia e evolução do Câncer de Próstata

A inflamação é uma ocorrência comum na próstata e vem sendo apontada como o primeiro evento etiológico do câncer de próstata (10). As células inflamatórias e mediadoras podem desestabilizar o genoma das células, danificando o DNA ou afetando os *checkpoints* e os sistemas de reparo (11). A instabilidade genética implantada, condicionada a rápidas divisões celulares somáticas, resultam em uma população genomicamente heterogênea quanto a sua capacidade proliferativa, metastática e de evasão do sistema imune, caracterizando o Câncer de Próstata (CaP) (12).

O carcinoma prostático geralmente evolui através de uma série de fases definidas: a partir de uma neoplasia intraepitelial prostática (PIN), progride para o CaP localizado, posteriormente torna-se invasivo, eventualmente, culmina para câncer metastático (13). Em aproximadamente 80% dos casos de CaP há presença concomitante de PIN (Figura 3). PIN é considerada 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 (14, 15).

Os maiores fatores de risco identificados para o câncer de próstata são: idade, história familiar de câncer e etnia/cor da pele. Entretanto, no momento atual, a idade é um dos fatores de risco bem estabelecido para o desenvolvimento do câncer de próstata. A maioria dos cânceres de próstata é diagnosticada em homens acima dos 65 anos, sendo que somente menos de 1% é diagnosticado em homens abaixo dos 50 anos [9].

A etnia/cor da pele também apresenta associação com o câncer de próstata. Aproximadamente, o câncer de próstata é 1,6 vezes mais comum em homens negros quando comparados aos homens brancos. Apesar disso, é possível que essa diferença entre negros e brancos se dê em função do estilo de vida ou dos fatores associados à detecção da doença [9].

Além da idade e raça, outro fator de risco estabelecido para câncer de próstata é uma história familiar da doença. O risco familiar é maior quatro vezes mais do que para a população em geral para parente de primeiro grau de homens com câncer de próstata diagnosticados com menos de 60 anos (16).

Figura 3 - Esquema representativo das mudanças que ocorrem nos microambientes da célula, até originar-se no CaP. Adaptado de Packer JR (2016) (17).

1.4 Diagnóstico do Câncer de Próstata

A maioria dos pacientes com CaP são assintomáticos, principalmente nos estágios iniciais dessa patologia. Os sintomas mais comuns estão relacionados a dificuldades para expelir a urina, jato fraco, aumento do número de micções e incontinência urinária (17).

Os parâmetros atuais mais usados para predizer o risco da doença confinada ao órgão são: Toque Retal (TR), PSA e Escore de *Gleason* (EG) (18). O TR é uma das ferramentas utilizadas na triagem do CaP, embora tenha baixa confiabilidade, já que somente as porções posterior e lateral da próstata, podem ser palpáveis.

1.4.1 Antígeno Prostático Específico

O PSA é uma glicoproteína de cadeia simples e encontrada em altos níveis no epitélio da próstata e foi identificada por Wang em 1979, através do isolamento e caracterização de proteínas do plasma seminal e posteriormente no soro (19). É secretado no líquido seminal em altas concentrações, apresenta-se em concentrações mais baixas no fluido seminal e em maior quantidade como proteína sérica. No sêmen, sua principal função é liquefazer o coágulo seminal após a ejaculação e permitir o movimento dos espermatozoides no trato genital feminino (20). Da família das calicreínas, é o marcador tumoral mais utilizado para detecção do câncer de próstata, mas não é ideal porque não tem 100% de sensibilidade podendo, assim, resultar em falsos positivos ou falsos negativos.

Qualquer alteração na arquitetura da glândula prostática permite que maiores concentrações de PSA entrem na circulação. Infelizmente, outras doenças da próstata como a hiperplasia prostática e inflamação crônica também causem aumento do PSA liberado na circulação, diminuindo a utilidade do PSA como teste diagnóstico (21).

O ponto de corte tradicionalmente utilizado para o teste de PSA é de 4ng/Dl. Nesta concentração, estima-se que a sensibilidade do teste de PSA gira em torno de 70 a 80%, enquanto a especificidade em torno de 60 a 70% (22). Apesar das controvérsias referente a sensibilidade e especificidade desse marcador e a incerteza sobre o nível máximo para solicitar uma biópsia, o PSA foi incorporado a vários nomogramas preditivos do estágio patológico e de recorrência tumoral, juntamente com o EG (23, 24).

Quando o paciente diagnosticado com CaP inicia o tratamento, o nível sérico do PSA vai diminuindo aos poucos, após a cirurgia radical da próstata a queda é mais rápida, seguido da radioterapia e reposição hormonal. Essa queda no nível sérico de PSA tem relação direta com o estadiamento clínico e patológico da doença (25).

Visto que o CaP pode ser detectado com níveis séricos $\leq 4,0\text{ng/DL}$, se faz necessário a dosagem anual nos exames preventivos. Exames de imagem também são usados no diagnóstico e estadiamento da doença, entre os quais a ressonância magnética, cintilografia óssea, tomografia computadorizada e, o mais utilizado, ultrassonografia transretal guiada por biópsia (26)

1.4.2 Escore de *Gleason*

A graduação de *Gleason* é uma graduação histológica e é a mais utilizada atualmente. No ano de 2005 houve uma reunião com o intuito de incorporar as mudanças significativas realizadas com base na classificação de *Gleason* de 1967-1973.

De acordo com a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP), no ano de 2005, a classificação do escore de *Gleason* era obtida 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 resultaria no escore final. Com a soma o sistema é graduado de 2 a 10, sendo dois o menos agressivo e dez o mais agressivo. Considera-se tumores com EG igual a sete (3+4 ou 4+3) com agressividade intermediária e que estavam agrupados na mesma categoria. Tumores com EG maiores ou iguais a oito eram considerados agressivos. (27).

A classificação do Escore de *Gleason*, segundo ISUP de 2005, baseado na soma de dois padrões, era da seguinte forma:

1. Glândulas uniformes e pequenas;
2. Mais estroma entre as glândulas;
3. Margens distintamente infiltrativas;
4. Massas irregulares de células neoplásicas com poucas glândulas;
5. Ausência ou presença de algumas glândulas, sem camada de células.

Em 2014, profissionais da área de patologia urinária reconheceram a necessidade de modificar certas questões que não ficaram bem resolvidas na classificação do escore de *Gleason* em 2005.

A determinação do EG igual a sete, se dá de duas formas, 3+4 ou 4+3. Em vista disso, do escore de *Gleason* estar agrupado numa única categoria e ser visto como o comportamento intermediário foi analisado e discutido em nova reunião, no ano de 2014, que esses dois grupos podem apresentar comportamentos biológicos diferentes. Segundo a nova classificação da

graduação de *Gleason*, pela ISUP (2014), os valores iguais a sete apresentarão em grupos separados, ou seja, grupo 2 corresponde a 3+4, o que tem mostrado ser menos agressivo que o grupo 3 (4+3) (28, 29). O grupo 1, dessa nova classificação, corresponde a ≤ 6 , grupo 4, qualquer soma igual a 8 e o grupo 5, corresponde a valores 9 e 10.

A caracterização histológica atual (Figura 4) é dada da seguinte forma:

O Grupo 1 ($EG \leq 6$) é caracterizado por apenas glândulas individuais bem formadas, o Grupo 2 (3+4) apresenta glândula predominantemente bem formada com um menor número de componentes de formação cribriforme. O Grupo 3 (4+3) as glândulas são predominantemente malformadas com poucos componentes bem formados. Caracteriza-se o Grupo 4 ($EG 4+4=8$; $3+5=9$ e $5+3=8$) apenas glândulas malformadas; glândulas predominantemente bem formadas e que apresentam pouca falta de componentes; predominantemente glândulas com falta de componentes e poucos componentes de glândulas bem formadas, respectivamente. O Grau 5 apresenta falta de formação na glândula (ou com necrose) com glândulas cribriformes malformadas (29).

