Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Eduardo Moussa de Jabur Leze

Abordagens estereológica e imunohistoquímica no câncer de próstata: uma reavaliação diagnóstica

Rio de Janeiro
2015

Eduardo Moussa de Jabur Leze

Abordagens estereológica e imunohistoquímica no câncer de próstata: uma reavaliação diagnóstica e possível terapêutica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Carlos A. Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L686 Leze, Eduardo Moussa de Jabur.
Abordagens estereológica e imunohistoquímica no câncer de próstata: uma reavaliação diagnóstica e possível terapêutica / Eduardo Moussa de Jabur Leze. – 2015.
69 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Próstata - Câncer - Teses. 2. Imunohistoquímica - Teses. 3. Volume médio nuclear. 4. Neoplasias da Próstata - Classificação. 5. Neoplasias da Próstata - Diagnóstico. 6. Estereologia - Teses. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.65-002-006

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou pa
desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____
Assinatura Data

Eduardo Moussa de Jabur Leze

Abordagens estereológica e imunohistoquímica no câncer de próstata: uma reavaliação diagnóstica e possível terapêutica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema urogenital.

Aprovada em 17 de junho de 2015.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. Carlos Alberto Basílio de Oliveira
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Orlando Marques Vieira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Marco Antônio Quesada Ribeiro Fortes
Hospital Naval Marcílio Dias

_____

Prof.ª Dra. Sandra Barbosa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro
2015

DEDICATÓRIA

O trabalho é dedicado à família. Uma organização que é única, capaz de transformar o indivíduo em um ser extremamente produtivo e harmônico com o ambiente em que vive, ao invés de alguém destrutivo e sem propósito.

AGRADECIMENTOS

Ao mais louvável, o Criador, responsável por restituir todas as benesses àqueles que prezam pelo próximo.

À toda minha família, que com afeto e dedicação conseguem mostrar a trilha correta que a vida deve seguir.

Ao meu filho, Leonardo, o mais novo motivo que me fará sempre crescer como ser humano.

Aos amigos do laboratório, que transformam o trabalho em um ambiente acolhedor.

À mais nova professora, Sandra Barbosa, capaz de dar bronca sem brigar, dar bronca fazendo rir. Amiga, instrutora e dedicada.

Ao eterno orientador, Carlos Mandarim-de-Lacerda, que com serenidade e capacidade ímpar, conquista, a cada dia, mais o respeito pela admiração. Conduz carreiras de sucesso como um maestro rege sua orquestra.

RESUMO

LEZE, Eduardo Moussa de Jabur. *Abordagens estereológica e imunohistoquímica no câncer de próstata* : uma reavaliação diagnóstica e possível terapêutica. 2015. 69 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Os esforços para melhorar o diagnóstico, o prognóstico e a vigilância do câncer de próstata (CaP) são relevantes. A superestimação do Escore de Gleason (GS_C) pode submeter os indivíduos a um tratamento agressivo desnecessário. Foi tido como objetivo utilizar a estereologia em avaliações do CaP e investigar se o volume nuclear médio (VNM) correlaciona-se com o padrão primário de Gleason (Gpp), a fim de buscar um método alternativo devido à subjetividade do Escore de Gleason, que seja aquele, um método confiável e objetivo, sem discordância interobservador. Para isso, identificamos 74 amostras de prostatectomia radical, que foram divididos em seis grupos com base no Gpp, de 3 a 5. Controles (C) foram adquiridos em regiões não tumorais pareadas das mesmas amostras. O VNM foi estimado utilizando o método de "intersecção dos pontos amostrados". Diferenças estatísticas do VNM entre os grupos C e os grupos Gpp foram testadas utilizando o teste de Kruskall-Wallis e pós- teste de Dunn. As diferenças entre cada grupo Gpp e seus homólogos foram testados com o teste de Wilcoxon. As correlações foram avaliadas com a correlação de Spearman ($R_{[Spearman]}$). As correlações entre o antígeno prostático específico (PSA) e o GS_C ($R_{[Spearman]}$ de 0,76) e entre o PSA e o VNM ($R_{[Spearman]}$ de 0,78) foram moderadamente forte e altamente significativa, e a correlação entre o VNM e o Gpp ($R_{[Spearman]}$ de 0,53) foi moderada e altamente significativa. O VNM foi significativamente maior em regiões cancerígenas em comparação as regiões de controle-pareado. O planejamento adequado de um estudo, bem como a disponibilidade de equipamentos e softwares para a quantificação morfológica, pode proporcionar incentivo para rapidez e precisão para estimar o VNM como parâmetro auxiliar na avaliação do câncer de próstata. A reprodutibilidade falha interobservador do GS_C tem mostrado possíveis conduções equivocadas dos pacientes portadores de CaP. O VNM representa um método reprodutível de classificação objetiva para o câncer de próstata. Portanto, os dados atuais favorecem o uso de VNM associado com GS_C e o PSA na avaliação do câncer de próstata.

Palavras-chave: Câncer de próstata. Volume médio nuclear. Sistema de Escore de Gleason. Diagnóstico. Estereologia.

ABSTRACT

LEZE, Eduardo Moussa de Jabur. *Stereologic and immunohistochemistry approach in prostate cancer* : a diagnostic revaluation and a possible therapeutic strategy. 2015. 69 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Efforts to improve the diagnosis, prognosis and surveillance of prostate cancer (PCa) are relevant. Gleason score (GSc) overestimation may subject individuals to unnecessary aggressive treatment. The purpose is to use stereology in PCa evaluations and investigate whether mean nuclear volume (MNV) correlates with the Gleason primary pattern (Gpp) and to improve the subjective GSc to obtain an objective and reliable method without inter-observer dissension. We identified 74 radical prostatectomy specimens that were divided into six groups based on Gpp, from 3 to 5. Controls (C) were designed in paired non-tumour regions of the same specimens. MNV was estimated using the “point-sampled intercepts” method. Differences in MNV among the C groups and the Gpp groups were tested with the Kruskall-Wallis test and Dunn post-hoc test. Differences between each Gpp group and its control counterpart were tested with the Wilcoxon test. Correlations were evaluated with the Spearman rank correlation ($R_{[Spearman]}$). The correlations between prostate-specific antigen (PSA) and GSc ($R_{[Spearman]}$ of 0.76) and between PSA and MNV ($R_{[Spearman]}$ of 0.78) were moderately strong and highly significant, and the correlation between MNV and Gpp ($R_{[Spearman]}$ of 0.53) was moderate and highly significant. MNV was significantly greater in cancerous regions than in paired-control regions. Limitations included sample size. Proper planning of a study, as well as the availability of equipment and software for morphological quantification, can provide incentive to quickly and accurately estimate MNV as an adjunct parameter in the assessment of PCa. Inter-observer reproducibility of GSc is a problem. MNV represents an objective and reproducible grading method for PCa. Current data favour the use of MNV associated with GSc and PSA in the assessment of PCa.

Keywords: Prostate cancer. Mean nuclear volume. Gleason grading system. Diagnosis. Stereology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Anatomia da próstata, por Andrea Vesalius.....	13
Figura 2	Anatomia por Leonardo Da Vinci.....	13
Figura 3	Anatomia da próstata descrita por McNeal.....	15
Figura 4	Graduação de Gleason.....	22
Figura 5	Sistema de linhas paralelas interceptadas por pontos.....	27
Figura 6	Exemplo de estimação estereológica do volume nuclear médio ponderado.....	29
Figura 7	Correlação entre os valores de PSA com o GSc e o VNM.....	34
Figura 8	Correlação entre o VNM e o GSc.....	35
Figura 9	Dispersão do volume nuclear médio (VNM) nos grupos caso e controle.....	36 39
Figura 10	Percentual de imunomarcação para PCNA.....	43
Figura 11	Fotomicrografias com marcação do anticorpo anti-PCNA.....	44
Figura 12	Percentual de munomarcação para VEGF.....	45
Figura 13	Fotomicrografias das imunomarcações para VEGF.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C	Antes de Cristo
CaP	Câncer de próstata
ERSPC	*European Randomized Study on Screening for Prostate Cancer*
GSc	Gleason score
Gpp	*Gleason primary pattern*
IC	Intervalo de confiança
IGF	*Insulin growth factor*
ISUP	*International Society of Urological Pathology*
PCNA	*Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PIN	*Prostatic intraepithelial neoplasia*
PLCO	*Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial*
PSA	*Prostatic specific antigen*
RR	Risco relativo
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
VNM	Volume nuclear médio

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	13
1.1	**A Próstata**	13
1.2	**Câncer de próstata**	16
1.2.1	Diagnóstico precoce do câncer de próstata	18
1.2.2	Diagnóstico atual e Perspectivas Diagnósticas	19
1.2.3	Histopatologia no Câncer de Próstata	20
1.2.4	Graduação de Gleason	21
1.3	**Volume Nuclear Médio**	23
1.4	**PCNA e VEGF no câncer de próstata**	24
2	**OBJETIVOS**	25
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	26
3.1	**Metodologia para a análise estereológica da próstata**	26
3.1.1	Histologia	26
3.1.2	Estereologia	27
3.1.3	Amostragem dos núcleos.	27
3.1.4	Medida dos núcleos	28
3.1.5	Cálculos do VNM	30
3.1.6	Análise estatística referente aos dados estereológicos	30
3.1.7	Imunohistoquímica da próstata	31
3.1.8	Análise estatística referente a imunohistoquímica	32
4	**RESULTADOS**	33
4.1	**As correlações de *Spearman***	33
4.2	**Imunomarcação para PCNA**	43
4.3	**Imunomarcação para VEGF**	45
5	**DISCUSSÃO**	47
	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE – Advantages of Evaluating Mean Nuclear Volume as an Adjunct Parameter in Prostate Cancer.	60

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética..... 66
ANEXO B - Prêmio Miguel Couto..... 68
ANEXO C - Comprovação da submissão do 2º artigo científico..... 69

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é um importante problema de saúde pública. No Brasil, o CaP é o segundo câncer mais comum entre os homens (atrás apenas do câncer de pele não-melanoma). Em valores absolutos, é o sexto tipo mais habitual no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. Sua taxa de incidência é cerca de seis vezes maior nos países desenvolvidos, em comparação aos países em desenvolvimento[1].

Mais do que qualquer outro tipo, é considerado um câncer da terceira idade, já que em torno de três quartos dos casos, no mundo, ocorrem a partir dos 65 anos. O aumento, observado nas taxas de incidência no Brasil, pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos (exames), pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida. Nos Estados Unidos da América, o CaP é a segunda causa de morte por câncer (Haas *et al.*, 2008). Assim, os esforços para melhorar o diagnóstico e as condutas terapêuticas do CaP são relevantes.

O Sistema de Escore de Gleason (GSC) é o método que avalia a correlação entre o grau histológico e o prognóstico em pacientes com CaP (Epstein, 2010). Esse sistema é baseado na arquitetura das células cancerígenas, que são atribuídos cinco padrões histológicos de redução da diferenciação. Desde 2005, tem sido recomendado que os patologistas atribuam o valor do GSC, somando os padrões de Gleason mais alto e mais comum em uma biópsia, diferente do método original do GSC, que acrescenta o padrão mais comum e o segundo padrão mais comum (Billis *et al.*, 2008). Estas modificações feitas pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (*International Society of Urological Pathology* - ISUP), em 2005, foram uma tentativa de melhorar a correlação do GSc entre a biópsia e a prostatectomia radical (Pierorazio *et al.*, 2013).

Estudos têm mostrado que, devido à fraca reprodutibilidade interobservador do Gsc, é difícil alcançar concordância mútua (Allsbrook *et al.*, 2001; Burchardt *et al.*, 2008).

[1] http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata, 2015.

Esta falta de concordância é importante, principalmente, em pacientes com CaP, bem como em indivíduos que são candidatos para, ou estão sob vigilância ativa (Shapiro e Johnstone, 2012), tendo em vista que condutas mais agressivas no tratamento podem ser impostas de forma desnecessária. Tem sido proposta, para a avaliação do núcleo de células tumorais, a determinação do “volume nuclear médio ponderado”, ou VNM (em inglês, *mean nuclear volume*) (Gundersen e Jensen, 1985). O VNM é um método de execução rápida e alcança resultados que podem ser reprodutíveis no estudo das características nucleares de células neoplásicas (Mandarim-de- Lacerda, 1999).

A utilização de marcadores biológicos apresenta papel coadjuvante para avaliar o comportamento clínico das neoplasias, pois as alterações oriundas da progressão neoplásica resultam de inúmeros eventos celulares com alterações genética e bioquímica. Dessa forma, em relação à estabilização e o crescimento das células tumorais, há trabalhos que mostram a importância do estudo dos marcadores histológicos, tais como, o antígeno de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, PCNA) muito expresso pelas células tumorais (Zhong *et al.*, 2008) e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), que está associado à angiogênese em diversos tumores (Claffey *et al.*, 1996). Esses dois marcadores podem ser avaliados pela imunohistoquímica e ajudar na graduação e no prognóstico das neoplasias.

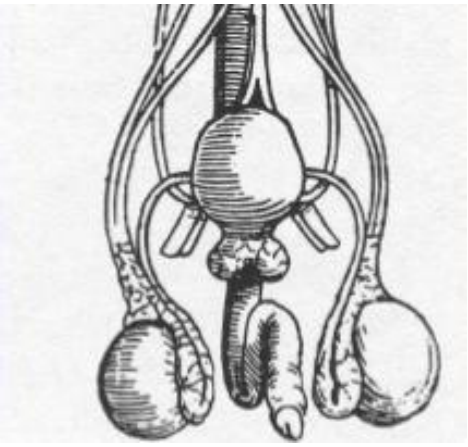
O objetivo do primeiro estudo é revisitar o uso da estereologia na avaliação do CaP e investigar se o VNM se correlaciona com o Gleason primário (Gpp) para substituir ou melhorar a subjetividade do GSC de tal forma que ele se torne um método mais objetivo e confiável, sem discordância interobservador. Além disso, temos outro estudo, o do comportamento dos marcadores PCNA e VEGF no CaP, em comparação com tecidos benignos dos mesmos pacientes, a fim de determinar mais detalhadamente a fisiopatologia desse tumor.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A próstata

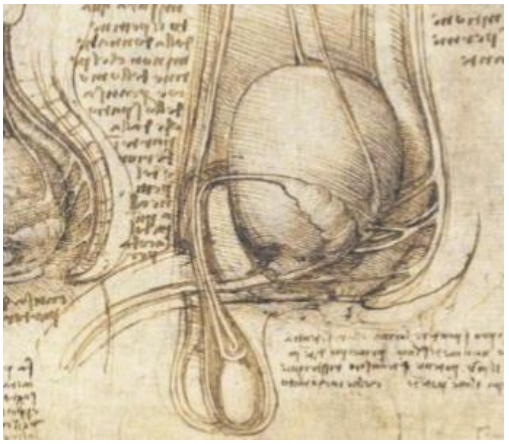
As primeiras menções anatômicas da próstata foram iniciadas por Herophilos, na cidade de Alexandria, Egito, onde ganhou notoriedade. Nascido em 335 A.C na cidade de Calcedônia, Grécia, foi acompanhado por Erasitratus em suas vividissecções, sendo considerado o Pai da Anatomia (Bay e Bay, 2010). Em 1536, Niccoló Massa descreveu a próstata (Palmer, 1981), mas em 1543, Andreas Vesalius publicou em desenho, detalhadamente, o órgão em questão no *Tabulae Anatomicae Sex* (Figura 1) (Dauge *et al.*,1999). Ainda, dado digno de interesse histórico é o desenho de Leonardo Da Vinci (1452-1519), em que não consta a próstata na anatomia masculina (Figura 2) (Dunn, 1997).