Figura 4 – Esquema representativo da avaliação do EG antigo e EG atual.

Além do TR, PSA e EG, o estágio tumoral é também um parâmetro importante capaz de prever o risco da doença, contribuindo para eleição terapêutica e para avaliação do prognóstico de CaP (30). O estadiamento avalia a extensão anatômica do tumor. A classificação TNM (T- extensão do tumor primário, N- ausência ou presença e extensão de metástase em

linfonodos e M- ausência ou presença de metástase à distância) é admitida internacionalmente para descrever e comparar padrões da doença e a melhor conduta para o tratamento. Os pacientes, então, podem ser classificados em baixo, médio e alto risco de acordo com dados da biópsia, PSA e o escore de *Gleason* (30). A confirmação do diagnóstico do CaP é feita pelo estudo histológico do tecido oriundo da biópsia por agulha, que deve ser realizada sempre que houver anormalidades do TR e/ou dosagem de PSA (31-34).

1.5 BRCA2

O resultado da codificação do gene BRCA2 (*Breast Cancer Gene 2*) efetua um papel importante no reparo de dano ao DNA, protegendo a integridade do genoma durante o ciclo celular. Em vista disso uma mutação de importância clínica, que ocasione alterações na função da proteína, poderia modular o risco para desenvolvimento de câncer (35-38).

Ainda que o câncer seja descrito como uma doença multifatorial, onde fatores inerentes ou não ao hospedeiro estão envolvidos, informa-se que um dos fatores principais para introdução deste é o descontrole do ciclo celular, especificamente defeitos nas vias de reparação do DNA (39, 40).

Entre os genes da rede de checagem há uma interação, que possibilita novas mutações no DNA, criando, dessa forma, novas vias para o desenvolvimento de câncer. Os genes BRCA1 (*Breast Cancer Gene 1*) e BRCA2 são os principais supressores associados ao câncer de mama, mas que vem sendo estudados em outros tipos de câncer, como próstata, bexiga, ovário dentre outros (35, 37, 41). O genoma está sempre suscetível a danos devido tanto a agentes exógenos (fatores ambientais como radiação solar), quanto a agentes endógenos (imunológico e metabólico) (39, 40).

A solução ao DNA danificado entre os diferentes pontos de checagem é única, confirmando a célula capacidade de barrar e/ou tardar o ciclo celular em inúmeros pontos, iniciando entre G1/S e finalizando na fase inicial da prófase. A célula, também, durante esse processo de reparo é capaz de converter-se com autonomia, indiferente aos sinais extracelulares (39).

O reparo efetivo de danos ao DNA necessita de mecanismos celulares propícios, com a transdução desse sinal para proteínas efetoras *downstream*, incluídas na interrupção do ciclo celular e reparo de danos. A princípio as proteínas quinases ATM e ATR são as sensibilizadas.

Falhas à ATM excluem os pontos de checagens nas transições entre as fases G1-S, na fase S, e entre G2 e M (42). A proteína ATM é recrutada na existência de falhas decorrentes de exposições a radiações ionizantes, os danos de fita dupla (DSBs); todavia a ATR está atinente a falhas por exposições à luz UV, os danos de fita simples (SSBs).

Após o recrutamento das quinases referentes à família fosfatidilinositol (PIK), ATM (*Ataxia telangiectasia*) e ATR (*Ataxia telangiectasia and RAD53-related*), os sinais das falhas ao DNA são transduzidos e amplificados pelas serino-treonino quinases funcionalmente complementares, Chek1 e Chek2, das quais 24 passam o sinal aos efetores *downstream* da rede de checagem, como a proteína p53, as proteínas da família Cdc25A e Cdc25C e as proteínas BRCA1 e BRCA2 (39, 40).

A fosforilação da Ser20 de p53 por Chek2 efetiva a proteína p53 e amplifica sua capacidade de funcionar positivamente a expressão de fatores relacionados em três processos: (1) reparo do DNA por recombinação homóloga (HR), junção de extremidades não homólogas (NHEJ), ou anelamento de fita simples (SSA); (2) morte celular; e (3) controle do ciclo celular – bloqueando a transição entre G1 e G2/M (39, 40, 43).

BRCA1 é outro substrato de Chek2, sendo uma das proteínas principais da rede de checagem incluídas na regulação de processos de reparo como NHEJ e possivelmente apoptose. A fosforilação da Ser988 de BRCA1 por Chek2 é essencial para a liberação de BRCA1 do complexo com Chek2, sendo este evento imprescindível para sobrevivência da célula depois do dano causado ao DNA (Figura 5). Considera-se que a proteína BRCA2 está relacionada em processos de reparo de danos ao DNA semelhante à proteína BRCA1 (39, 42, 44). Na Figura 5, verifica-se o modelo de transdução de sinais de danos ao DNA mediado pelas proteínas ATM e Chek2.

Figura 5- Modelo de transdução de sinais em resposta a danos ao DNA mediado por ATM e Chk2. Adaptado de Bartek et al. (2001) (31).

As alterações herdadas pelo gene supressor tumoral BRCA2 têm sido observadas em diferentes tumores como nos cânceres de mama, ovário, pâncreas, estômago e próstata (38, 45). As mutações no BRCA2 também estão associadas com uma menor sobrevivência entre pacientes com CaP, mas pouco se sabe sobre o papel biológico da proteína BRCA2 na progressão do CaP (46, 47).

Há indícios que a proteína BRCA2 tenha uma função importante no núcleo celular, promovendo reparo de DNA por recombinação homóloga (48). Apesar de BRCA2 não ter a função descrita na membrana celular, a proteína BRCA1 a qual também está relacionada com instabilidade genômica no núcleo foi recentemente relacionada a migração e motilidade de células cancerígenas através de sua atividade na membrana celular (49). Nas células de CaP de indivíduos não-portadores recentemente diagnosticados ou de indivíduos da população geral ainda não foi estudado se os níveis proteicos de BRCA2 poderiam auxiliar na progressão da doença (50, 51).

Dentre as proteínas de maior interesse na busca para um biomarcador em CaP estão as que estão envolvidas no ciclo celular, como por exemplo BRCA2. Esta proteína tem sido analisada por várias técnicas diferentes, mas são poucos os relatos com a técnica de imunohistoquímica. Para melhor predizer o prognóstico de pacientes com CaP e, assim, ajustar o tratamento apropriado, vários fatores prognósticos moleculares são discutidos na literatura. Assim, o presente trabalho propõe melhor elucidar a expressão de BRCA2 em CaP comparando as classificações do Escore de *Gleason* da prostatectomia, tanto de 2005 quanto da atual (2014) com a biópsia pré-cirúrgica, além de comparar com os dados clinicopatológicos.

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a expressão da proteína BRCA2 em prostatectomia e sua correlação com a biópsia em pacientes com câncer de próstata

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a expressão de BRCA2 em pacientes com câncer de próstata na classificação antiga (2005) de *Gleason* e na atual classificação de *Gleason* (2014), ambas segundo ISUP.
- Avaliar a expressão de BRCA2 em pacientes que foram submetidos a prostatectomia com escore de *Gleason* ≥ 7 , tanto na classificação de *Gleason* no ano de 2005, quanto a classificação do grau de *Gleason* de 2014, e que nas suas respectivas biópsias o grau de *Gleason* apresentava-se ≤ 7 .
- Analisar a expressão de BRCA2 em câncer de próstata nas duas classificações de *Gleason* e correlacionar com variáveis clinicopatológicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP – HCFMRP (Processo HCRP nº 11904/2014). Em seguida foi cadastrado na Plataforma Brasil para autorização da pesquisa.

3.2 Coleta de dados

Os dados clínicos e alguns dados anatomopatológicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico (SAM) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.3 Casuística

Dos arquivos do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto foram selecionados 154 blocos de parafina com amostras de câncer de próstata, diagnosticados entre os anos de 2005 e 2010. Foram analisados em prontuários, os seguintes dados: idade, cor, PSA pré-operatório, valor do *Gleason* da biópsia pré-operatória ≤ 7 , valor do *Gleason* após a prostatectomia ≥ 7 , se houve invasão perineural, invasão angiolinfática, acometimento da cápsula, invasão extraprostática, lateralidade tumoral, PIN, estágio tumoral e acometimento de linfonodos. Alguns casos foram descartados na análise estatística devido à área escolhida no bloco já ter sido, anteriormente, perfurada e retirada. Com essa adversidade foi selecionado uma região próxima da que tinha sido escolhida, no entanto essa não apresentava tumor. Outro fato foi a ausência de material (tecido) no corte do microarranjo tecidual (TMA do inglês “*tissue microarray*”), totalizando, assim, uma amostra de 125 casos.

A maioria dos pacientes em estudo diagnosticaram a doença em outra unidade hospitalar, executando biópsia (pré-operatória) fora do Hospital das Clínicas da FMRP, por isso não tivemos acesso a esses blocos. À vista disso, utilizamos a classificação do *Gleason* antiga (2005). Após submeterem a remoção da próstata no HCFMRP-USP, fizemos duas análises. Na primeira análise dividimos o EG em dois grupos, um grupo representando valores de EG = 7 e outro com EG ≥ 8 , seguindo os critérios da classificação do *Gleason* antiga (2005). Em contrapartida, na nossa segunda análise reagrupamos os casos de acordo com a nova

classificação de *Gleason* (2014) em 4 grupos: Grupo 2 (EG 3+4), Grupo 3 (EG 4+3), Grupo 4 (EG =8) e Grupo 5 (EG =9 ou 10).

Selecionou-se apenas uma biópsia por paciente e, para cada caso, foram revisadas todas as lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para confirmar o diagnóstico de câncer de próstata e selecionar o bloco de parafina mais representativo para confecção dos TMAs.

3.4 Microarranjos teciduais (TMA)

A seleção dos fragmentos foi realizada através da análise de lâminas arquivadas, previamente coradas com hematoxilina e eosina, sendo revisadas por um patologista (ARS) para delimitar a área mais significativa de cada tumor. A partir dos blocos de parafina correspondente aos fragmentos mais representativos de cada tumor, foram feitos os TMAs pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Para a confecção dos blocos de TMA, de cada um dos 125 blocos de parafina doadores, previamente marcados, foram retirados cilindros de 2mm de diâmetro e ordenados dentro de um bloco de parafina receptor utilizando o equipamento *Tissue Microarray Builder Kit (TMA)* (Histopathology LLtd., Hungary). A partir de cada bloco de TMA, foram feitos cortes histológicos de 4µm de espessura em micrótomo rotativo convencional (Leica RM2125RTS, China). Em nosso estudo utilizamos 7 blocos de TMA's, com um cilindro para cada paciente. Entre eles, um foi corado com H&E para confirmar a presença de tumor em microscópio de luz convencional. Após a confirmação, foram postos em lâminas de vidro silanizadas para a realização do método de imunohistoquímica.

3.5 Imunohistoquímica (IHQ)

Para a imunohistoquímica utilizou-se um corte para cada bloco de TMA. Todas as amostras teciduais foram, de acordo com a rotina do laboratório e com protocolos pré-estabelecidos, fixadas em formalina neutra 4% e embebidas em parafina. Para esta técnica as reações foram realizadas utilizando-se o kit Biocare Medical, Mach4 Universal, HRPPolymer Detection System. Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em uma série de álcoois (96%, 75% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito através de uma solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio. Após esse bloqueio os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em panela a vapor com tampão citrato à 10mM por 40 minutos. Em

seguida, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e incubadas por 60 minutos com o anticorpo primário.

Para esse estudo nós utilizamos o anticorpo primário BRCA2 (Sigma-Aldrich; Policlonal) com diluição de 1:100.

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram submetidos ao bloqueio pós anticorpo primário por 15 minutos e então incubados com o polímero por mais 30 minutos (ambos parte do kit Biocare Medical, Mach4 Universal, HRP-Polymer Detection System). A reação foi corada pelo diaminobenzidina (DAB, Sigma, USA) e contra-coradas com hematoxilina. Os cortes foram novamente desidratados em uma série de álcoois e as lâminas cobertas por lamínula, com auxílio de Entellan (Merck, Alemanha). Para controle positivo do BRCA2 utilizou-se tecido hepático. Controles negativos foram realizados suprimindo os anticorpos primários. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional acoplado a câmera fotográfica (Leica, DM 4000B, Alemanha). Durante a análise dos cilindros dos TMAs, qualquer marcação citoplasmática e nuclear foi considerada positiva. Para cada amostra foi fotografada 11 campos. Na objetiva de 5x, observamos a visão geral contida no cilindro, e na objetiva de 20x, foram feitas 10 fotografias. Dessa forma contamos as células positivas e negativas. Para atingir essa finalidade, utilizamos o software ImageJ (1,49v, National Institutes of Health, USA) o qual contabilizamos em porcentagens as células marcadas com o anticorpo e as não marcadas, totalizando 100% da área de cada cilindro.

Como a proteína BRCA2 possui um alto peso molecular e sua purificação para ensaios quantitativos *in vitro* só aconteceu recentemente, não encontramos *cut-off*. No nosso primeiro estudo, utilizamos o *cut-off* do BRCA1 de 15% descrito na literatura por Mitra e colaboradores (52), acima dessa porcentagem de células marcadas era considerada um caso positivo de malignidade. Para nosso segundo estudo, quando utilizamos este ponto de corte não obtivemos resultados no programa de estatística, então, seguimos o critério estabelecido por Di Leo e Colaboradores, 2001(53). A partir do percentual de células marcadas para cada caso, encontramos o valor da mediana de 56%, valor esse utilizado como o *cut-off* do nosso segundo estudo. Foram considerados, portanto, positivos os casos com mais de 56% de células marcadas.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software IBM SPSS, versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago IL, EUA). A relação entre a expressão do BRCA2 com as variáveis

clinicopatológicas foi devidamente testada com tabelas cruzadas aplicando-se o teste de qui-quadrado (quando houve três ou mais variáveis) ou o teste exato de Fisher (para duas variáveis). Todos, realizados em duplicata. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4.1 Resultado da expressão imunohistoquímica do BRCA2

Com o estabelecimento dos pontos de corte realizamos testes entre a expressão de BRCA2 em relação as variáveis histopatológicas e achados clínicos correspondentes as duas classificações do Escore de *Gleason*.

Para o estudo com o ponto de corte 15%, 118 casos (94,4%) apresentaram expressão de BRCA2 positiva, enquanto a expressão positiva de BRCA2 com ponto de corte 56% apresentou-se somente em 63 casos (50,4%).

A expressão de BRCA2 foi observada em núcleo e citoplasma de células tumorais da próstata (Figura 5).

A idade média dos 125 pacientes foi de $\pm 63,2$ anos, a prevalência na cor da pele dos pacientes foi branca (85,6%), com média de PSA total pré-operatório de $\pm 10,7$ ng/DL.

4.2 Relação entre a expressão de BRCA2 e fatores clinicopatológicos com *cut-off* de BRCA2 15% e classificação do Escore de *Gleason* antiga (2005)

A associação entre cor e expressão de BRCA2 demonstrou que 80,8% dos brancos apresentaram expressão positiva de BRCA2. Os 06 pacientes mulatos apresentaram expressão positiva para BRCA2. No grupo de pacientes de cor parda, 8,8% demonstraram positividade para BRCA2 positivo ($p>0,05$).

Nesse estudo 10 pacientes (8%) apresentaram expressão para esse marcador com $PSA \leq 4,0\text{ng/DL}$. Enquanto 86,4% dos casos, apresentaram expressão positiva para BRCA2 com valores de $PSA \geq 4,1\text{ng/DL}$ (Tabela 1).