Figura 1 - Anatomia da próstata por Andreas Vesalius



Fonte: Andreas Vesalius, em *Tabulae Anatomicae Sex* (Dauge *et al.*, 1999).

Figura 2 – Anatomia por Leonardo da Vinci



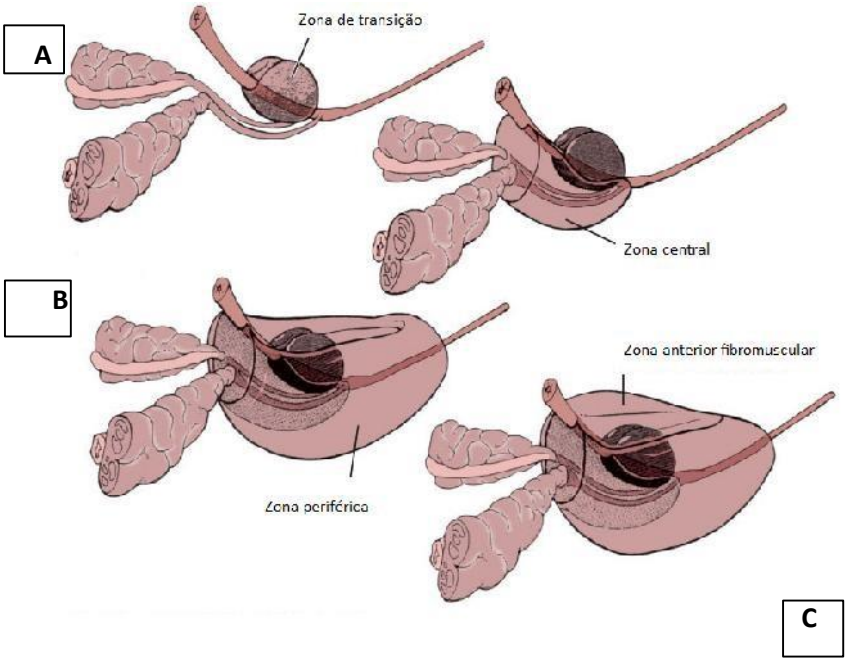
Legenda: Ilustração sem a presença da próstata. Fonte: Dunn, 1997.

Alguns séculos após, em 1912, Oswald Lowsley descreveu o desenvolvimento embriológico da próstata humana e sugeriu a existência de cinco lobos (Lowsley, 1912) e o estudo do crescimento quantitativo da próstata em fetos humanos foi realizado por um grupo franco-brasileiro (Dauge *et al.*, 1986). McNeal difundiu o conceito da anatomia zonal da próstata (Figura 3), ao serem identificadas três zonas distintas (Dauge *et al.*, 1999). A zona periférica que representa 70% do volume prostático no adulto jovem, a zona central representando 25%, e a zona de transição, 5% (McNeal, 1988). Essas zonas anatômicas possuem sistemas ductais distintos; porém o mais importante é que são diferentemente afetadas por processos neoplásicos. Entre 60 a 70% dos carcinomas de próstata têm origem na zona periférica, 10 a 20% na zona de transição e 5 a 10% na zona central. A hiperplasia prostática benigna origina- se uniformemente na zona de transição, acometendo também a zona periuretral (Selman, 2011).

A próstata é o órgão masculino mais comumente afetado por neoplasias benignas ou malignas. Essa glândula compreende o segmento mais proximal da uretra. Anatomicamente, acompanhando a descrição recente aplicada às necessidades do urologista (Wilson, 2014), temos:

a) A próstata situa-se na pelve menor, separada anteriormente da sínfise púbica pelo espaço retropubico (*Retzius*). A superfície posterior da próstata está afastada da ampola retal pelo septo reto-vesical (fáscia de *Denonvilliers*).
b) A base da próstata tem continuidade no colo da bexiga e o ápice repousa sobre a superfície superior do diafragma urogenital
c) Lateralmente a próstata se relaciona com a musculatura elevadora do ânus.
d) Sua irrigação sanguínea arterial é derivada de ramos da artéria ilíaca interna (artéria vesical inferior e artéria retal média).
e) A drenagem venosa se faz através do complexo venoso dorsal, que recebe a veia dorsal profunda do pênis e ramos vesicais, antes de drenar nas veias ilíacas internas.
f) A inervação provém do plexo pélvico.
g) A próstata normal mede de 3 a 4 cm na base, 4 a 6 cm na sua dimensão cefalocaudal e 2 a 3 cm na sua dimensão anteroposterior.

Figura 3 - Anatomia da próstata descrita por McNeal



Legenda: A figura acima ilustra a divisão da próstata em zonas: de transição (A), periférica (B), anterior (C).
Fonte: *Campbell's Urology.*

Em relação ao desenvolvimento da próstata, é, no período da adolescência, que apresenta a maior taxa de crescimento, estabelecido em cerca de 1,6 g/ano, atingindo seu peso fisiológico máximo de aproximadamente 20 g, na idade adulta**.** O crescimento da próstata é regulado por uma complexa interação entre o epitélio e estroma prostáticos (McNeal, 1990).

O epitélio da próstata humana consiste em três maiores componentes celulares: as células basais, luminais e neuroendócrinas. As células basais são achatadas e pequenas na base da membrana. Elas não mostram receptores androgênicos, sendo consideradas células precursoras do epitélio prostático (Roehrborn, 2008).

Independentemente do estímulo androgênico, essas células levam ao crescimento das células intermediárias, que se proliferam e se deslocam através do compartimento luminal, em que a diferenciação dá origem a um grupo de células luminais sensíveis ao androgênio. As células luminais produzem parte do plasma seminal, incluindo o PSA e a fosfatase ácida prostática. Entre as células epiteliais, estão dispersas células neuroendócrinas, que podem ter uma função regulatória através de diversos peptídeos, assim como somatostatina, calcitonina e neurotensina (McNeal, 1988; Lee *et al.*, 2011).

O estroma prostático envolve inúmeros tipos de células abrigadas em uma matriz extracelular feita de diversos tipos de colágenos e glicoproteínas. Os fibroblastos e as células musculares lisas são os tipos celulares predominantes, embora as células endoteliais androgênio sensitivas e células nervosas sejam amplamente representadas (McNeal, 1988; Lee *et al.*,2011).

Após o crescimento fisiológico para o tamanho adulto, a próstata entra em uma fase de manutenção, na qual a proliferação da célula prostática ocorre em uma taxa diária de 1 a 2%, contrabalançada por igual taxa de morte celular programada. O prejuízo nesse equilíbrio poderia ser a causa para a hiperplasia prostática benigna (Shariat *et al.*, 2005).

1.2 **Câncer de próstata**

O câncer de próstata (CaP) é a malignidade mais comumente diagnosticada nos homens, constituindo-se na segunda causa principal de morte por câncer em homens nos Estados Unidos e no Brasil (estima-se que 68.800 casos novos de CaP ocorreram no Brasil no ano de
2014). Esses valores correspondem a um risco estimado de 70,42 casos novos a cada 100 mil homens[2].

De todos os cânceres, a prevalência de CaP é a que aumenta mais rapidamente com a idade. Mas ao contrário da maioria das demais malignidades, que têm idade de pico de incidência, nos casos de CaP a incidência continua a aumentar com o avanço da idade.

Dados epidemiológicos mostram que somente 25% dos CaP são diagnosticados antes dos 65 anos na Europa (Ferlay *et al.*, 2010).

Os fatores de risco associados ao CaP são divididos em fatores não modificáveis e fatores externos (incluído estilo de vida). Inseridos em ambos os fatores mencionados, estão as exposições androgênica e estrogênica, que têm mostrado um comportamento favorável a esta condição patológica, assim como elevados níveis de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) (Haas *et al.*, 2008).

[2]http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp. Disponível em 8 maio 2015

Variações raciais são notáveis, tendo que, comparados com homens brancos de ancestralidade Europeia, homens negros afrodescendentes têm 58% maior incidência de CaP e 144% maior mortalidade, enquanto homens hispânicos têm 14% menos incidência e 17% menor mortalidade (Merrill e Sloan, 2012). Na Europa há diferenças entre as populações, como por exemplo, a incidência e mortalidade nos homens da Suécia é o dobro nos da Espanha e 1 a 5 vezes dos homens na Itália (Center *et al.*, 2012). Dado de nota é que a incidência em populações imigrantes de países em desenvolvimento é menor que a incidência da população de indivíduos brancos nos países desenvolvidos, mostrando que os fatores genéticos ligados à raça são importantes. Por outro lado, imigrantes indianos e paquistaneses residentes, nos EUA tiveram incidência de CaP substancialmente maior que a população nativa de seus países, o que pode ser explicado pelos pobres programas de diagnóstico precoce nos países de origem ou por fatores ambientais (Goggins e Wong, 2009).

O risco relativo de desenvolvimento do CaP é maior em homens que têm um parente de primeiro grau com CaP (RR 2,48, 95% IC 2,25–2,74) do que um homem com CaP, mas sem um parente de primeiro grau portador de CaP (Billis et al.). Esse risco é maior em homens com menos de 65 anos que possuem um parente de primeiro grau com CaP (RR 2,87, 2,21 – 3,74 vs 1,92, 1,49–2,47; p =0.002) e se o parente afetado for um irmão é maior que se for o pai (RR 3,14, 2,37–4,15).

A história familiar é importante, mas somente 35% do risco familiar é explicado por genes conhecidos (Eeles et al., 2013). Apesar de raro (cerca de 1 para 300), uma mutação no BRCA2 confere cerca de 6 a 8 vezes maior risco em homens abaixo de 65 anos e essa mutação está associada com CaP agressivo (Castro et al., 2013). Outras mutações associadas foram reportadas nos genes BRCA1, HOXB13, NBS1, e CHEK2 (Goh e Eeles, 2014). A mutação em HOXB13 G84E mostrou um risco relativo de 3 a 4 vezes, ocorrendo em 1,3 a 1,4% da população geral (Huang e Cai, 2014). Com relação a dados levantados na literatura, mas de conclusões controversas, estão possíveis riscos familiares que incluem padrões de calvície masculina e comprimento digital (Amoretti et al., 2013).

As radiações ionizantes ~~e~~ a ultravioleta da exposição solar foram relacionadas com CaP, assim como o contato com cádmio, no entanto essas suposições ainda carecem de maiores confirmações por estudos (Myles et al., 2008; Nair-Shalliker et al., 2012).

A associação entre infecções do trato urinário e o CaP está, através da fisiopatologia, relacionada à inflamação crônica, cujo mecanismo no desenvolvimento do CaP ainda é incerto (Nakai e Nonomura, 2013).

O tabagismo está associado com um aumento moderado no risco para o desenvolvimento do CaP. Essa associação é muito forte e o risco dobrado para cânceres agressivos ou fatais em tabagistas inveterados, quando comparados a não tabagistas. A forte associação de doença agressiva com o tabagismo sugere que o fumo possa contribuir com o efeito metastático tumoral (Huncharek *et al.*, 2010) (Zu e Giovannucci, 2009).

O aumento da massa corporal está associado com CaP avançado, mas com incidência menor dos casos de CaP localizado. As associações dietéticas ainda não são notórias, mas a carne vermelha, proteínas derivadas do leite e gordura saturada são mencionadas como fatores. O estilo de vida sedentário foi ligado a maiores concentrações séricas de PSA e uma meta análise de 19 estudos de coorte e 24 casos controle mostraram uma relação inversa entre o exercício físico e o risco de CaP (Discacciati e Wolk, 2014).

1.2.1 Diagnóstico precoce do câncer de próstata

Adotado como prática anual nos programas de rastreio do CaP, a dosagem do antígeno prostático especifico (PSA) é tido por alguns estudiosos como controverso. Dois grandes ensaios, o *Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial* (PLCO) e o *European Randomized Study on Screening for Prostate Cancer* (ERSPC), reportaram diferentes resultados, possivelmente por terem diferentes modelos de estudo (Cuzick *et al.*, 2014).

No PLCO foram comparados homens que fizeram as dosagens de PSA anualmente (taxa de teste de 85% no primeiro ano) comparados com homens que fizeram as dosagens de maneira esporádica (taxa de teste de 40% no primeiro ano). Os homens que foram submetidos ao teste anualmente tiveram maior incidência de CaP (RR 1,12, 95% IC 1,07–1,17), mas não tiveram redução na mortalidade pelo CaP (1,09, 0,87–1,36). Esta falta de benefício pode ser explicada, pois ambos os grupos foram submetidos a testes de PSA por três anos antes do estudo, o que

levou a uma seleção dos pacientes que realizavam o exame preventivo esporadicamente (Andriole *et al.*, 2012).

Em contraste ao estudo anterior, no estudo ERSPC foi avaliado o papel do rastreio pelo PSA em indivíduos que não realizavam previamente a conduta preventiva, de sete diferentes países, com estratégias preventivas diferentes. De uma maneira geral, os investigadores notaram 21% de redução nas mortes no grupo de homens entre 55-69 anos após 11 anos de seguimento (Schroder *et al.*, 2012).

O valor do rastreio realizado pelo PSA ainda carece de maiores explicações. Um importante estudo, o *CAP/ProtecT* promete dar respostas relevantes por acompanhar 450.000 homens, e valores preliminares serão oferecidos em 2016 (Cuzick *et al.*, 2014).

1.2.2 Diagnóstico atual e perspectivas diagnósticas

O diagnóstico do CaP passou, historicamente, por mudanças favoráveis no auxílio em que os dispositivos de punção por agulha são efetuados na próstata. O acesso padrão é a via transretal, sendo possíveis também, a via transuretral ou a via perineal. Inicialmente, a biópsia era guiada através do exame digital do reto, em áreas suspeitas ou aleatoriamente quando o valor do PSA era alarmante. Essa técnica foi então substituída pelo exame guiado pelo ultrassom transretal, em 1989, realizado também de forma aleatória, mas após importante estudo publicado (Hodge *et al.*, 1989), foi substituído por biópsias guiadas em áreas suspeitas, quando há imagens hipoecoicas na ultrassonografia (Shariat e Roehrborn, 2008).