Segundo a classificação do EG no ano de 2005, 79,2% dos pacientes apresentaram expressão positiva para BRCA2 com $EG = 7$. Apenas 15,2% apresentou $EG \geq 8$ com expressão de BRCA2 positiva.

O EG da biópsia pré-cirúrgica e a expressão de BRCA2 mostraram que 51,2% dos casos apresentaram expressão positiva quando o EG foi ≤ 6 . Em contrapartida, 43,2% quando o EG foi $= 7$. Esses dados estão demonstrados na Tabela 2. A associação entre os valores de *Gleason* da biópsia pré-operatória, seguindo a classificação de *Gleason* antiga (2005), e a expressão do BRCA2 apontou resultado estatístico com $p > 0,05$. Dos 67 casos com $Gleason \leq 6$, 32 (25,6%) exibiram expressão positiva para BRCA2. Quando o valor de *Gleason* foi $= 7$ dos 58 pacientes, 31 (24,6%) mostraram expressão positiva. Esses dados estão melhor demonstrados na Tabela 2.

Nos achados clinicopatológicos, descritos na Tabela 3, a expressão positiva de BRCA2 foi vista 64,8% quando havia Invasão perineural, enquanto 29,6% não apresentava esse tipo invasão. No grupo BRCA2 positivo observamos que 109 (87,2%) pacientes não apresentaram Invasão angiolinfática, enquanto que em 9 pacientes (7,2%) esteve presente ($p>0,05$), ambos para a expressão positiva de BRCA2.

O Acometimento capsular em relação a expressão de BRCA2 positiva foi visto em 42,4%, em contrapartida a ausência foi vista em 52% dos casos, com correlação estática de $p \geq 0,05$. A ausência de Invasão extraprostática esteve em 64,8% em relação a expressão positiva de BRCA2, estando presente em 29,6% dos casos. A Lesão Intraepitelial esteve presente em 39,2% dos casos e sua ausência em 55,2% quando relacionados com a expressão da proteína BRCA2.

Em relação a expressão positiva do BRCA2 com a lateralidade tumoral, são vistos 99 casos (79,2%) como tumores bilaterais, entretanto apenas 19 casos (15,2%) apresentaram tumores unilaterais ($p=0,023$)

O estágio patológico tumoral (TNM) mais evidenciado foi pT2c (59,2%), a qual apresentou expressão positiva para BRCA2 em 54,4, $p=0,038$.

Tabela 1 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e fatores demográficos e clínicos, com o *cut-off* de BRCA2 15%.

BRCA2 (n=125)					
	Negativo	%	Positivo	%	<i>p</i>
	n=7	5,6	n=118	94,4	
Idade					1,000
≤ 55	1	0,8	17	13,6	
≥ 56	6	4,8	101	80,8	
Cor					0.769
Branco	6	4,8	101	80,8	
Pardo	1	0,8	11	8,8	
Mulato	0	0	6	4,8	
PSA Pré-Operatório					1,000
≤ 4,0	0	0	10	8	
≥ 4,1	7	5,6	108	86,4	

Nota: Os valores de **n** representam o número de casos de BRCA2: negativo (7) e positivo (118), pela análise imunohistoquímica.

Tabela 2 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e os valores de *Gleason*, com o *cut-off* para BRCA2 de 15% e classificação da primeira redefinição do Escore de *Gleason* (2005).

BRCA2 (n=125)					
	Negativo	%	Positivo	%	<i>p</i>
	n=7	5,6	n=118	94,4	
<i>Gleason</i> após a prostatectomia					1,000
≤7	6	4,8	99	79,2	
≥8	1	0,8	19	15,2	
<i>Gleason</i> Biópsia					0,703
≤6	3	2,4	64	51,2	
≥7	4	3,2	54	43,2	

Nota: Os valores de **n** representam o número de casos de BRCA2: negativo (7) e positivo (118), pela análise imunohistoquímica.

Tabela 3 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e variáveis clinicopatológicas, com o *cut-off* para BRCA2 de 15%.

BRCA2 (n=125)					
	Negativo	%	Positivo	%	<i>p</i>
	n=7	5,6	n=118	94,4	
Invasão perineural					0,674
Ausência	1	0,8	37	29,6	
Presença	6	4,8	81	64,8	
Invasão angiolinfática					1,000
Ausência	7	5,6	109	87,2	
Presença	0	0	9	7,2	
Acometimento capsular					0,086
Ausência	4	3,2	65	52	
Presença	3	2,4	53	42,4	
Invasão extraprostática					0,674
Ausência	6	4,8	81	64,8	
Presença	1	0,8	37	29,6	
Invasão de linfonodos					1,000
Ausência	7	5,6	116	92,8	
Presença	0	0	2	2,6	

					0,091
PIN					
Ausência	4	3,2	69	55,2	
Presença	3	2,4	49	39,2	
Lateralidade Tumoral					0,023
Unilateral	0	0	19	15,2	
Bilateral	7	5,6	99	79,2	
Estágio Tumoral					0,038
pT2a	0	0	8	6,4	
pT2b	0	0	6	4,8	
pT2c	6	4,8	68	54,4	
pT3a	1	0,8	14	11,2	
pT3b	0	0	22	17,6	

Nota: Os valores de **n** representam o número de casos de BRCA2: negativo (7) e positivo (118), pela análise imunohistoquímica.

De acordo com a análise estatística da expressão de BRCA2 com valor de *cut off* 15% e utilizando a classificação do Escore de *Gleason* de 2005, ela se correlacionou com lateralidade tumoral, com $p=0,023$ e estágio patológico tumoral com $p=0,038$.

4.3 Relação entre a expressão de BRCA2 e fatores clinicopatológicos com *cut-off* de BRCA2 56% e com classificação do Escore de *Gleason* atual (2014).

A associação entre cor e expressão de BRCA2 demonstrou que 42,4% dos brancos presentes no estudo teve expressão de BRCA2 positiva. Os pacientes mulatos se distribuíram igualmente, com expressão do marcador estudado de 2,4% (3 casos) tanto para negativo quanto para positivo. No grupo de pacientes de cor parda, 5,6% demonstraram positividade para BRCA2 positivo ($p>0,05$), como descritos na Tabela 4.

Os resultados entre PSA pré-operatório e a expressão de BRCA2 demonstraram que 6 pacientes (4,8%) com $PSA \leq 4,0\text{ng/DL}$ apresentaram expressão de BRCA2 positiva; cinquenta e sete pacientes (45,6%) possuíam valores de $PSA \geq 4,1\text{ng/DL}$ no grupo com expressão de BRCA2 positiva ($p>0,05$).

De acordo com a nova classificação de *Gleason* (2014), os grupos com valores de *Gleason* após a prostatectomia não apresentaram correlação positiva ($p>0,05$) em relação a expressão de BRCA2 para o teste de associação entre as variáveis qualitativas. Dos 77 casos que pertenciam ao grupo 3+4, quarenta e quatro casos (35,2%) apresentaram expressão de BRCA2 positiva. No grupo 4+3, o qual havia vinte e sete casos, apenas 11 (8,8%) tiveram expressão positiva. No grupo que representou o *score* de *Gleason* = 8, que foram 12 casos, somente cinco obtiveram a expressão positiva. No último grupo do estudo, grupo representado pelos valores de *Gleason* iguais a 9 ou 10, dos nove (8,8%) casos, apenas dois (4%) foram marcados com a expressão de BRCA2 positiva.

A associação entre os valores de *Gleason* da biópsia pré-operatória, seguindo a classificação de *Gleason* antiga (2005), e a expressão do BRCA2 apontou resultado estatístico com $p > 0,05$. Dos 67 casos com $Gleason \leq 6$, 32 (25,6%) exibiram expressão positiva para BRCA2. Quando o valor de *Gleason* foi =7 dos 58 pacientes, 31 (24,6%) mostraram expressão positiva. Esses dados estão melhor demonstrados na Tabela 5.

Tabela 4 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e fatores demográficos e clínicos, com o *cut-off* de BRCA2 56%.