Atualmente são realizadas doze punções, em oposição ao que era inicialmente feito, conhecido como biópsia sextante, que era praticado por três punções em cada dimídio da próstata. Em pacientes com biópsia prévia negativa e forte suspeita do diagnóstico de CaP, pode-se recomendar a biópsia de saturação, onde são executadas cerca de 20 punções (Shariat e Roehrborn, 2008). A substituição das 12 punções guiadas por ultrassonografia transretal por apenas duas punções guiadas por ressonância magnética não mostrou diferença, sendo a última de custo mais elevado e execução mais demorada (Baco *et al.*,2015).

Dentre as possíveis inovações a caminho na prática clínica, há a dosagem sérica de calicreínas e a dosagem urinária do PCA3, que nesse caso se encontra super expresso nas células do CaP e produzido somente em tecido prostático, mas não é capaz de diferenciar baixo e alto riscos no comportamento da agressividade tumoral (Sequeiros *et al.*, 2015). Para esse fim, há outro marcador urinário, que detecta a fusão de *TMPRSS2* com *ERG* (Egbers *et al.*, 2015).

Vem crescendo na conduta clínica do urologista a solicitação de ressonância magnética multiparamétrica no auxílio diagnostico do CaP, quando há suspeita, principalmente por abordar na próstata, através do estudo de imagem, áreas que são inacessíveis ao exame retal digital e com a biopsia guiada por ultrassonografia transretal, como nas localizações apical e anterior da próstata. O estadiamento também é viável a esse exame, por ser capaz de mostrar se há extensão extra capsular e das vesículas seminais. Ainda são necessários maiores estudos para avaliar sua indicação nos casos de forte suspeita de CaP com biópsias prévias negativas (Barentsz *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014).

1.2.3 Histolopatologia no câncer de próstata

Mais de 95% dos cânceres da próstata são adenocarcinomas. Dos outros 5%, 90% são carcinomas de células de transição e os restantes são carcinomas neuroendócrinos ou sarcomas (Fine, 2012).

O diagnóstico de CaP se baseia efetivamente na arquitetura citológica. A camada de células basais está ausente nos casos de câncer de próstata, embora esteja presente em glândulas normais, com HPB e nas lesões precursoras de CaP. Em caso de dúvida diagnóstica de CaP, pode-se obter coloração imunohistoquímica de ceratina de alto peso molecular, pois ocorre marcação preferencial das células basais. Assim, a ausência de coloração é consistente com CaP (Seipel *et al.*, 2014).

A neoplasia intraepitelial prostática (NIP) é o precursor do CaP invasivo (Andriole *et AL,* 2012). O aspecto diferenciador fundamental é a ausência da camada das células basais da arquitetura glandular. Embora NIP tenha as características citológicas do CaP, a camada de células basais está presente. Comumente a NIP é classificada em duas categorias: alto grau e baixo grau. Há

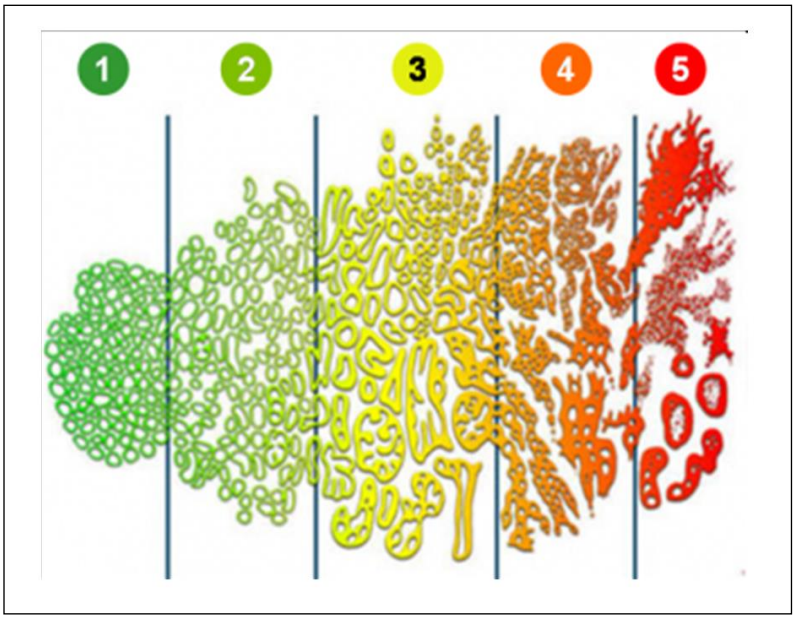
associação entre NIP e CaP invasivo em aproximadamente 50 a 80% dos casos, enquanto o NIP de baixo grau está associado a CaP invasivo em apenas cerca de 20% dos casos. Dessa forma, se um paciente teve biopsias com agulha apresentando apenas NIP de alto grau, será fundamental uma nova biópsia, a fim de que se exclua a possibilidade de não ter sido notado um câncer invasivo (Shapiro e Johnstone, 2012).

1.2.4 Graduação de Gleason

O médico patologista Donald Gleason (1920-2008) publicou, no periódico *Cancer Chemotherapy Reports,* em 1966, sua metodologia que prometia aferir o prognóstico de pacientes com CaP através da arquitetura das células cancerígenas. Foi lentamente sendo disseminado seu conceito, até a aprovação e recomendação a partir de 1987 (Epstein, 2010).

É notável que após 25 anos de sua aprovação, o Sistema de Escore de Gleason (GSC) continua a ser o método padrão para avaliar a correlação entre o grau histológico e o prognóstico em pacientes com CaP (Epstein, 2010). Esse sistema é baseado na arquitetura das células cancerígenas, que são atribuídas a um dos cinco padrões histológicos de redução da diferenciação. Desde 2005, tem sido recomendado que os patologistas atribuam o valor do GSC somando os padrões de Gleason mais alto e mais comum e em uma biópsia, em oposição ao método original do GSC, que acrescentou o padrão mais comum e o segundo padrão mais comum (Billis *et al.*, 2008). Essas modificações feitas pela Sociedade Internacional de Urologia Patologia (ISUP), em 2005, foram uma tentativa de melhorar a correlação entre a biópsia e a prostatectomia radical, mas também há a necessidade de mudança na atribuição dada pelos patologistas para refletir mais de perto o comportamento do tumor, tendo em vista que o uso desta alteração pela ISUP ainda não é largamente utilizada (Pierorazio *et al.*, 2013).

Figura 4: Graduação de Gleason (*Gleason Score)*



Legenda: Ilustração dos cinco padrões histológicos de redução da diferenciação, onde 1 é o mais diferenciado e 5 o menos diferenciado. O método original é realizado pela soma dos dois padrões mais comuns.
Fonte: Adaptado de, *Campbell's Urology 10th edition..*

Estudos têm mostrado que, devido à fraca reprodutibilidade interobservador do GsC, é difícil alcançar concordância mútua (Allsbrook *et al.*, 2001; Burchardt *et al.*, 2008), por se tratar de um método subjetivo, dependente da avaliação comparativa realizada pelo patologista. Além disso, quase 20% dos casos de prostatectomia radical mostram padrões terciários, o que significa que uma amostra de biópsia de agulha pode apresentar um padrão mais elevado de Gleason terciário, resultando em superestimação aparente da biópsia por agulha (Epstein *et al.*, 2012). Essa falta de concordância é importante principalmente em pacientes com CaP, bem como em indivíduos que são candidatos para ou estão sob vigilância ativa, ou seja, pacientes com o diagnóstico de CaP não são submetidos à cirurgia por preencherem critérios de baixa agressividade tumoral, podendo ser observados e examinados com frequência, na tentativa de se evitar o tratamento cirúrgico ou radioterápico (Shapiro e Johnstone, 2012). Dessa maneira, há a preocupação em tentar enquadrar o paciente de acordo com a real agressividade imposta por sua doença, a fim de evitar que condutas mais espoliativas resultantes do tratamento possam ser oferecidas de forma desnecessária.

1.3 **Volume nuclear médio**

A análise morfométrica do núcleo das células envolvidas na neoplasia, principalmente nos casos de tumores epiteliais (carcinomas) tem sido considerada um indicador confiável para o diagnóstico e gradação de malignidade e tem sido empregada para prever o resultado terapêutico, incluindo CaP. A morfometria nuclear representa um método quantitativo que avalia dimensões, proporções e formas do núcleo da célula cancerosa (Sorensen, 1992).

O fator de esfericidade nuclear (Epstein *et al.*) tem sido utilizado na avaliação de diferentes tipos de tumores, no entanto a execução do método, para aferir a medida exata do núcleo, é complexa, devido ao uso de réguas microscópicas ou sistemas de análise de imagens, que ainda, podem não apresentar resultados desejáveis (Mandarim-de-Lacerda, 1999).

Diversos autores relataram uma associação significativa entre a evolução do CaP e dados da análise morfométrica do núcleo da célula neoplásica (Arima *et al.*, 1997; Fujikawa *et al.*, 1999; Soda *et al.*, 1999). Os parâmetros morfométricos nucleares refletem variações na área e forma do núcleo, sendo reprodutível pelo mesmo ou por diferentes examinadores. Tem sido proposta para a avaliação do núcleo de células tumorais a determinação do “volume nuclear médio ponderado”, ou VNM (em inglês, *mean nuclear volume*) (Gundersen e Jensen, 1985). Em comparação ao FEN, o VNM é de execução rápida e alcança resultados reprodutíveis no estudo das características nucleares de células neoplásicas (Mandarim-de-Lacerda, 1999).

Descrito em 1985 por Gundersen e Jensen, o VNM é um estimador estereológico do volume nuclear médio ponderado das partículas de formas arbitrárias, ou seja, para qualquer mistura de elipsóides (esferas, esferóides ovais-oblatos ou elipsóides triaxiais). Esse estimador é baseado no método da "intercessão dos pontos amostrados", sendo única exigência de que as partículas individuais devam ser, inequivocamente, identificadas por seus perfis em cortes aleatórios. Em suma, o estimador é reduzido a uma simples função de medições de diâmetros no plano de corte (Gundersen e Jensen, 1985). Os detalhes são informados especificamente na sessão: Estereologia, em materiais e métodos.

1.4 **PCNA e VEGF no câncer de próstata**

A proliferação celular é uma condição fundamental para a progressão tumoral, tanto em tumores primários, quanto em áreas metastáticas. O PCNA é reconhecido como um marcador histológico na fase G1/S do ciclo celular, tendo um comportamento fundamental na replicação celular (Zhong *et al.*, 2008). O PCNA tem como papel coordenar as atividades celulares para o seu crescimento, morte e manutenção funcional. Esse conjunto orquestra um possível alvo terapêutico em pacientes com CaP (Wang, 2014).

Estudos prévios mostraram que a imunomarcação para PCNA no tecido tumoral é pouco associada com valor prognóstico, mas frequentemente usado como marcador de proliferação e é constantemente superexpresso nas células cancerígenas (Wang, 2014). Um motivo plausível para esses achados encontra-se no fato de que os trímeros do PCNA estão dispostos em dois poços de células que correspondem a funções diferentes no CaP (Wang, 2014). No entanto, ainda não há recursos para diferenciar essas duas populações de células, sendo, atualmente, um dos motivos que não faz do PCNA um bom previsor prognóstico no câncer. Sua inibição, contudo, é uma estratégia anticâncer factível (Wang, 2014).

Um dos conhecidos fatores pró-angiogênicos, o VEGF, está associado com o crescimento vascular de diversos tumores e sua expressão aumentada é primariamente induzida pela hipóxia (Claffey *et al.*, 1996). Os hormônios androgênicos são importantes reguladores do VEGF, sugerindo que a evolução do CaP pode ser influenciada por regulação hormonal, como os receptores androgênicos, estrogênio, progesterona, vitamina D e outros (Walczak *et al.*, 2004; Cardus *et al.*, 2009; de Brot *et al.*, 2015).

O aumento da expressão do VEGF no CaP também está associado ao estágio clínico, ao aumento nos graus maiores do escore de Gleason e nos casos metastáticos (pacientes com doença metastática possuem níveis mais elevados de VEGF do que pacientes com doença localizada) (Green *et al.*, 2007). Tendo em vista a associação do VEGF com a angiogênese tumoral e proliferação celular, algumas terapias que visam à atuação no fator de crescimento endotelial vascular estão sendo estudadas em ensaios clínicos com aplicações promissoras (Kollermann e Helpap, 2001).

2 OBJETIVOS

Analisar, com auxílio da estereologia e de marcadores biológicos, o comportamento do câncer de próstata de acordo com a graduação de Gleason. Para isso foram desenvolvidos dois trabalhos.

Objetivos Específicos

O primeiro estudo tem por objetivo avaliar se o volume nuclear médio ponderado (VNM) pode acrescentar relevância ou substituir a graduação de Gleason, por ser um método objetivo, de boa reprodutibilidade e fácil execução.

O segundo estudo tem por objetivo avaliar, através da imunohistoquímica, a expressão dos marcadores biológicos PCNA e VEGF, no CaP, relacionando à classificação de Gleason e à densidade da imunomarcação quantificada, através do *software*, de modo a evitar a subjetividade do avaliador.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os presentes estudos seguem os princípios enunciados na Declaração de Helsinki e foram aprovados pelo comitê de ética local para pesquisa científica, sob número CAAE:26713914.5.0000.5259. As amostras vieram de diferentes urologistas que atuam na Casa de Saúde São José, do Rio de Janeiro e o Gpp foi criado por apenas um patologista treinado (CM-O).

O primeiro estudo foi realizado com amostras obtidas de 74 pacientes submetidos à prostatectomia radical como uma terapia de primeira escolha para o CaP localizado e localmente avançado (Leze *et al.*, 2014).

Os pacientes foram divididos em seis grupos com base no Gpp e o antígeno prostático específico (PSA) de cada amostra foi observado antes da cirurgia. Três grupos representaram os tipos de padrão primário (regiões tumorais, T) de Gpp 3 (G3, n = 20), Gpp 4 (G4, n = 28), e Gpp 5 (G5, n = 26). Os controles foram projetados em regiões não tumorais (NT) pareados das mesmas amostras e foram referidos como C3 (para regiões NT das amostras de Gleason 3), C4 (para regiões NT das amostras de Gleason 4) e C5 (para regiões de NT para amostras de Gleason 5).