BRCA2 (n=125)					
	Negativo	%	Positivo	%	<i>p</i>
	n=62	49,6	n=63	50,4	
Idade					0,202
≤ 55	6	4,8	12	9,6	
≥ 56	56	44,8	51	40,8	
Cor					0,334
Branco	54	43,2	53	42,4	
Pardo	5	4	7	5,6	
Mulato	3	2,4	3	2,4	
PSA Pré-Operatório					0,743
≤ 4,0	4	3,2	6	4,8	
≥ 4,1	58	46,4	57	45,6	

Nota: Os valores de **n** representam o número de casos de BRCA2: negativo (62) e positivo (63), pela análise imunohistoquímica.

Tabela 5 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e os valores de *Gleason*, com o *cut-off* para BRCA2 de 56% e com classificação de EG atual (2014).

BRCA2 (n=125)					
	Negativo	%	Positivo	%	<i>p</i>
	n=62	49,6	n=63	50,4	
<i>Gleason</i> após a prostatectomia					0,281
3+4	33	26,4	44	35,2	
4+3	16	12,8	11	8,8	
=8	7	5,6	5	4	
9-10	6	4,8	3	4	
<i>Gleason</i> Biópsia					0,592
≤ 6	35	28	32	25,6	
=7	27	21,6	31	24,6	

Nota: Os valores de **n** representam o número de casos de BRCA2: negativo (62) e positivo (63), pela análise imunohistoquímica.

Também foram realizados testes estatísticos a fim de avaliar se havia associação com outros achados clinicopatológicos importantes em relação a expressão de BRCA2 (Tabela 6). No grupo BRCA2 positivo, a ausência de Invasão perineural foi vista em 17 casos (13,6%) e a presença deste achado histológico correspondeu a 6,8%, 46 pacientes ($p>0,05$). Observamos que cinquenta e oito pacientes (46,4%) não apresentaram Invasão angiolinfática, enquanto que em 5 pacientes (4%) esteve presente ($p>0,05$), ambos para a expressão positiva de BRCA2.

Para a variável Acometimento capsular, 38 casos (30,4%) estavam ausentes e 25 (20%) estavam presentes, os dois tiveram a expressão positiva para BRCA2 ($p>0,05$). No que se refere ao estágio avançado da doença com Invasão de tumores extraprostáticos também comparamos

com a expressão de BRCA2. Em 46 pacientes (36,8%) não houve invasão extraprostática, enquanto em 17 casos a invasão extraprostática esteve presente. Ambos relacionados com a expressão positiva de BRCA2, $p>0,05$. Observamos 63 pacientes (50,4%) com ausência de invasão de linfonodos comparados com a expressão positiva do anticorpo, ao mesmo tempo que nenhum paciente apresentou a invasão ($p>0,05$).

A presença de PIN nos casos analisados apresentou correlação estatística positiva ($p=0,030$), sendo que dentro do grupo BRCA2 positivo, 43 casos (34,4%) não apresentaram a lesão no material analisado, e 20 casos (16%) apresentaram a lesão.

Em relação a expressão positiva do BRCA2 com a lateralidade tumoral, são apontados 53 casos (42,4%) como tumores bilaterais, entretanto apenas 10 casos (8%) apresentaram tumores unilaterais ($p>0,05$).

O estágio patológico tumoral (TNM) mais evidenciado foi pT2c (59,6%), a qual apresentou expressão positiva para BRCA2 em 30,4%, $p>0,05$.

Tabela 6 - Correlação entre a expressão de BRCA2 e variáveis clinicopatológicas, com o *cut-off* para BRCA2 de 56%.

BRCA2 (n=125)					
	Negativo	%	Positivo	%	<i>p</i>
	n=62	49,6	n=63	50,4	
Invasão perineural					0,441
Ausência	21	16,8	17	13,6	
Presença	41	32,8	46	36,8	
Invasão angiolinfática					1,000
Ausência	58	46,4	58	46,4	
Presença	4	3,2	5	4	

Acometimento capsular					0,282
Ausência	31	24,8	38	30,4	
Presença	31	24,8	25	20	
Invasão extraprostática					0,441
Ausência	41	32,8	46	36,8	
Presença	21	16,8	17	13,6	
Invasão de linfonodos					0,244
Ausência	60	48	63	50,4	
Presença	2	1,6	0	0	
PIN					0,030
Ausência	30	24	43	34,4	
Presença	32	25,6	20	16	
Lateralidade Tumoral					1,000
Unilateral	9	7,2	10	8	
Bilateral	53	42,4	53	42,4	
Estágio Tumoral					0,091
pT2a	1	0,8	7	5,6	
pT2b	5	4	1	0,8	
pT2c	36	28,8	38	30,4	

pT3a	7	5,6	8	6,4
pT3b	13	10,4	9	7,2

Nota: Os valores de **n** representam o número de casos de BRCA2: negativo (62) e positivo (63), pela análise imunohistoquímica.

De acordo com a análise estatística da expressão de BRCA2, ela se correlacionou, somente, com a Lesão Intraepitelial Prostática (PIN), com $p=0,030$.

Figura 6 - Exemplos de células neoplásicas de câncer de próstata positivas para o marcador de BRCA2. Marcações citoplasmáticas e nuclear. A - B: *Gleason* 3+4; C - D: *Gleason* 4+3; E - F: *Gleason* =8 e G - H: *Gleason* 9-10. Imunohistoquímica – aumento de 200x.

Um biomarcador é definido como uma molécula ou outro dado que caracteriza um processo biológico em estado normal e patológico, sendo que sua expressão se diferencia ou só é estabelecida em estado patológico. Logo, é uma ferramenta importante, utilizada para se realizar um diagnóstico mais criterioso das patologias. Com base nisso, muito esforço é empreendido para se obter uma melhor compreensão sobre o comportamento clínico dos tumores de próstata, com intuito de identificar possíveis biomarcadores, para evitar que pacientes com tumores de comportamento pouco agressivo fossem submetidos a tratamentos radicais de maneira desnecessária e evitando que pacientes com tumores de comportamento mais agressivos fossem tratados com menor rigor, ocasionando em um curso clínico desfavorável.

Esse estudo buscou traçar o perfil dos pacientes (n=125) com carcinoma prostático, assistidos pelo Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, em relação a expressão de BRCA2 em dois momentos, um seguindo a classificação de *Gleason* antiga do ano de 2005 com ponto de corte para o BRCA2 de 15% e noutro momento quando nossos casos foram reagrupados para a classificação de *Gleason* atual (2014) e com o ponto de corte para o BRCA2 de 56%, além de correlacionar nossos achados com parâmetros clínicos, epidemiológicos e histopatológicos.

A idade média dos nossos pacientes, 63 anos, no ensaio imunohistoquímico para BRCA2 não esteve em concordância com estudos desenvolvidos por Kim e colaboradores (2015) (± 66 anos) (54), também houve discrepância com estudos realizados por Roed Nielsen (2016) (68 anos) (55). Considerando que nossa casuística é antiga (2005 a 2009), tal discrepância em nosso estudo sugere que o câncer se desenvolva cada vez mais tarde em função da disseminação do exame de rastreamento do PSA e da ocorrência de sobrediagnóstico, em que os homens são diagnosticados com câncer de próstata acima dos 65 anos, de acordo com dados atuais do INCA [9].

Os valores de PSA pré-operatório em nosso estudo (± 10 ng/DL) estiveram de acordo com o estudo de Kim e colaboradores (2015) que avaliou a expressão de BRCA1/BRCA2 no câncer de próstata. Em suas amostras obteve a média de 9,4ng/DL nos níveis de PSA (54). Porém, os resultados não foram significativos ($p > 0,05$). Visto que a proteína BRCA2 está diretamente ligada ao reparo do DNA, a relação entre o PSA e o BRCA2 demonstrada em nosso estudo pode sugerir que o PSA não esteja intrinsecamente envolvido no processo de transformação neoplásica, especificamente nas vias moleculares que estão envolvidas no ciclo celular.