3.1 **Metodologia para a análise estereológica da próstata**

3.1.1 Histologia

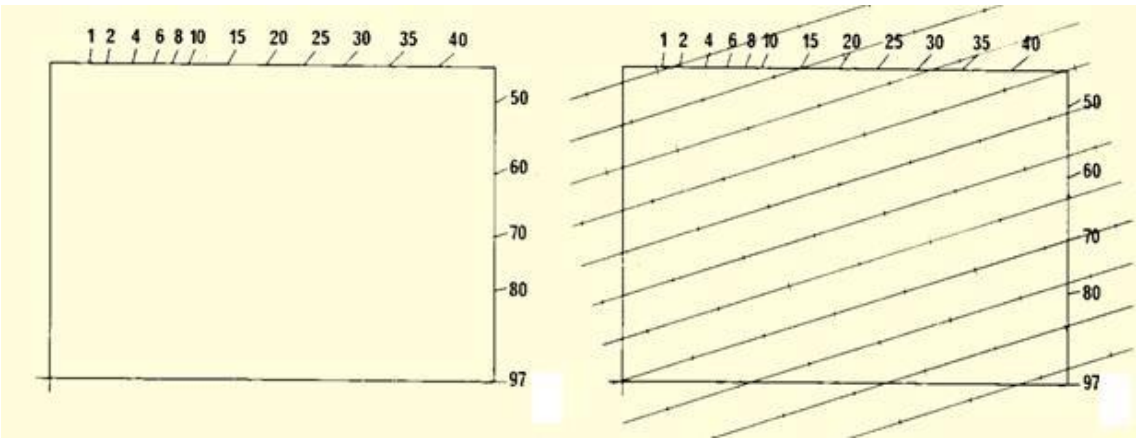
O material foi fixado rapidamente durante 48h em formaldeído (4% wt/v em tampão fosfato0,1 M, pH 7,2), embebido em parafina, seccionado com uma espessura de 5 µm, e corado com hematoxilina e eosina. Os cortes foram analisados com objetiva plano acromática de imersão em óleo (x100) em um microscópio Olympus BX51 (Olympus América, Miami, EUA) e uma câmera digital Infinity 1-5c (Lumenera, Ottawa, ON, Canadá). As imagens digitais foram obtidas para a quantificação de regiões T e NT, tal como definido pelo patologista especialista.

3.1.2 Estereologia

Realizada na amostragem por pontos em linhas-teste. Os núcleos são amostrados com uma probabilidade diretamente proporcional ao seu volume.

O VNM foi estimado utilizando o método da "intercessão dos pontos amostrados" em cinco campos microscópicos diferentes por paciente, totalizando pelo menos 50 núcleos por amostra (Gundersen e Jensen, 1985). Um sistema teste, que consiste em linhas paralelas associadas com pontos teste, foi sobreposto a cada campo do microscópio, como indicado abaixo na Figura 5.

Figura 5: Sistema de linhas paralelas interceptadas por pontos



Legenda: A figura ilustra o modelo de linhas paralelas para a estimação estereológica do volume nuclear médio ponderado.

3.1.3 Amostragem dos núcleos

Os núcleos são amostrados numa área-teste orientada, como visto na Figura 5. A área- teste tem indicações numéricas nos lados superior e lateral direito. Nas indicações numéricas alinha-se um sistema-teste, com pontos equidistantes sobre linhas paralelas, que foi construído em uma folha de acetato transparente e aplicado sobre a área-teste, no monitor plano LCD do computador. O espaçamento dos pontos não deve ser menor que a média do tamanho dos núcleos que serão medidos.

Esse sistema deve ser alinhado passando por um dos números que constam da área-teste e pelo ponto zero (cruzamento de *x* e *y* no canto inferior esquerdo). As

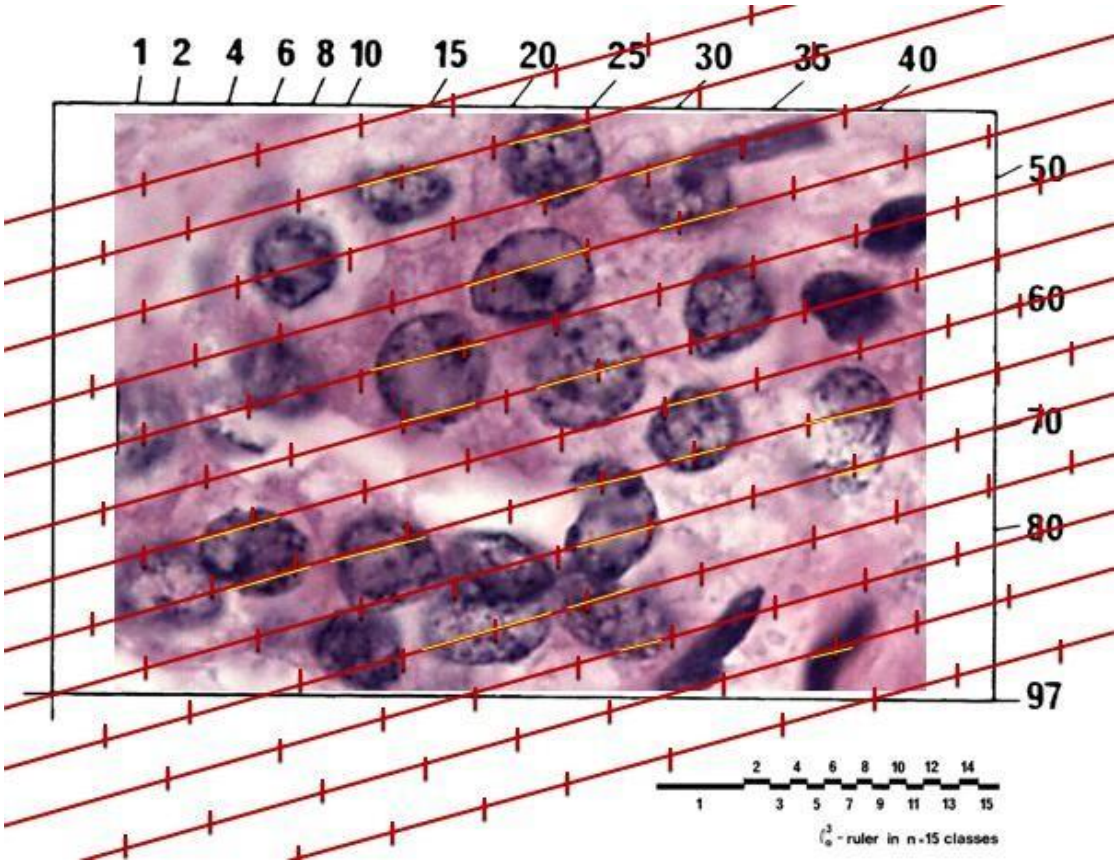
medidas são feitas determinando um número aleatoriamente (por sorteio) e alinhando-se o sistema-teste à área- teste conforme o número selecionado (veja a Figura 6).

3.1.4 Medida dos núcleos

Após o alinhamento do sistema-teste sobre a área-teste são medidos apenas os núcleos tocados pelos pontos do sistema-teste. Os núcleos interceptados pelas linhas superior e lateral direita são excluídos (Gundersen e Jensen, 1985). O núcleo que é tocado pelo ponto teste tem seu trecho de intersecção na linha deste mensurado com uma régua logarítmica (Mandarim-de-Lacerda, 1999).

A régua logarítmica é construída com 15 classes, de modo que a largura da 1ª e da 15ª classe está em uma razão de 1:10 na escala logarítmica, em que a largura de qualquer classe é aproximadamente 17% maior do que a da classe anterior (Mandarim-de-Lacerda,1999).

Figura 6: Exemplo de estimação estereológica do volume nuclear médio ponderado



Legenda: O número sorteado foi 70, as linhas amarelas mostram os núcleos medidos através do sistema de linhas paralelas interceptadas por pontos. No canto inferior direito, a régua logarítmica responsável pelas classes de cada núcleo.

Fonte: Adaptado de, Mandarim-de-Lacerda, 1999.

O sistema-teste é construído para interceptar os núcleos, normalmente apenas uma vez, porém, quando um núcleo é tocado por mais de um ponto, a mensuração do trecho de interseção deve considerar o número de vezes em que o núcleo é amostrado (Gundersen e Jensen, 1985). As medidas obtidas com a régua logarítmica são expressas em classes e devem ser convertidas em uma unidade de volume, através da seguinte fórmula (Mandarim-de-Lacerda, 1999):

$$VNMP = \left(\frac{\sum (E \cdot F)}{\sum F} \right) \cdot \left(\frac{\pi}{3} \right) \cdot \left(\frac{10^4}{A} \right)$$

Sendo ***F*** a mediana do número de núcleos medidos em cada classe da régua, ***E*** o comprimento da classe da régua em milímetros e ***A*** o aumento final da microscopia. O resultado estará convertido em μm^3.

3.1.5 Cálculos do VNM

Cada intersecção com os núcleos foi mensurada e multiplicada por π/3 para o valor do VNM. Além disso, quantificou-se a densidade numérica nuclear por área, ou seja, o número de perfis nucleares por área (NA) da fotomicrografia, que no nosso caso mediu 5.675 μm^2.

Uma planilha de cálculo foi organizada no programa Microsoft Excel para a determinação dos valores do VNM dos casos estudados. Após a inclusão do número de medidas por classes da régua logarítmica, a planilha calculou o resultado final do VNM.

3.1.6 Análise estatística referente aos dados estereológicos

A correlação de Spearman ($R_{[Spearman]}$) foi estimada para determinar as correlações entre: a) GS_C e PSA, b) VNM e PSA, e c) Gpp e VNM.

As diferenças do VNM entre os grupos e dentro dos grupos C e G foram analisados com o teste de Kruskall-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

As diferenças que resultaram quando se comparou cada Gpp com o seu homólogo do grupo controle foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. Os dados são apresentados como a mediana e o intervalo de confiança de 95% (IC). O valor de $P<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O programa Prism foi utilizado para realizar as análises estatísticas e gerar os gráficos (versão 6.05 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3.1.7 Imunohistoquímica da próstata

O segundo estudo, relacionado ao PCNA e VEGF, foi realizado com amostras obtidas de 15 pacientes submetidos à prostatectomia radical como terapia de primeira escolha para o CaP localizado e localmente avançado. Os pacientes foram divididos em seis grupos com base no Gpp. Três grupos representaram os tipos de padrão primário (regiões tumorais, T) de Gpp 3 (G3, n = 5), Gpp 4 (G4, n = 5), e Gpp 5 (G5, n = 5).

Os controles foram projetados em regiões não tumorais (NT) pareados das mesmas amostras e foram referidos como C3 (para regiões NT das amostras de Gleason 3), C4 (para regiões NT das amostras de Gleason 4) e C5 (para regiões de NT para amostras de Gleason 5).

Após prostatectomia radical, a próstata foi incluída em Paraplast-plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), os cortes foram seccionados à espessura de 5 µm, desparafinizado com xilol e reidratados com álcool em concentrações decrescentes, na sequência foi realizada a recuperação antigênica utilizando tampão citrato com pH 6,0 a 60º C durante 20 minutos. A peroxidase endógena foi inativada com peróxido de hidrogênio a 3%, entre todas as etapas foram utilizadas lavagens com a solução salina fosfato tamponada (PBS) com pH 7,4 durante 5 minutos. Os cortes da próstata foram incubados respectivamente com os anticorpos primários anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, M0879, DakoCytomation) ou anti-fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, SC-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) na diluição de 1:100 durante 2 horas. Na sequência, as amostras foram tratadas com um anticorpo biotinilado, utilizado como anticorpo secundário e detectado por reação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB+Kit, K0679, DakoCytomation).

As imunomarcações positivas foram detectadas após incubação com o cromógeno diaminobenzidina por 3 minutos (K3466, DAB, DakoCytomation) e contracorados com a hematoxilina de Mayer. As imagens digitais foram obtidas com um microscópio BX51 (Olympus Co.,Tókio, Japão), acoplado a uma câmera 1-5c (Lumenera Co., Ottawa, Canada). Foram adquiridas imagens de 5 campos microscópicos diferentes por paciente, com auxílio da ferramenta de seleção de densidade da imunomarcação, que foi utilizada, para selecionar e quantificar as

áreas anti-PCNA e anti-VEGF da próstata, analisadas com o software Image- Pro Plus versão 7.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

3.1.8 Análise estatística referente a Imunohistoquímica

Os dados foram analisados para a distribuição normal e homocedasticidade das variâncias. As diferenças entre os grupos foram avaliadas com teste *t*-pareado ou ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak. Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Valor de $P<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (Prism versão 6.05 para Windows, GraphPad Software, La Jolla CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 As correlações de *Spearman*

a) PSA *vs* Escore de Gleason

A correlação entre o PSA e o GSC foi moderadamente forte, mostrando um valor do R[Spearman] de 0,76, com IC de 95% de 0,62 a 0,85, que é altamente significativo (P <0,0001) (Figura 7).

b) PSA *vs* VNM

A correlação entre o PSA e o VNM foi moderadamente forte, mostrando um valor do R[Spearman] de 0,78 com um IC de 95% de 0,65 a 0,86, que foi altamente significativo (P <0,0001). Os coeficientes de correlação de Spearman foram significantes e moderadamente fortes, respectivamente (Figura 7).

c) VNM *vs* Escore de Gleason

A correlação entre VNM e o GSc foi moderada, mostrando um valor do R [Spearman] de 0,53, com IC de 95% entre 0,30 a 0,69, o que foi significativo (P <0,0001). O coeficiente de correlação de Spearman foi moderado, R [Spearman] de 0,53 (IC de 95% entre 0,30 a 0,69, P <0,0001), (Figura 8).

Figura 7: Correlação entre os valores de antígeno prostático específico (PSA) com o escore de Gleason e o volume nuclear médio (VNM)

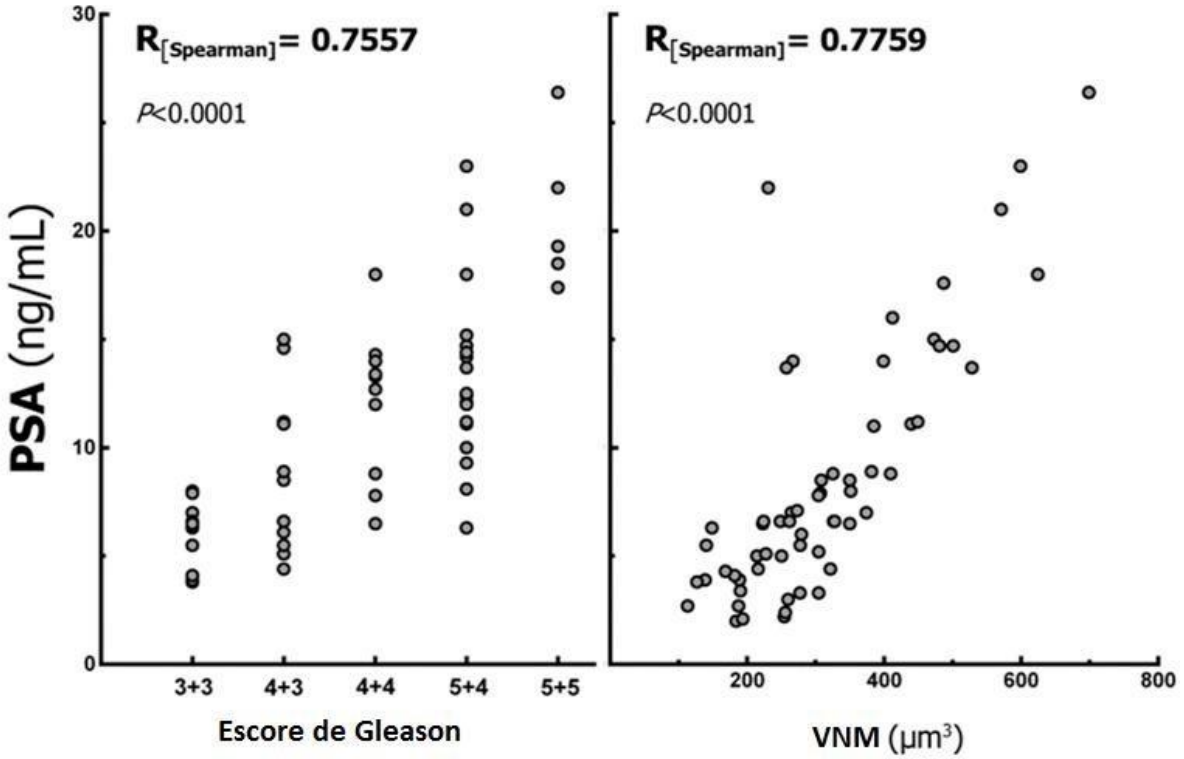
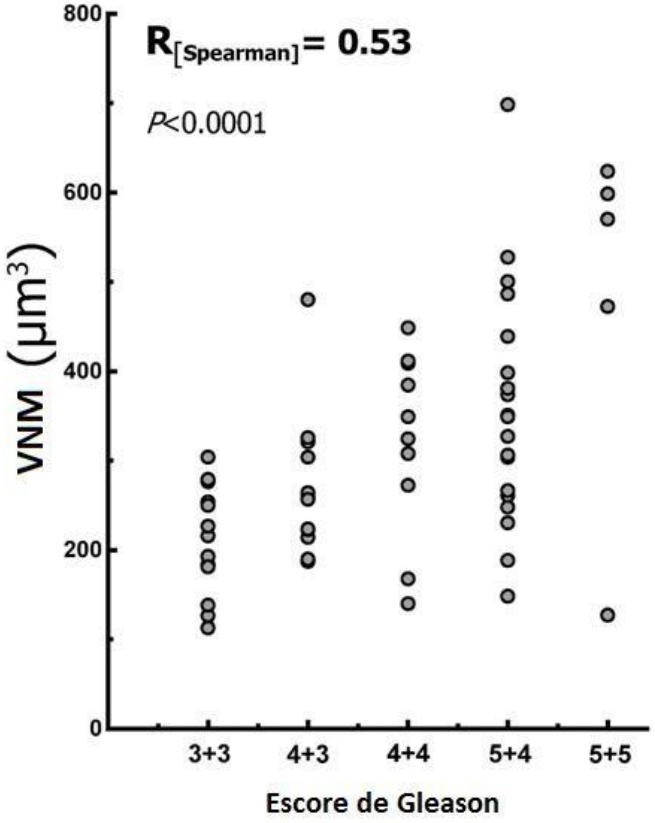
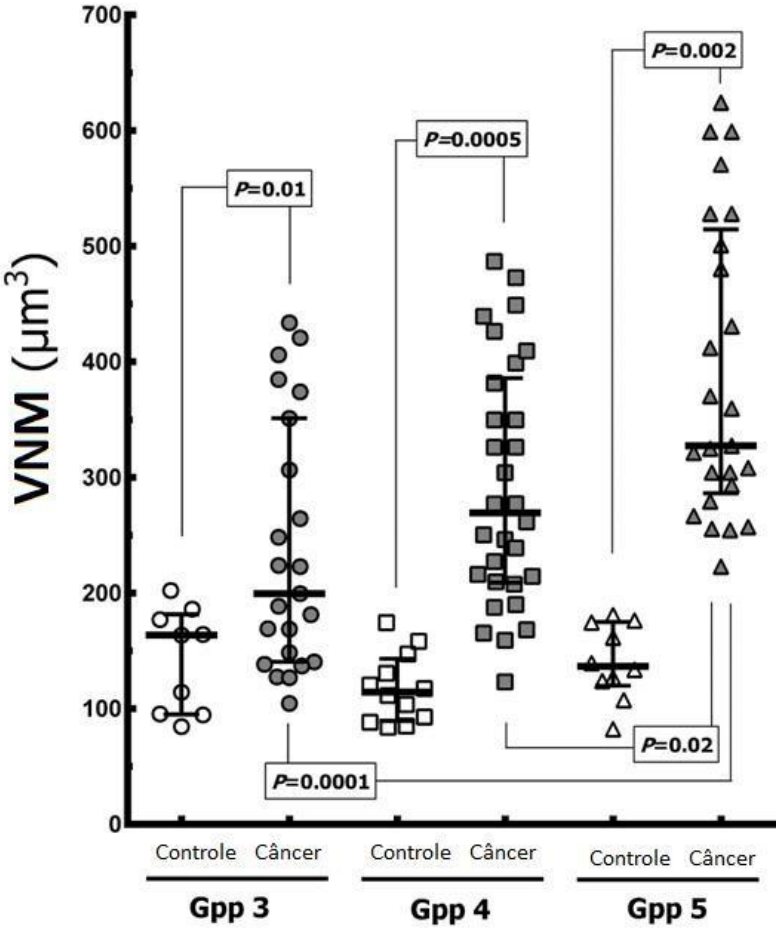


Figura 8: Correlação entre o volume nuclear médio (VNM) e o escore de Gleason.



A dispersão do VNM para os grupos está detalhada na figura 5 e Tabela 1. As diferenças foram significativas quando comparado o VNM com um Gpp tendo os seus homólogos do grupo controle. O VNM foi significativamente maior em regiões cancerígenas do que em regiões do controle pareado com 22% no Gpp3, 135% no Gpp4, e 140% no Gpp5. Houve um aumento contínuo no VNM em regiões cancerígenas de Gpp3 a Gpp5. Essas diferenças foram significativas, e o VNM do grupo G5 foi de 64% maior em comparação ao G3 e 22% maior do que o G4. Embora o valor do VNM tenha sido maior no G4 em comparação ao G3, essa diferença não foi significativa e pode ser justificada com base no tamanho da amostra.

Figura 9: Dispersão do volume nuclear médio (VNM) nos grupos com as medianas, nas linhas horizontais (IC de 95%; Controle e Câncer Gpp3 P= 0.01, Controle e Câncer Gpp4 P= 0.0005, Controle e Câncer Gpp5 P= 0.002).



Podem ser avaliadas, de maneira mais criteriosa, as diferenças percentuais entre os grupos controle e tumorais; ainda, as diferenças entre os Gpp 3, Gpp4 e Gpp5, além das variações de seus volumes e as respectivas medianas.

Tabela 1: O volume nuclear médio (VNM) nos grupos

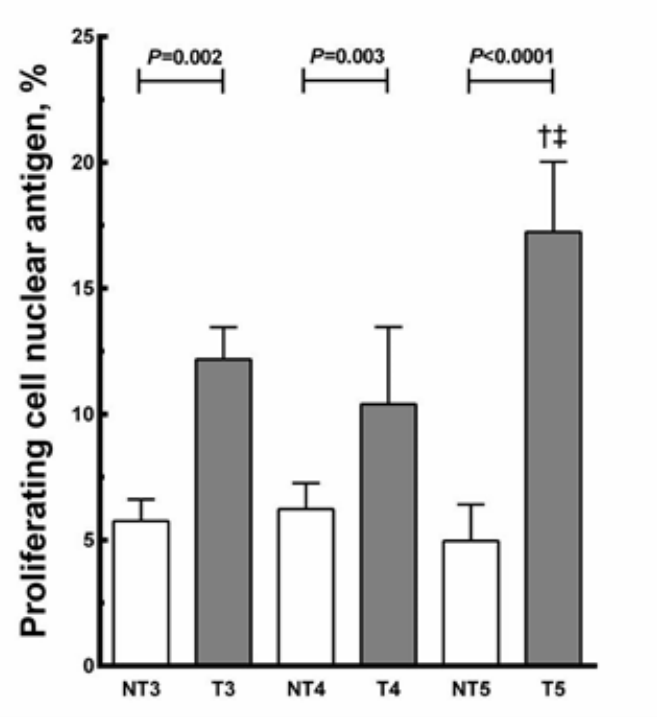
Gpp	Controle (VNM, µm³)		Câncer (VNM, µm³)		Variação			
	Mediana	95% IC	Mediana	95% IC	%			
3	163.6	94.7 a 186.2	199.6	148.5 a 306.6	C3 *vs.* G3	+22	G3 *vs.* G5	+64
4	114.4	88.3 a 147.4	269.3	216.0 a 349.6	C4 *vs.* G4	+135	G3 *vs.* G4	-
5	136.6	107.2 a 176.2	327.4	304.3 a 480.5	C5 *vs.* G5	+140	G4 *vs.* G5	+22

Legenda: A significância das variações do grupo Controle (C) e do grupo padrão primário de Gleason (Gpp) nos grupos Câncer (G) estão indicados.

4.2 **Imunomarcação para PCNA**

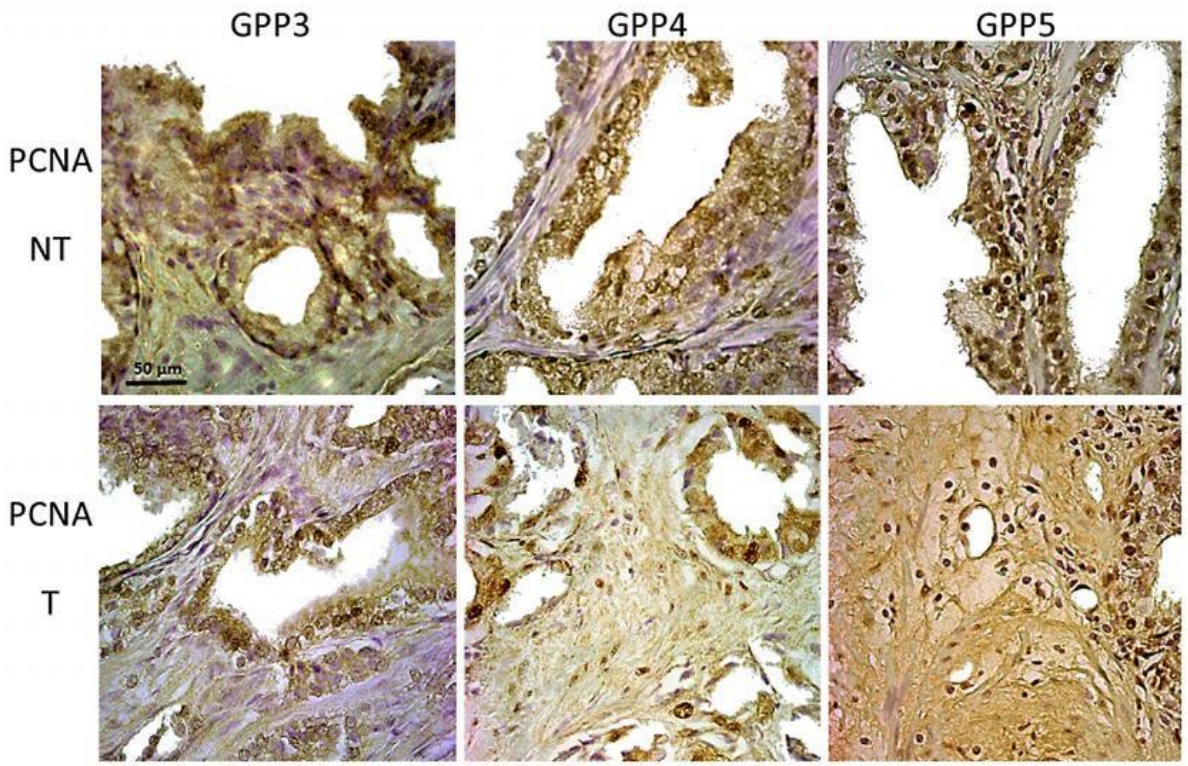
Foi observada imunomarcação positiva para PCNA e a diferença foi significativa quando comparado as áreas não tumorais com as tumorais. As células cancerígenas foram mais intensamente coradas no grupo Gpp5 (17.2%) quando comparadas ao grupo Gpp3 (12.18% P= 0.014) e ao grupo Gpp4 (10.4 P= 0.003) (Figura 10). As fotomicrografias referentes à marcação do anticorpo anti-PCNA mostram marcação citoplasmática nas áreas não tumorais, que correspondem a áreas de tecido prostático benigno. Nas áreas tumorais de adenocarcinoma prostático tal marcação apresenta-se também positiva, de intensidade maior que os grupos controle (Figura 11).

Figura 10: Percentual de imunomarcação para PCNA com diferença significativa comparando as áreas não tumorais com as tumorais



Legenda: As células cancerígenas foram mais intensamente coradas no grupo Gpp5 quando comparadas ao grupo Gpp3 e ao grupo Gpp4. NT: Não tumoral. T: Tumoral. Gpp = Padrão primário de Gleason, referentes aos graus 3, 4 e 5 de Gleason.

Figura 11: Fotomicrografias com marcação do anticorpo anti-PCNA no citoplasma das células glandulares

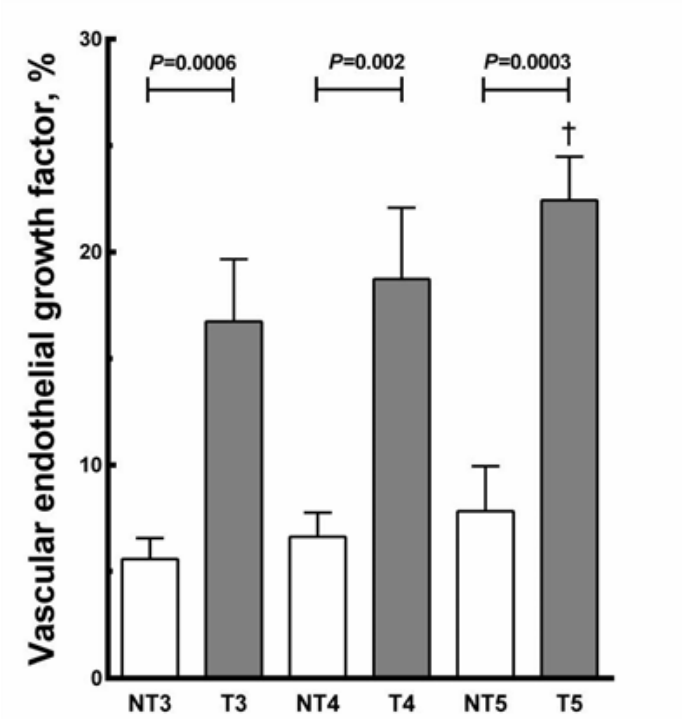


Legenda: Observa-se marcação citoplasmática nas áreas não tumorais, que correspondem a áreas de tecido prostático benigno. Nas áreas tumorais de adenocarcinoma prostático tal marcação apresenta-se também positiva, de intensidade maior. NT: Não tumoral. T: Tumoral. Gpp = Padrão primário de Gleason, referentes aos graus 3, 4 e 5 de Gleason, (mesmo aumento em todas as fotomicrografias).