Nossa hipótese a respeito do PSA, que ainda é um método de intensa controvérsia, pode ser sustentada pelo fato do PSA não ser considerado câncer específico, podendo estar alterado em outros processos patológicos da próstata, reforçando a 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 prostático, fato que tem sido cada vez mais sugerido por estudiosos da área (56-60).

O escore de *Gleason*, o parâmetro histológico pré-cirúrgico mais utilizado em biópsias prostáticas pelo mundo todo, é considerado o parâmetro clinicopatológico isolado de maior relevância. Nós estudamos o grau de *Gleason* na biópsia por fragmento segundo Epstein e Colaboradores (2005) comparando com as duas classificações do grau de *Gleason* nas amostras correspondentes a prostatectomia radical, uma de acordo segundo Epstein e Colaboradores (2005) e a outra com a nova classificação proposta em 2014 por Epstein e Colaboradores (27, 28). Observamos que os pacientes apresentaram na biópsia pré-cirúrgica o grau de *Gleason* ≥ 7 , com escore de *Gleason* iguais a 5, 6 ou 7, enquanto após a ressecção da próstata o grau de *Gleason* superestimava para ≥ 7 , classificando-se no grupo $=7$ ou no grupo ≥ 8 na antiga classificação e para a atual classificação do EG agrupava-se no grupo 2 (3+4), grupo 3 (4+3), grupo 4 ($=8$) ou ainda no grupo 5 (9-10). Com a classificação antiga e com ponto de corte de BRCA2 15%, 64 (51,2%) dos pacientes com EG ≤ 6 apresentaram-se expressão positiva para esse marcador, ao mesmo tempo em que 43,2% (54 pacientes) apresentaram escore de *Gleason* $=7$. Em nosso trabalho com a atual classificação e com o ponto de corte 56%, num total de 125 biópsias pré-cirúrgicas coletadas, 67 pacientes classificaram o escore de *Gleason* ≤ 6 , desses 32 (25,6%) apresentaram expressão positiva para BRCA2, enquanto 31 (24,8%) dos 58 casos com escore de *Gleason* $=7$, apresentaram expressão positiva para o marcador em questão. Dessa forma, demonstramos que no nosso estudo mais de 50% dos pacientes apresentaram grau de *Gleason* na biópsia ≤ 6 . Essa hipótese já está bem estabelecida na literatura, demonstrando que as biópsias pré-cirúrgicas apresentam um escore de *Gleason* comumente menor com relação à prostatectomia (32, 34).

Nossa hipótese quanto a biópsia por agulha é devido a pequena amostra do tecido que pode não ser tão representativa no tipo celular e grau do tumor quando comparado com o restante da glândula. A razão exata para a discrepância observada entre o grau de *Gleason* na biópsia de agulha por fragmento com a amostra de prostatectomia entre os homens com grau de *Gleason* ≥ 7 não é bem definida. Nossos achados se apoiam na necessidade de novos

marcadores moleculares que possam auxiliar na avaliação de parâmetros histológicos em câncer de próstata a fim de melhorar prognóstico e o curso clínico da doença.

A prostatectomia radical é considerada a eleição terapêutica padrão ouro no tratamento para câncer de próstata primário e localizado. O grau de *Gleason* em prostatectomia radical é um dos fatores de prognóstico mais poderosos e é utilizado como um marcador substituto para os resultados clínicos (61-63). Com a classificação antiga, segundo membros da ISUP no ano de 2005 noventa e nove pacientes com CaP (79,2%) com expressão de BRCA2 apresentaram-se com EG=7, agrupados em uma única categoria, e com apenas 15,2% os pacientes classificados com $EG \geq 8$ associados com a expressão positiva de BRCA2. Em nosso estudo 83,2% dos pacientes apresentaram-se com escore de *Gleason* =7. Com a atual classificação do escore de *Gleason* que diferencia o grau 7 em dois grupos, o grupo 3+4 da nossa amostra apresentou 35,2% para BRCA2 positiva e o grupo 4+3 demonstrou apenas 8,8% de expressão positiva para BRCA2. A revisão bibliográfica evidencia estudos que demonstram o grupo 4+3 pode ser mais agressivo quando comparado ao grupo 3+4. No geral, nossos achados são consistentes com os relatados na literatura (64). Por nossa casuística ter sido relativamente pequena e dividida em quatro grupos, isso pode ter influenciado o fato dos nossos resultados não terem sido estatisticamente significativos quando correlacionamos os achados clínicos nos diferentes graus de *Gleason* com a expressão de BRCA2. Por isso, sugerimos para trabalhos futuros a utilização de uma casuística maior. Uma outra limitação em nosso estudo foi a falta de um teste quantitativo para avaliar a expressão da proteína BRCA2 e a identificar a mutação na sequência gênica de BRCA2, através de técnicas moleculares. De acordo com o trabalho de Tryggvadóttir e Colaboradores (2007), foi realizada uma análise da mutação em pacientes portadores de BRCA2 em câncer de próstata com a técnica molecular *polymerase chain reaction*, PCR (47). Em outro estudo, os autores utilizaram sequenciamento genético em três famílias e avaliaram a quantidade de membros da mesma família que continham uma mutação no gene BRCA2. Houve também análise do histórico familiar como um dos fatores de risco para a progressão do câncer de próstata. Como esse estudo analisou poucas famílias há a necessidade de mais estudos (13, 45, 65, 66).

O nosso estudo sublinha ainda mais a necessidade de aperfeiçoamento da técnica de biópsia da próstata e a sua análise juntamente com a utilização de métodos estatísticos melhorados, de modo a minimizar a diferença entre o grau de *Gleason* da biópsia pré-cirúrgica e a classificação de *Gleason* após prostatectomia radical.

Nós correlacionamos expressão de BRCA2 em relação a achados histopatológicos comumente apresentados em espécimes de biópsias prostáticas. A ausência ou presença de invasão perineural, invasão angiolinfática, do acometimento da cápsula, da invasão extraprostática e invasão de linfonodos analisados com as duas classificações de *Gleason* não apresentaram correlação estatística positiva em nosso trabalho, concordando com estudos anteriores (54, 67).

A capacidade de avaliar a lateralidade tumoral em biópsias, após a prostatectomia, foi analisada também nas duas classificações de *Gleason*, e nossos estudos com a classificação de *Gleason* do ano de 2005 demonstraram correlação significativa com BRCA2, com $p=0,028$, o que podemos sugerir que quando o tumor se apresenta nos dois lobos o comportamento biológico pode ser mais agressivo. Em estudos de Pereira e Colaboradores (2015) a lateralidade tumoral foi estatisticamente significativa quando comparado o escore de *Gleason* alto com biopsia de próstata guiada por ultrassom transretal (68, 69).

Ainda em relação a parâmetros histológicos analisados, foi evidenciado que Lesão intraepitelial prostática (PIN) apresentou correlação estatística ($p=0,030$). PIN é um precursor de lesão câncer de próstata. Estudos recentes mostraram a utilização de técnicas de patologia molecular de alta resolução, como a detecção de pontos de interrupção genômicas na fusão TMPRSS2-ERG por PCR, bem como perda de PTEN genômico detectado por IHQ e confirmado por FISH, descrito por Haffner e Colaboradores (2016) que pesquisou as diferenças morfológicas e moleculares entre PIN e câncer de próstata. Mais estudos necessitam ser elucidados no papel molecular de PIN e a expressão da proteína BRCA2 em carcinomas prostáticos (70-73)

Em relação ao estágio patológico tumoral, nosso estudo tem como predominância o estágio pT2c para as duas classificações. Quando o ponto de corte do nosso trabalho foi de 15%, 68 pacientes (correspondendo a mais de 50% dos pacientes) apresentaram-se com expressão positiva para o BRCA2 e com estágio tumoral pT2c, com correlação estatística $p=0,038$. Na utilização do ponto de corte 56%, um total de 59,2% pacientes apresentaram-se classificados nesse estágio, e, dentre esses, 38% foram positivos para a expressão de BRCA2. Dessa forma houve concordância com estudos realizados no Brasil por Pereira e colaboradores (2014), com 60% dos pacientes para pT2c (74). Num estudo com 85 pacientes realizado em Madri, Lista e Colaboradores (2014) apontou o estágio pT2c como predominante em sua amostra (43%) (75). Nos Estados Unidos, Adamczyk e Colaboradores (2014) em outro estudo com 81 pacientes que

foram submetidos a prostatectomia radical, apresentou como estágio tumoral predominante o pT2c (65%) (76).