4.3 **Imunomarcação para VEGF**

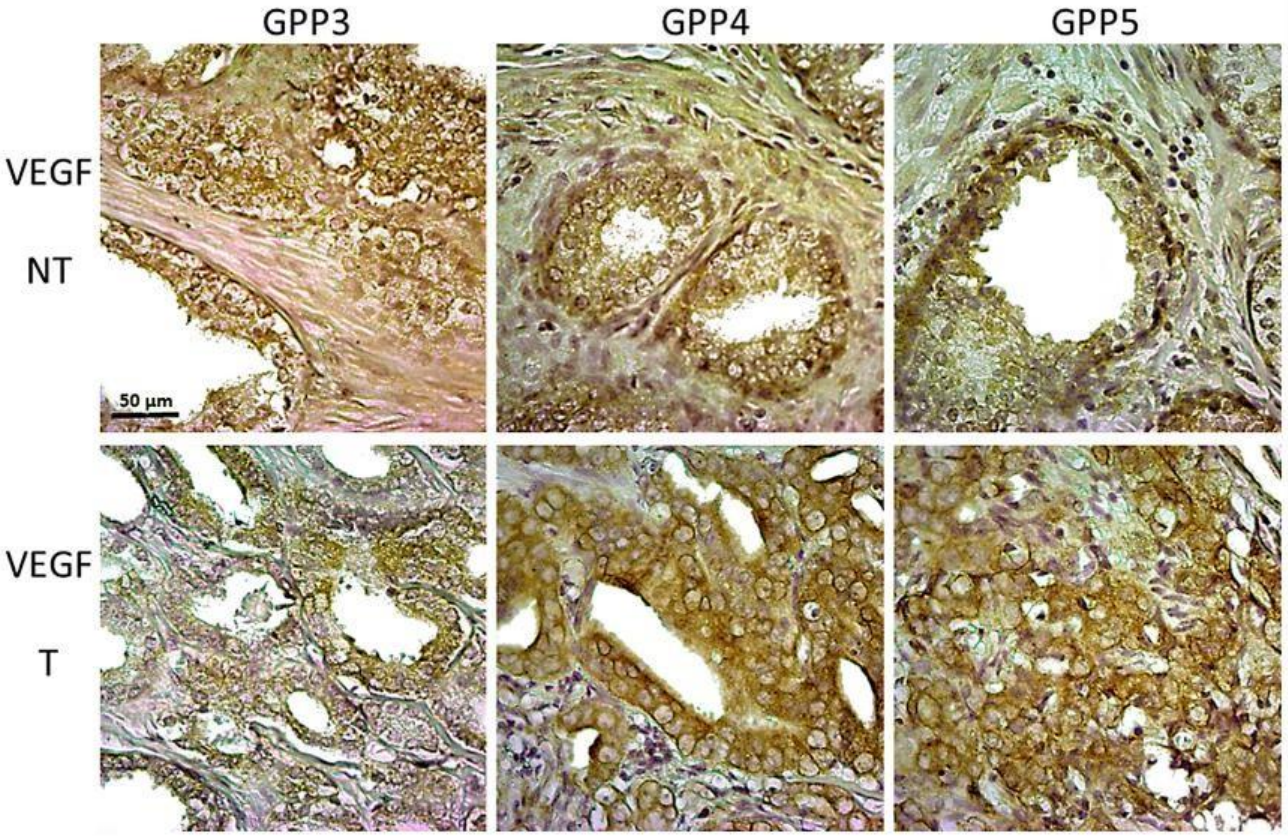
Observamos áreas de imunomarcação positiva para VEGF e a diferença foi estatisticamente significativa comparando as áreas não tumorais com as tumorais. As células cancerígenas apresentaram-se intensamente mais imunocoradas no grupo Gpp5 (22.4%) quando comparadas ao grupo Gpp3 (16.7%, P=0.02), porém não apresentaram resultado semelhante em relação ao grupo Gpp4 (18.7% P= 0.11) (Figura 12). As fotomicrografias referentes à marcação do anticorpo anti-VEGF apresentaram marcação citoplasmática nas áreas não tumorais, que correspondem a áreas de tecido prostático benigno. Nas áreas tumorais de adenocarcinoma prostático tal marcação apresenta-se também positiva, no entanto, de intensidade maior que os grupos controle (Figura 13).

Figura 12: Percentual de imunomarcação para VEGF com diferença significativa comparando as áreas não tumorais com as tumorais



Legenda: As células cancerígenas foram mais intensamente coradas no grupo Gpp5 quando comparadas ao grupo Gpp3, mas não ao grupo Gpp4. NT: Não tumoral. T: Tumoral. Gpp = Padrão primário de Gleason, referentes aos graus 3, 4 e 5 de Gleason.

Figura 13: Fotomicrografias das imunomarcações para VEGF



Legenda: Notam-se marcações nas células basais dos tecidos não tumorais, enquanto nas células tumorais a marcação é esparsa pelo estroma prostático. NT: Não tumoral. T: Tumoral. Gpp = Padrão primário de Gleason, referentes aos graus 3, 4 e 5 de Gleason, (mesmo aumento em todas as fotomicrografias).

5 **DISCUSSÃO**

No presente estudo, houve correlações significativas e moderadamente fortes entre o PSA e o GSC e entre o PSA e o VNM. A correlação entre o Gpp e o VNM também foi significativa, mas moderada. Esses resultados indicam que, tanto o Gpp, quanto o VNM são parâmetros auxiliares no diagnóstico e / ou vigilância do CaP. Isso é extremamente relevante, pois, como mencionado, GSC é um método comparativo que depende da formação do patologista, enquanto VNM é baseado em contagens obtidas, através do desenho, baseado na estereologia.

No presente estudo, em vez do GSc, o Gpp foi comparado com o VNM para obter os resultados mais confiáveis possíveis, quando o mais alto padrão de Gleason era utilizado, através da recomendação da *ISUP* de 2005, a fim de estabelecer a gravidade tumoral pelo maior grau afetado. Com essa estratégia, não houve diferença quando se compara o GSC original e as modificações da ISUP aplicadas a partir de 2005. No entanto, quando o PSA foi correlacionado com o GSC e o VNM, as modificações da *ISUP* 2005 mostraram diferença positiva.

O VNM foi significativamente diferente quando se compararam regiões de controle (não- tumorais) com regiões contendo o tumor, indicando que VNM é uma alternativa eficaz para avaliar o CaP nos casos em que a imunohistoquímica está indisponível ou para aumentar a confiabilidade do diagnóstico. Além disso, o aumento do valor do VNM do Gpp3 para o Gpp5 foi diferente entre o Gpp3 e Gpp5 e entre o Gpp4 e Gpp5. Ressaltamos que a observação de nenhuma diferença no VNM entre o Gpp3 e Gpp4 é possivelmente devido ao tamanho da amostra. Estudos adicionais poderiam esclarecer esse ponto no futuro. As classificações de Gleason convencional e modificada foram correlacionadas com a idade, PSA sérico e o envolvimento do câncer em biópsias de agulha (Helpap e Egevad, 2008).

Além disso, houve uma forte correlação entre o GSc e o volume do tumor em tumores bem diferenciados ou com diferenciação intermediária, e considerando que quantidades relativamente altas de PSA por unidade de volume de câncer são produzidos, a alta densidade do PSA foi o prognóstico mais forte independente do subestadiamento do tumor. No entanto, como os tumores de grau superior produzem menos PSA por unidade de volume, a densidade do PSA perde a sua

capacidade preditiva, e outros marcadores clínicos de volume tumoral, tais como a doença palpável e os números de núcleos positivos se tornam mais preditivos (Corcoran *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2012). Logo o VNM pode contribuir significativamente para a predição de um controle bioquímico (PSA) (Matsui *et al.*, 2004).

Estudos têm mostrado que a reprodutibilidade interobservador do sistema de classificação de Gleason permanece moderada (Allsbrook *et al.*, 2001; Oyama *et al.*, 2005). Embora a magnitude de discordância seja bastante modesta, as proporções substanciais de biópsia e prostatectomia das amostras tinham diferente GSC atribuído no momento do diagnóstico (63% para a biópsia e 72% para a prostatectomia), em comparação com aqueles designados por análise de especialistas (Goodman *et al.*, 2012). Deve-se ressaltar que, no presente estudo, o material estudado foi oriundo de prostatectomias radicais como a terapia de primeira escolha para CaP localizado e localmente avançado, e o GSC foi atribuído por uma única patologista especialista em CaP, o que certamente tende a minimizar o viés de atribuição GSC.

A identificação confiável do adenocarcinoma bem diferenciado de próstata em amostras de biópsia continua sendo um desafio (Fanning *et al.*, 2010). Para medir essa confiabilidade, a concordância entre os patologistas foi testada, e o GSC atribuído por 15 especialistas em patologia urológica que avaliaram quinze amostras de biópsias de CaP e foram comparados os GSC atribuídos por 337 membros da *European Network of Uropathology*. A concordância entre especialistas e membros foi baixa (média de 71,4% no GSC 6, e a média de 56,4% no GSC 7 (P = 0,009). A classificação de alto grau de CaP como GSC 4+3 e GSC 8-10 resultou em níveis mais elevados de concordância entre biópsia e prostatectomia radical (Egevad *et al.*, 2013).

Além disso, existe ampla discordância na literatura relatando desacordo entre o GSC atribuído a pacientes com diagnóstico de biópsia por agulha e após a prostatectomia radical (Shapiro e Johnstone, 2012; Rapiti *et al.*, 2013). Há, portanto, uma tendência geral para subgraduação das amostras de biópsias, e estes graus de concordâncias são, possivelmente, suportados pelo número de punções obtidas da biópsia (dez ou mais punções de biópsia por agulha elevaram a proporção de uma correspondência exata para 72%) (Rapiti *et al.*, 2013) ou, o fato de que mais de um

terço dos pacientes, em que se verificou, as amostras foram subgraduadas com base na biópsia inicial da próstata (Shapiro e Johnstone, 2012).

Por outro lado, a superestimação do GSC em extensas biópsias da próstata ou a presença de um maior padrão de Gleason terciário obtido em uma amostra de biópsia de agulha, que se encontra em quase 20% da prostatectomia radical, pode expor os indivíduos para tratamento agressivo desnecessário (Epstein *et al.*, 2012; Katz *et al.*, 2012). Portanto, a homogeneidade das amostras e a atribuição do GSC no presente estudo devem ser consideradas contribuições válidas para a classificação e diagnóstico do CaP.

Nota-se que o presente estudo foi realizado com amostras obtidas de prostatectomia radical, e o GSC levou em consideração as modificações feitas pelo *ISUP* em 2005, as quais tentaram melhorar a correlação entre a biópsia e a prostatectomia radical. Essas mudanças poderiam ser as razões para algumas diferenças em relação à correlação entre o VNM e o GSC quando se comparam resultados relatados anteriormente (antes de 2005), quando não houve correlação entre o GSc e o VNM, sendo as amostras histológicas retiradas de biópsias por agulha (Arima *et al.*, 1997), e os presentes achados.

O estudo das alterações fisiopatológicas associadas com doenças humanas que envolvem mutações na estrutura nuclear tem esclarecido muitas funções fisiológicas da estrutura e organização nuclear. Alterações na forma nuclear podem ser um resultado das forças que atuam sobre a matriz extracelular ou de processos intracelulares, que se pensa serem transmitidos para o núcleo através do citoesqueleto celular (Dahl *et al.*, 2008). Como os tumores malignos podem alterar a forma nuclear, e aumentar a sua dimensão, a estimativa de alargamento nuclear em termos de volume, em um método tridimensional parece ser necessária (Buhmeida *et al.*, 2000).

Desde 1985, os patologistas e pesquisadores têm explorado a possibilidade de estimar o volume médio de partículas de forma arbitrária (Gundersen e Jensen, 1985). Um estudo mostrou a associação entre o VNM e o tempo de duplicação do PSA, que correlacionou positivamente o VNM com o comportamento e prognóstico do CaP (Arai *et al.*, 2001a), sugerindo o VNM como valor prognóstico da recorrência bioquímica do PSA para pacientes com doença confinada ao órgão clinicamente tratado com prostatectomia radical (Arai *et al.*,01b).

Os resultados do presente estudo estão de acordo com esta correlação entre os níveis de VNM e o PSA, bem como o VNM e o Gpp. Além disso, os resultados de estudos de combinação de PSA e o volume estimado do tumor, com estimativas de VNM têm contribuído significativamente para a previsão da gravidade pela fase patológica do CaP, sugerindo a utilização desses três fatores para prever esta fase do CaP antes da cirurgia (Fujikawa *et al.*,2000a; Fujikawa *et al.*, 2000b).

No segundo estudo descrito previamente, a imunomarcação para PCNA e VEGF no CaP foi eficiente em diferenciar as áreas não tumorais das tumorais no mesmo paciente, assim como mostrou capacidade de diferenciar o Gpp de classe maior, a 5. É digno de nota que esse trabalho analisou tecidos oriundos de prostatectomia radical, obtidos como a primeira escolha na terapia de cânceres de próstata locais ou localmente avançados; casos com doença metastática não foram incluídos pois não se enquadram como candidatos à prostatectomia radical.

A atuação androgênica na carcinogênese da próstata é conhecida desde 1941 (Huggins e Hodges, 2002), sendo, ainda importante nos cânceres localizado e metastático (Wang *et al.*, 2009). Por isso, a privação androgênica como forma terapêutica é capaz de impedir ou retardar a progressão tumoral, mas alguns casos são refratários, capazes de ignorar a dependência androgênica, remanescendo incuráveis (de Brot *et al.*, 2015).

Entre os mediadores de crescimento tumoral e metástase, os fatores pró angiogênicos se mostram importantes alvos para a contenção da progressão tumoral, pois as terapias que visam à vascularização tumoral têm sido promissoras (Harper e Bates, 2008). Ainda, pacientes com doença metastática possuem níveis séricos de VEGF mais elevados quando comparados aos pacientes com doença localizada; ainda, elevados níveis de VEGF estão associados com resultados menos favoráveis no tratamento de pacientes com CaP (Green *et al.*, 2007). Drogas utilizadas recentemente com atuação anti VEGF geraram efeitos colaterais notórios como sangramento gastrointestinal, perfuração intestinal e embolismo pulmonar (Mangoni *et al.*, 2012; Ogita *et al.*, 2012). Estudos mais recentes têm tentado esclarecer como combinações de novas terapias podem focar na sinalização de VEGF, com diminuições dos efeitos colaterais, mas mantendo os efeitos benéficos na redução tumoral (de Brot *et al.*,2015).

Estudos prévios mostraram que, a imunomarcação de PCNA no tecido tumoral está fracamente associada com valor prognóstico, mas frequentemente

usado como marcador de proliferação e frequentemente superexpresso nas células cancerígenas (Wang, 2014). A dificuldade em se mostrar um bom marcador prognóstico, como abordado previamente, está na incapacidade de diferenciar os diferentes poços dos trímeros do PCNA. No entanto, a estratégia de combate ao câncer merece voltar atenções à sua inibição.

CONCLUSÃO

Os dados atuais são a favor do uso de VNM associado com GSC e PSA na avaliação do CaP. A estimativa do VNM requer uma abordagem baseada em um projeto com algum envolvimento de matemática e estatística. De fato, nos moldes atuais, isso pode ser considerado pouco prático para uso amplo na avaliação rotineira do CaP pelo patologista tradicional. No entanto, com planejamento adequado do estudo, bem como a atual disponibilidade de equipamentos e programas para a quantificação morfológica, pode haver a estimativa rápida e precisa do VNM como parâmetro auxiliar para a avaliação do CaP.

Além disso, o PCNA e o VEGF foram mais expressos nos tecidos afetados pelo CaP, quando comparado aos tecidos benignos dos mesmos pacientes. Ressaltando que há tumores resistentes ao bloqueio hormonal com resposta inadequada às terapias atuais, os resultados apresentados indicam a possibilidade de um tratamento que aborde simultaneamente o PCNA e o VEGF.

A falta de agentes terapêuticos apropriados para evitar ou retardar a progressão do CaP, requerem inovações tanto no diagnóstico, como no prognóstico e tratamento do CaP mais eficazes.

REFERÊNCIAS

Allsbrook WC, Jr., Mangold KA, Johnson MH, Lane RB, Lane CG, Epstein JI. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: general pathologist. Hum Pathol 2001; 32:81-88.

Amoretti A, Laydner H, Bergfeld W. Androgenetic alopecia and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. J Am Acad Dermatol 2013; 68:937-943.

Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR *et al.* Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. J Natl Cancer Inst 2012; 104:125-132.

Arai Y, Egawa S, Kuwao S, Ogura K, Baba S. The role of volume-weighted mean nuclear volume in predicting tumour biology and clinical behaviour in patients with prostate cancer undergoing watchful waiting. BJU Int 2001a; 88:909-914.

Arai Y, Okubo K, Terada N, Matsuta Y, Egawa S, Kuwao S *et al.* Volume-weighted mean nuclear volume predicts tumor biology of clinically organ-confined prostate cancer. Prostate 2001b; 46:134-141.

Arima K, Sugimura Y, Hioki T, Yamashita A, Kawamura J. Stereologically estimated mean nuclear volume of prostatic cancer is a reliable prognostic parameter. Br J Cancer 1997; 76:234-237.

Baco E, Rud E, Eri LM, Moen G, Vlatkovic L, Svindland A *et al.* A Randomized Controlled Trial To Assess and Compare the Outcomes of Two-core Prostate Biopsy Guided by Fused Magnetic Resonance and Transrectal Ultrasound Images and Traditional 12-core Systematic Biopsy. Eur Urol 2015 (doi:10.1016/j.eururo.2015.03.041).

Barentsz JO, Richenberg J, Clements R, Choyke P, Verma S, Villeirs G *et al.* ESUR prostate MR guidelines 2012. Eur Radiol 2012; 22:746-757.

Bay NS, Bay BH. Greek anatomist herophilus: the father of anatomy. Anat Cell Biol 2010; 43:280-283.

Billis A, Guimaraes MS, Freitas LL, Meirelles L, Magna LA, Ferreira U. The impact of the 2005 international society of urological pathology consensus conference on standard Gleason grading of prostatic carcinoma in needle biopsies. J Urol 2008; 180:548-552; discussion 552-543.

Buhmeida A, Kuopio T, Collan Y. Nuclear size and shape in fine needle aspiration biopsy samples of the prostate. Anal Quant Cytol Histol 2000; 22:291-298.

Burchardt M, Engers R, Muller M, Burchardt T, Willers R, Epstein JI *et al.* Interobserver reproducibility of Gleason grading: evaluation using prostate cancer tissue microarrays. J Cancer Res Clin Oncol 2008; 134:1071-1078.

Cardus A, Panizo S, Encinas M, Dolcet X, Gallego C, Aldea M et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates VEGF production through a vitamin D response element in the VEGF promoter. Atherosclerosis 2009; 204:85-89.

Castro E, Goh C, Olmos D, Saunders E, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M et al. Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. J Clin Oncol 2013; 31:1748-1757.

Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. Eur Urol 2012; 61:1079-1092.

Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo KT, Manseau EJ et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. Cancer Res 1996;
56:172-181.

Corcoran NM, Casey RG, Hong MK, Pedersen J, Connolly S, Peters J *et al.* The ability of prostate-specific antigen (PSA) density to predict an upgrade in Gleason score between initial prostate biopsy and prostatectomy diminishes with increasing tumour grade due to reduced PSA secretion per unit tumour volume. BJU Int 2012; 110:36-42.

Cuzick J, Thorat MA, Andriole G, Brawley OW, Brown PH, Culig Z et al. Prevention and early detection of prostate cancer. Lancet Oncol 2014; 15:e484-492.

Dahl KN, Ribeiro AJ, Lammerding J. Nuclear shape, mechanics, and mechano transduction. Circ Res 2008; 102:1307-1318.

Dauge MC, Delmas V, Mandarim-de-Lacerda CA. Development of the human prostate during the first stages of fetal life. Morphometric study. Bull Assoc Anat (Nancy) 1986;70:5-11.

Dauge MC, Delmas V, Potier M. The anatomic lobulation of the prostate, a controversial description. Morphologie 1999; 83:5-14.

de Brot S, Ntekim A, Cardenas R, James V, Allegrucci C, Heery D et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in prostate cancer. Endocr Relat Cancer 2015 (Doi:10.1530/ERC-15-0123).

Discacciati A, Wolk A. Lifestyle and dietary factors in prostate cancer prevention. Recent Results Cancer Res 2014; 202:27-37.
Dunn PM. Leonardo Da Vinci (1452-1519) and reproductive anatomy. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1997; 77:F249-251.

Eeles RA, Olama AA, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M *et al.* Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. Nat Genet 2013; 45:385-391, 391e381-382.

Egbers L, Luedeke M, Rinckleb A, Kolb S, Wright JL, Maier C et al. Obesity and Prostate Cancer Risk According to Tumor TMPRSS2:ERG Gene Fusion Status. Am J Epidemiol 2015 (Doi: 10.1093/aje/kwu344).

Egevad L, Ahmad AS, Algaba F, Berney DM, Boccon-Gibod L, Comperat E et al. Standardization of Gleason grading among 337 European pathologists. Histopathology 2013; 62:247-256.

Epstein JI. An update of the Gleason grading system. J Urol 2010; 183:433-440.

Epstein JI, Feng Z, Trock BJ, Pierorazio PM. Upgrading and downgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy: incidence and predictive factors using the modified Gleason grading system and factoring in tertiary grades. Eur Urol 2012; 61:1019-1024.

Fanning DM, Kay E, Fan Y, Fitzpatrick JM, Watson RW. Prostate cancer grading: the effect of stratification of needle biopsy Gleason Score 4 + 3 as high or intermediate grade. BJU Int 2010; 105:631-635.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010; 127:2893-2917.

Fine SW. Variants and unusual patterns of prostate cancer: clinicopathologic and differential diagnostic considerations. Adv Anat Pathol 2012; 19:204-216.

Fujikawa K, Aoyama T, Itoh T, Nishio Y, Miyakawa M, Sasaki M. Volume-weighted mean nuclear volume. Is this new prognosticator comparable in different institutions? Anal Quant Cytol Histol 2000a; 22:55-62.

Fujikawa K, Itoh T, Nishio Y, Miyakawa M, Sasaki M. The role of volume-weighted mean nuclear volume in predicting disease outcome in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. APMIS 1999; 107:773-778.

Fujikawa K, Matsui Y, Kobayashi T, Miura K, Oka H, Fukuzawa S et al. Predicting pathological stage of localized prostate cancer using volume weighted mean nuclear volume. J Urol 2000b; 164:1587-1590.

Goggins WB, Wong G. Cancer among Asian Indians/Pakistanis living in the UnitedStates: low incidence and generally above average survival. Cancer Causes Control 2009; 20:635-643.

Goh CL, Eeles RA. Germline genetic variants associated with prostate cancer and potential relevance to clinical practice. Recent Results Cancer Res 2014; 202:9-26.

Goodman M, Ward KC, Osunkoya AO, Datta MW, Luthringer D, Young AN et al.Frequency and determinants of disagreement and error in gleason scores: a population- based study of prostate cancer. Prostate 2012; 72:1389-1398.

Green MM, Hiley CT, Shanks JH, Bottomley IC, West CM, Cowan RA et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in locally invasive prostate cancer is prognostic for radiotherapy outcome. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007; 67:84-90.

Gundersen HJ, Jensen EB. Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. J Microsc 1985; 138:127-142.

Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. Can J Urol 2008; 15:3866-3871.

Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? Nat Rev Cancer 2008; 8:880-887.

Helpap B, Egevad L. Correlation of modified Gleason grading of prostate carcinoma with age, serum prostate specific antigen and tumor extent in needle biopsy specimens. Anal Quant Cytol Histol 2008; 30:133-138.

Hodge KK, McNeal JE, Terris MK, Stamey TA. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. J Urol 1989; 142:71-74; discussion 74-75.

Huang H, Cai B. G84E mutation in HOXB13 is firmly associated with prostate cancer risk: a meta-analysis. Tumour Biol 2014; 35:1177-1182.

Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. J Urol 2002; 168:9-12.

Huncharek M, Haddock KS, Reid R, Kupelnick B. Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. Am J Public Health 2010; 100:693-701.

Katz B, Srougi M, Dall'Oglio M, Nesrallah AJ, Sant'anna AC, Pontes J, Jr. et al. Are we able to correctly identify prostate cancer patients who could be adequately treated by focal therapy? Urol Oncol 2012; 30:794-797.

Kollermann J, Helpap B. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor Flk-1 in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. Am J Clin Pathol 2001; 116:115-121.

Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. Endocrinol Metab Clin North Am 2011; 40:565-575, viii-ix.

Lee DJ, Ahmed HU, Moore CM, Emberton M, Ehdaie B. Multiparametric magnetic resonance imaging in the management and diagnosis of prostate cancer: current applications and strategies. Curr Urol Rep 2014; 15:390.

Leze E, Maciel-Osorio CF, Mandarim-de-Lacerda CA. Advantages of evaluating mean nuclear volume as an adjunct parameter in prostate cancer. PLoS One 2014; 9:e102156.

Lowsley OS. The development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder. Amer J Surg 1912; 13:299-350.

Mangoni M, Vozenin MC, Biti G, Deutsch E. Normal tissues toxicities triggered by combined anti-angiogenic and radiation therapies: hurdles might be ahead. Br J Cancer 2012; 107:308-314.

Matsui Y, Ichioka K, Terada N, Yoshimura K, Terai A, Dodo Y et al. Impact of volume weighted mean nuclear volume on outcomes following salvage radiation therapy after radical prostatectomy. J Urol 2004; 171:687-691.

McNeal J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. Urol ClinNorth Am 1990; 17:477-486.

McNeal JE. Normal histology of the prostate. Am J Surg Pathol 1988; 12:619-633.

Merrill RM, Sloan A. Risk-adjusted incidence rates for prostate cancer in the United States. Prostate 2012; 72:181-185.

Myles P, Evans S, Lophatananon A, Dimitropoulou P, Easton D, Key T et al.Diagnostic radiation procedures and risk of prostate cancer. Br J Cancer 2008;98:1852-1856.

Nair-Shalliker V, Smith DP, Egger S, Hughes AM, Kaldor JM, Clements M et al. Sun exposure may increase risk of prostate cancer in the high UV environment of New South Wales, Australia: a case-control study. Int J Cancer 2012; 131:E726-732.

Nakai Y, Nonomura N. Inflammation and prostate carcinogenesis. Int J Urol 2013; 20:150-160.

Ogita S, Tejwani S, Heilbrun L, Fontana J, Heath E, Freeman S et al. Pilot Phase II Trial of Bevacizumab Monotherapy in Nonmetastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer. ISRN Oncol 2012; 2012:242850.

Oh JJ, Hong SK, Lee JK, Lee BK, Lee S, Kwon OS et al. Prostate-specific antigen vs prostate-specific antigen density as a predictor of upgrading in men diagnosed with Gleason 6 prostate cancer by contemporary multicore prostate biopsy. BJU Int 2012; 110:E494-499.

Oyama T, Allsbrook WC, Jr., Kurokawa K, Matsuda H, Segawa A, Sano T et al. A comparison of interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic

carcinoma in Japan and the United States. Arch Pathol Lab Med 2005; 129:1004 1010.

Palmer R. Nicolo Massa, his family and his fortune. Med Hist 1981; 25:385-410.

Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. BJU Int 2013; 111:753-760.

Rapiti E, Schaffar R, Iselin C, Miralbell R, Pelte MF, Weber D et al. Importance and determinants of Gleason score undergrading on biopsy sample of prostate cancer in a population-based study. BMC Urol 2013; 13:19.

Roehrborn CG. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Int J Impot Res 2008; 20 Suppl 3:S11-18.

Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V et al. Prostate- cancer mortality at 11 years of follow-up. N Engl J Med 2012; 366:981-990.

Seipel AH, Samaratunga H, Delahunt B, Wiklund F, Wiklund P, Lindberg J et al. Immunohistochemical profile of ductal adenocarcinoma of the prostate. Virchows Arch 2014; 465:559-565.

Selman SH. The McNeal prostate: a review. Urology 2011; 78:1224-1228.

Sequeiros T, Bastaros JM, Sanchez M, Rigau M, Montes M, Placer J et al. Urinary biomarkers for the detection of prostate cancer in patients with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia.Prostate 2015;10.1002/pros.22995.

Shapiro RH, Johnstone PA. Risk of Gleason grade inaccuracies in prostate cancer patients eligible for active surveillance. Urology 2012; 80:661-666.

Shariat SF, Ashfaq R, Roehrborn CG, Slawin KM, Lotan Y. Expression of survivin and apoptotic biomarkers in benign prostatic hyperplasia. J Urol 2005;174:2046-2050.

Shariat SF, Roehrborn CG. Using biopsy to detect prostate cancer. Rev Urol 2008; 10:262-280.

Soda T, Fujikawa K, Ito T, Sasaki M, Nishio Y, Miyakawa M. Volume-weighted mean nuclear volume as a prognostic factor in renal cell carcinoma. Lab Invest 1999; 79:859-867.