Sugerimos que BRCA2 pode ser um biomarcador importante no âmbito de neoplasias que envolvem a próstata, mas não é possível obter conclusões sobre o perfil de expressão de BRCA2. Dessa forma, nota-se a necessidade de mais estudos que envolvam técnicas moleculares capazes de elucidar o papel e o envolvimento de BRCA2 nos distúrbios que envolvem o ciclo celular no que diz respeito a formação de tumores.

- A superexpressão citoplasmática e nuclear de BRCA2 foi vista em 94,4% dos carcinomas prostáticos quando o ponto de corte foi 15%, enquanto que no ponto de corte 56% a expressão dessa proteína apresentou-se em 51,2% dos carcinomas prostáticos.
- A expressão de BRCA2 em espécimes de prostatectomia segundo a Classificação de *Gleason* no ano de 2005 mostrou que o grau de *Gleason* =7 foi maior quando comparados com as respectivas biópsias pré-cirúrgicas que apresentaram maior expressão de BRCA2 no *Gleason* ≤ 6 , enquanto o grau de *Gleason* agrupado pela nova classificação de 2014, mostrou expressão proteica maior no Grupo 2 (3+4) e suas biópsias apresentaram expressão de BRCA2 praticamente iguais, tanto para Escore de *Gleason* ≤ 6 quanto para o Escore de *Gleason* = 7.
- A bilateralidade tumoral e o estágio tumoral correlacionaram-se estatisticamente com a expressão de BRCA2 segundo a classificação de *Gleason* do ano de 2005, enquanto que na nova classificação apenas a lesão intraepitelial prostática expressou o BRCA2. Em vista disso, o BRCA2 na classificação antiga em nosso estudo demonstrou ser melhor e mais importante por correlacionar-se com achados clínicos importantes o que poderia ajudar na predição de carcinoma de próstata mais agressivos.

7. REFERÊNCIAS

1. Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2011;40(3):565-75, viii-ix.
2. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Clinically oriented anatomy*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2014. xxviii, 1134 p. p.
3. Netter FH. *Atlas of human anatomy*. Sixth edition. ed.
4. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*. 1981;2(1):35-49.
5. Bhavsar A, Verma S. Anatomic imaging of the prostate. *BioMed research international*. 2014;2014:728539.
6. Wilson AH. The prostate gland: a review of its anatomy, pathology, and treatment. *Jama*. 2014;312(5):562.
7. BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. *Patologia*. 7ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
8. J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.
9. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.*
10. Elkahwaji JE, Zhong W, Hopkins WJ, Bushman W. Chronic bacterial infection and inflammation incite reactive hyperplasia in a mouse model of chronic prostatitis. *The Prostate*. 2007;67(1):14-21.
11. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81.
12. Tomuleasa C, Kacso G, Soritau O, Susman S, Irimie A, Virag P. Cellular interactions in prostate cancer genesis and dissemination. Looking beyond the obvious. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2010;51(3):427-35.
13. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schroder F, Tomlins SA, Tannock I, et al. Prostate cancer. *Lancet*. 2016;387(10013):70-82.
14. Bostwick DG, Cheng L. Precursors of prostate cancer. *Histopathology*. 2012;60(1):4-27.
15. Hull D, Ma J, Singh H, Hossain D, Qian J, Bostwick DG. Precursor of prostate-specific antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 90 cases. *BJU international*. 2009;104(7):915-8.
16. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Human molecular genetics*. 2004;13 Spec No 1:R103-21.
17. Villeda C, Gomez MO, Sotomayor M. [Overdiagnosis in prostate cancer]. *Archivos espanoles de urologia*. 2014;67(5):388-92.

18. Hoshi S, Hayashi N, Kurota Y, Hoshi K, Muto A, Sugano O, et al. Comparison of semi-extended and standard lymph node dissection in radical prostatectomy: A single-institute experience. *Molecular and clinical oncology*. 2015;3(5):1085-7.
19. Roehl KA, Antenor JA, Catalona WJ. Robustness of free prostate specific antigen measurements to reduce unnecessary biopsies in the 2.6 to 4.0 ng./ml. range. *The Journal of urology*. 2002;168(3):922-5.
20. Sensabaugh GF. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *Journal of forensic sciences*. 1978;23(1):106-15.
21. Prostate-specific antigen (PSA) best practice policy. American Urological Association (AUA). *Oncology*. 2000;14(2):267-72, 77-8, 80 passim.
22. Hoffman RM. Viewpoint: limiting prostate cancer screening. *Annals of internal medicine*. 2006;144(6):438-40.
23. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level $\leq$ 4.0 ng per milliliter. *The New England journal of medicine*. 2004;350(22):2239-46.
24. Gonzalez CM, Roehl KA, Antenor JV, Blunt LW, Han M, Catalona WJ. Preoperative PSA level significantly associated with interval to biochemical progression after radical retropubic prostatectomy. *Urology*. 2004;64(4):723-8.
25. Calvete AC, Srougi M, Nesrallah LJ, Dall'Oglio MF, Ortiz V. [Extraprostatic disease prediction in patients with carcinoma of the prostate: role of PSA, prostatic biopsy fragments percentage and Gleason score]. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2003;49(3):250-4.
26. George AK, Turkbey B, Valayil SG, Muthigi A, Mertan F, Kongnyuy M, et al. A urologist's perspective on prostate cancer imaging: past, present, and future. *Abdominal radiology*. 2016.
27. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL, Committee IG. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2005;29(9):1228-42.
28. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *European urology*. 2015.
29. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American journal of surgical pathology*. 2016;40(2):244-52.
30. Chung MS, Lee SH, Lee DH, Chung BH. Evaluation of the 7th American Joint Committee on cancer TNM staging system for prostate cancer in point of classification of bladder neck invasion. *Japanese journal of clinical oncology*. 2013;43(2):184-8.
31. Umbehr MH, Platz EA, Peskoe SB, Bhavsar NA, Epstein JI, Landis P, et al. Serum prostate-specific antigen (PSA) concentration is positively associated with rate of disease reclassification on subsequent active surveillance prostate biopsy in men with low PSA density. *BJU international*. 2014;113(4):561-7.

32. Cookson MS, Fleshner NE, Soloway SM, Fair WR. Correlation between Gleason score of needle biopsy and radical prostatectomy specimen: accuracy and clinical implications. *The Journal of urology*. 1997;157(2):559-62.
33. Crawford ED. Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology*. 2009;73(5 Suppl):S4-10.
34. Kulkarni JN, Valsangkar RS, Jadhav YR, Singh DP. Impact of Gleason pattern up gradation after radical prostatectomy for carcinoma prostate patients with low biopsy score (≤ 6). *Journal of cancer research and therapeutics*. 2011;7(4):459-62.
35. Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed research international*. 2013;2013:747318.
36. Fanale D, Amodeo V, Corsini LR, Rizzo S, Bazan V, Russo A. Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers. *Oncogene*. 2012;31(17):2121-8.
37. Smith EC. An overview of hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Journal of midwifery & women's health*. 2012;57(6):577-84.
38. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *Jama*. 2006;295(12):1379-88.
39. Bartek J, Falck J, Lukas J. CHK2 kinase--a busy messenger. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(12):877-86.
40. Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(4):297-308.
41. Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open biology*. 2013;3(1):120144.
42. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. *Current opinion in pharmacology*. 2005;5(4):388-93.
43. Deniz M, Holzmann K, Wiesmuller L. Functional analysis-make or break for cancer predictability. *Mutation research*. 2013;743-744:132-41.
44. Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, et al. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Molecular cell*. 2001;7(2):273-82.
45. Cavanagh H, Rogers KM. The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. *Hereditary cancer in clinical practice*. 2015;13(1):16.
46. Edwards SM, Evans DG, Hope Q, Norman AR, Barbachano Y, Bullock S, et al. Prostate cancer in BRCA2 germline mutation carriers is associated with poorer prognosis. *British journal of cancer*. 2010;103(6):918-24.
47. Tryggvadottir L, Vidarsdottir L, Thorgeirsson T, Jonasson JG, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, et al. Prostate cancer progression and survival in BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(12):929-35.
48. Jeyasekharan AD, Liu Y, Hattori H, Pisupati V, Jonsdottir AB, Rajendra E, et al. A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(10):1191-8.

49. Coene ED, Gadelha C, White N, Malhas A, Thomas B, Shaw M, et al. A novel role for BRCA1 in regulating breast cancer cell spreading and motility. *The Journal of cell biology*. 2011;192(3):497-512.
50. Moro L, Arbin AA, Yao JL, di Sant'Agnese PA, Marra E, Greco M. Loss of BRCA2 promotes prostate cancer cell invasion through up-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Cancer science*. 2008;99(3):553-63.
51. Thorgeirsson T, Jordahl KM, Flavin R, Epstein MM, Fiorentino M, Andersson SO, et al. Intracellular location of BRCA2 protein expression and prostate cancer progression in the Swedish Watchful Waiting Cohort. *Carcinogenesis*. 2016;37(3):262-8.
52. Mitra A, Jameson C, Barbachano Y, Sanchez L, Kote-Jarai Z, Peock S, et al. Overexpression of RAD51 occurs in aggressive prostatic cancer. *Histopathology*. 2009;55(6):696-704.
53. Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Jarvinen T, Beauduin M, Vindevoghel A, et al. HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2001;12(8):1081-9.
54. Kim SH, Park WS, Yun SI, Joo J, Joung JY, Seo HK, et al. Overexpression of BRCA1 or BRCA2 in prostatectomy specimens is predictive of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Histopathology*. 2015.
55. Roed Nielsen H, Petersen J, Therkildsen C, Skytte AB, Nilbert M. Increased risk of male cancer and identification of a potential prostate cancer cluster region in BRCA2. *Acta oncologica*. 2016;55(1):38-44.
56. Loeb S, Bruinsma SM, Nicholson J, Briganti A, Pickles T, Kakehi Y, et al. Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of clinicopathologic variables and biomarkers for risk stratification. *European urology*. 2015;67(4):619-26.
57. Walker R, Louis A, Berlin A, Horsburgh S, Bristow RG, Trachtenberg J. Prostate cancer screening characteristics in men with BRCA1/2 mutations attending a high-risk prevention clinic. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada*. 2014;8(11-12):E783-8.
58. Hayes JH, Barry MJ. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence. *Jama*. 2014;311(11):1143-9.
59. Croswell JM, Kramer BS, Crawford ED. Screening for prostate cancer with PSA testing: current status and future directions. *Oncology*. 2011;25(6):452-60, 63.
60. Kanyong P, Rawlinson S, Davis J. Immunochemical Assays and Nucleic-Acid Detection Techniques for Clinical Diagnosis of Prostate Cancer. *Journal of Cancer*. 2016;7(5):523-31.
61. Rasiah KK, Stricker PD, Haynes AM, Delprado W, Turner JJ, Golovsky D, et al. Prognostic significance of Gleason pattern in patients with Gleason score 7 prostate carcinoma. *Cancer*. 2003;98(12):2560-5.
62. Grossfeld GD, Latini DM, Lubeck DP, Mehta SS, Carroll PR. Predicting recurrence after radical prostatectomy for patients with high risk prostate cancer. *The Journal of urology*. 2003;169(1):157-63.

63. D'Amico AV, Chen MH, Renshaw AA, Loffredo B, Kantoff PW. Risk of prostate cancer recurrence in men treated with radiation alone or in conjunction with combined or less than combined androgen suppression therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(18):2979-83.
64. Huang CC, Kong MX, Zhou M, Rosenkrantz AB, Taneja SS, Melamed J, et al. Gleason score 3 + 4=7 prostate cancer with minimal quantity of gleason pattern 4 on needle biopsy is associated with low-risk tumor in radical prostatectomy specimen. *The American journal of surgical pathology*. 2014;38(8):1096-101.
65. Castro E, Eeles R. The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian journal of andrology*. 2012;14(3):409-14.
66. Hunter SM, Rowley SM, Clouston D, Investigators KCF, Li J, Lupat R, et al. Searching for candidate genes in familial BRCA1 mutation carriers with prostate cancer. *Urologic oncology*. 2016;34(3):120 e9- e16.
67. Ciftci S, Yilmaz H, Ciftci E, Simsek E, Ustuner M, Yavuz U, et al. Perineural invasion in prostate biopsy specimens is associated with increased bone metastasis in prostate cancer. *The Prostate*. 2015;75(15):1783-9.
68. Pereira RA, Costa RS, Muglia VF, Silva FF, Lajes JS, Dos Reis RB, et al. Gleason score and tumor laterality in radical prostatectomy and transrectal ultrasound-guided biopsy of the prostate: a comparative study. *Asian journal of andrology*. 2015;17(5):815-20.
69. Gallina A, Maccagnano C, Suardi N, Capitanio U, Abdollah F, Raber M, et al. Unilateral positive biopsies in low risk prostate cancer patients diagnosed with extended transrectal ultrasound-guided biopsy schemes do not predict unilateral prostate cancer at radical prostatectomy. *BJU international*. 2012;110(2 Pt 2):E64-8.
70. Arbini AA, Greco M, Yao JL, Bourne P, Marra E, Hsieh JT, et al. Skp2 overexpression is associated with loss of BRCA2 protein in human prostate cancer. *The American journal of pathology*. 2011;178(5):2367-76.
71. Francis JC, McCarthy A, Thomsen MK, Ashworth A, Swain A. Brca2 and Trp53 deficiency cooperate in the progression of mouse prostate tumorigenesis. *PLoS genetics*. 2010;6(6):e1000995.
72. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(6 Pt A):1238-60.
73. Haffner MC, Weier C, Xu MM, Vaghiasia A, Gurel B, Gumuskaya B, et al. Molecular evidence that invasive adenocarcinoma can mimic prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and intraductal carcinoma through retrograde glandular colonization. *The Journal of pathology*. 2016;238(1):31-41.
74. Pereira RA, Ravinal RC, Costa RS, Lima MS, Tucci S, Muglia VF, et al. Cyclin D1 expression in prostate carcinoma. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2014;47(6):515-21.
75. Lista F, Gimbernat H, Caceres F, Rodriguez-Barbero JM, Castillo E, Angulo JC. Multiparametric magnetic resonance imaging for the assessment of extracapsular invasion and other staging parameters in patients with prostate cancer candidates for radical prostatectomy. *Actas urológicas españolas*. 2014;38(5):290-7.
76. Adamczyk P, Tworkiewicz J, Drewa T. Radical prostatectomy specimens - a voice against focal therapy. *Central European journal of urology*. 2014;67(3):235-41.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 17 de setembro de 2014

Ofício nº 3427/2014
CEP/FC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BRCA2 EM BIÓPSIAS POR AGULHA FINA E SUA CORRELAÇÃO COM A PROSTATECTOMIA EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 394ª Reunião Ordinária realizada em 15/09/2014 e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 11904/2014.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF.DR. FÁBIO CARMONA
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
PROF.DR. ALFREDO RIBEIRO DA SILVA
SAMARA RODRIGUES DUARTE
Depto. de Patologia e Medicina Legal