Sorensen FB. Quantitative analysis of nuclear size for objective malignancy grading: a review with emphasis on new, unbiased stereologic methods. Lab Invest 1992; 66:4-23.

Walczak R, Joseph SB, Laffitte BA, Castrillo A, Pei L, Tontonoz P. Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X

receptors. J Biol Chem 2004; 279:9905-9911.

Wang Q, Li W, Zhang Y, Yuan X, Xu K, Yu J et al. Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. Cell 2009; 138:245-256.

Wang SC. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? Trends Pharmacol Sci 2014; 35:178-186.

Wilson AH. The prostate gland: a review of its anatomy, pathology, and treatment. JAMA 2014; 312:562.

Zhong W, Peng J, He H, Wu D, Han Z, Bi X et al. Ki-67 and PCNA expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Clin Invest Med 2008; 31:E8-15.

Zu K, Giovannucci E. Smoking and aggressive prostate cancer: a review of the epidemiologic evidence. Cancer Causes Control 2009; 20:179 1810.

APÊNDICE - Advantages of Evaluating Mean Nuclear Volume as an Adjunct Parameter in Prostate Cancer

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | ONE

Advantages of Evaluating Mean Nuclear Volume as an Adjunct Parameter in Prostate Cancer

Eduardo Leze, Clarice F. E. Maciel-Osorio, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda*

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Background: Efforts to improve the diagnosis, prognosis and surveillance of prostate cancer (PCa) are relevant. Gleason score (GSc) overestimation may subject individuals to unnecessary aggressive treatment. We aimed to use stereology in PCa evaluations and investigate whether mean nuclear volume (MNV) correlates with the Gleason primary pattern (Gpp) and to improve the subjective GSc to obtain an objective and reliable method without inter-observer dissension.

Methods: We identified 74 radical prostatectomy specimens that were divided into six groups based on Gpp, from 3 to 5. Controls (C) were designed in paired non-tumor regions of the same specimens. MNV was estimated using the "point-sampled intercepts" method. Differences in MNV among the C groups and the Gpp groups were tested with the Kruskall-Wallis test and Dunn post-hoc test. Differences between each Gpp group and its control counterpart were tested with the Wilcoxon test. Correlations were evaluated with the Spearman rank correlation ($R_{[Spearman]}$).

Results: The correlations between prostate-specific antigen (PSA) and GSc ($R_{[Spearman]}$ of 0.76) and between PSA and MNV ($R_{[Spearman]}$ of 0.78) were moderately strong and highly significant, and the correlation between MNV and Gpp ($R_{[Spearman]}$ of 0.53) was moderate and highly significant. MNV was significantly greater in cancerous regions than in paired-control regions. Limitations included sample size.

Conclusions: Proper planning of a study, as well as the availability of equipment and software for morphological quantification, can provide incentive to quickly and accurately estimate MNV as an adjunct parameter in the assessment of PCa. Current data are in favor of the use of MNV associated with GSc and PSA in the assessment of PCa.

Citation: Leze E, Maciel-Osorio CFE, Mandarim-de-Lacerda CA (2014) Advantages of Evaluating Mean Nuclear Volume as an Adjunct Parameter in Prostate Cancer. PLoS ONE 9(7): e102156. doi:10.1371/journal.pone.0102156

Editor: Zoran Culig, Innsbruck Medical University, Austria

Received April 18, 2014; **Accepted** June 11, 2014; **Published** July 9, 2014

Copyright: © 2014 Leze et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. Relevant data are included within the Supporting Information files.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: mandarim@uerj.br

Introduction

Prostate cancer (PCa), which is an important public health concern in Western countries and an emerging malignancy in developing nations, is the most frequently diagnosed cancer in American males and the second leading cause of cancer deaths in the United States [1]. Thus, efforts to improve the diagnosis, prognosis and surveillance of PCa are relevant.

It is notable that nearly 25 years after its adoption, the Gleason score (GSc) system remains a timely method to evaluate the correlation between histologic grade and prognosis in patients with PCa [2]. This system is based on the architecture of cancer cells, which are assigned to one of five histologic patterns of decreasing differentiation. Since 2005, it has been recommended that pathologists assign a GSc grade by adding together the most common and the highest Gleason patterns in a biopsy, as opposed to the original GSc method that added the most common and the second most common patterns [3]. These modifications made by the International Society of Urological Pathology (ISUP) in 2005 were an attempt to improve the correlation between biopsy and radical prostatectomy, but there is also a need for a change in reporting to more closely reflect tumor behaviour [4].

Studies have shown that, given the poor inter-observer reproducibility of the GSc, it is difficult to achieve mutual concordance [5 7]. In addition, almost 20% of radical prostatectomy cases demonstrate tertiary patterns, which means that a needle biopsy sample exhibits a higher tertiary Gleason pattern, resulting in apparent overgrading of the needle biopsy [8]. This lack of agreement is primarily important in patients with PCa as well as individuals who are candidates for or are under active surveillance [9].

Without doubt, progress in terms of the identification of cancer molecular markers has benefited PCa diagnosis, prognosis and treatment [10,11]. However, the nuclear structure in the tumor remains a matter of interest. Alterations in nuclear size and shape, in the number and size of nucleoli and to chromatin can be related to the altered functional properties of cancer cells or tissue remodelling [12]. Consequently, stereological estimation of the mean nuclear volume (MNV), which is an unbiased estimate of three-dimensional variables obtained from a two-dimensional set

of images, represents an objective and reproducible grading method for PCa [13].

The aim of the present study is to revisit the use of stereology in PCa evaluation and investigate whether MNV correlates with the Gleason primary pattern (Gpp) to replace or improve the subjective GSc such that it becomes a more objective and reliable method without inter-observer dissension.

Material and Methods

This study follows the principles outlined in the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee for scientific research (Ethics Committee for Research with Human Subjects at the State University of Rio de Janeiro, CEP, Process Number 618329) that is associated with the National Committee for Ethics in Research (CONEP) and directly linked to the National Health Council of Brazil.

We submitted the research to *Platform Brazil*, the national and unified basis of records of research involving humans for any CEP/CONEP system (http://conselho.saude.gov.br/). The material was collected over the years and filed in an institutional collection. Thus, at the moment of the research we had no more contact with the patients or their families. We have discussed frankly with members of CEP the difficulty of retrieving signatures in an written informed consent by patients in the present case. The members of the CEP have considered this point raised by us. In their decision, they emphasized the need of a written informed consent of patients, but they understood the present case as exceptional and, therefore, the study was exempted from informed consent of patients.

This study was performed on specimens obtained from 74 patients who underwent radical prostatectomy as a first-choice therapy for localized and locally advanced PCa. The Gpp was established by only one trained pathologist (CM-O). Patients were divided into six groups based on Gpp, and the prostate-specific antigen (PSA) value of each sample was noted prior to surgery. Three groups represented the primary pattern grades (tumor regions, T) of Gpp 3 (G3, n = 20), Gpp 4 (G4, n = 28), and Gpp 5 (G5, n = 26). Controls were designed in paired non-tumor (NT) regions of the same specimens and were referred to as C3 (for NT regions of Gleason 3 specimens), C4 (for NT regions of Gleason 4 specimens), and C5 (for NT regions of Gleason 5 specimens).

The material was rapidly fixed for 48 h in freshly prepared formaldehyde (4% wt/vol in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2), embedded in paraffin, sectioned with a nominal thickness of 5 µm, and stained with haematoxylin and eosin. The sections were analyzed using an oil immersion plan achromatic objective (×100) with an Olympus BX51 microscope (Olympus America, Miami, USA) and an Infinity 1–5c digital camera (Lumenera, Ottawa, ON, Canada). Digital images were taken for quantification of T and NT regions as defined by the expert pathologist.

Stereology

MNV was estimated using the "point-sampled intercepts" method in five different microscopic fields per patient totalling at least 50 nuclei per specimen [14]. A test system consisting of parallel lines associated with test points was superposed onto each microscopic field as demonstrated in Figure 1. The direction of the lines on the sample was determined by lottery, and for each point inside the unbiased counting frame that hit a nucleus, the nuclear intercept through the point was measured. The measurement of the intercept length was performed using a 32-mm logarithmic ruler composed of a series of 15 classes, where the width of any class is approximately 17% larger than that of the preceding class.

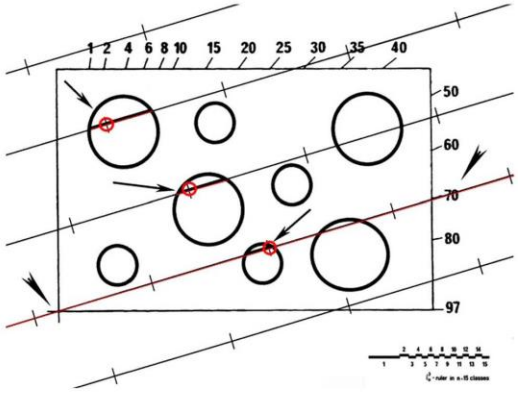


Figure 1. Schema of the test system used to estimate the mean nuclear volume based on the "point-sampled intercepts" method. The test system, with points, is overlaid on the prostate image and aligned with the border numbers as defined by lottery (arrowheads). The length of the sampled nuclei (arrows) is measured with a logarithmic ruler (see below).
doi:10.1371/journal.pone.0102156.g001

Each individual intercept was cubed, and the mean of all of these values was multiplied by $\pi/3$ to give MNV. The numerical nuclear density in the plane, i.e., the number of nuclear profiles per area (N_A), was determined using a frame of 5,675 μm^2.

Statistical analysis

The Spearman rank correlation ($R_{[Spearman]}$) was estimated for each sample to determine the correlations between: a) GSc and PSA, b) MNV and PSA, and c) Gpp and MNV (Tables S1 and S2). The differences in MNV between the groups and within the C and G groups were assessed by the Kruskall-Wallis analysis of variance followed by the Dunn post-hoc test. The differences that resulted when comparing each Gpp with its control counterpart were assessed by the Wilcoxon test. Data are shown as the median and the 95% confidence interval (CI). A *P-value* of ≤ 0.05 was considered statistically significant. The GraphPad Prism program (version 6.03 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to perform statistical analyses and generate graphics.

Results

Spearman rank correlations

a) **PSA vs. Gleason scores.** The correlation between PSA and GSc was moderately strong, demonstrating an $R_{[Spearman]}$ value of 0.76 with a 95% CI of 0.62 to 0.85, which was highly significant ($P<0.0001$) (Fig. 2).

b) **PSA vs. MNV.** The correlation between PSA and MNV was moderately strong, demonstrating an $R_{[Spearman]}$ value of 0.78 with a 95% CI of 0.65 to 0.86, which was highly significant ($P<0.0001$) (Fig. 2).

c) **MNV vs. Gleason primary pattern.** The correlation between MNV and Gpp was moderate, demonstrating an $R_{[Spearman]}$ value of 0.53 with a 95% CI of 0.30 to 0.69, which was highly significant ($P<0.0001$) (Fig. 3).

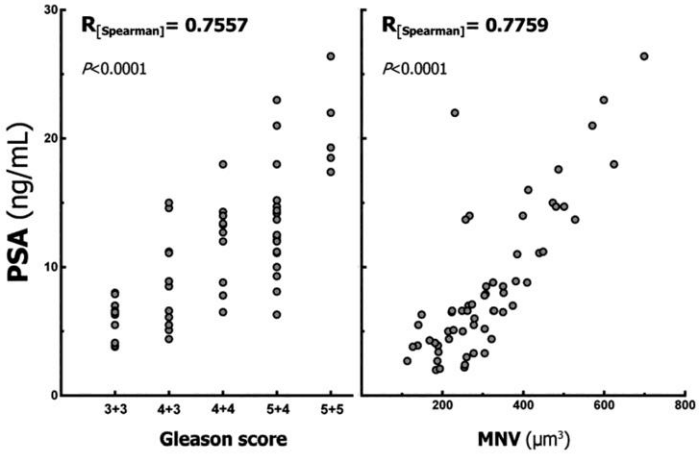


Figure 2. Correlations between the prostate specific antigen (PSA) value and both the Gleason score and mean nuclear volume (MNV). The Spearman coefficients of correlation were moderately strong and significant.
doi:10.1371/journal.pone.0102156.g002

Mean nuclear volume

The variability of MNV for the groups is detailed in Fig. 4 and Table 1. The differences were significant when comparing MNV in a Gpp with its control counterparts. MNV was significantly greater in cancerous regions than in paired-control region by 22% in Gpp 3, by 135% in Gpp 4, and by 140% in Gpp 5. There was a continuous increase in MNV in cancerous regions from Gpp 3 to Gpp 5. These differences were significant, and MNV of the G5 group was 64% greater than G3 and 22% greater than G4. Although MNV demonstrated a higher value in G4 compared to G3, this difference was not significant and could be based on sample size.

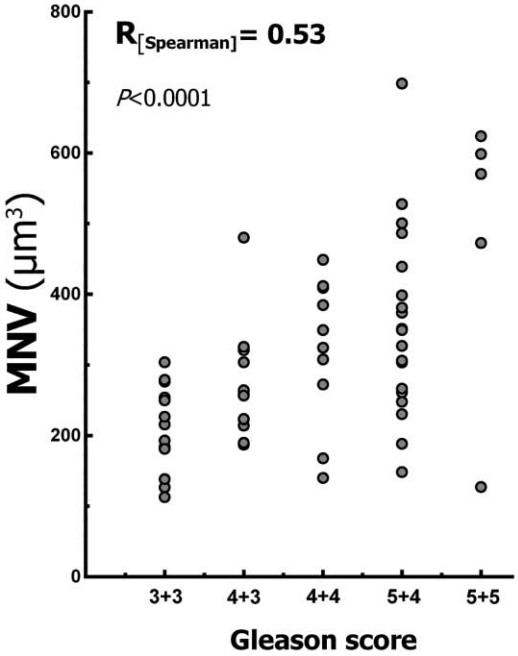


Figure 3. Correlation between Gleason score and mean nuclear volume (MNV). The Spearman coefficient of correlation was moderate and significant for the sample.
doi:10.1371/journal.pone.0102156.g003

Discussion

In the present study, there were significant and moderately strong correlations between PSA and GSc and between PSA and MNV. The correlation between Gpp and MNV was also significant but moderate. These findings indicate that both Gpp and MNV are adjunct parameters in the diagnosis and/or surveillance of PCa. This is extremely relevant because, as mentioned, GSc is a comparative method that is dependent on the training of the pathologist, while MNV is based on counts obtained through design-based stereology.

The Gpp instead the GSc was compared with MNV to obtain the most reliable results possible, as we had selected the most prevalent pattern for each histological sample to avoid biases in studying the surrounding fields when the highest Gleason pattern was used (in several samples these fields were small). With this strategy, there was no difference when comparing the former GSc and the ISUP modifications applied from 2005. However, when PSA was correlated with GSc and MNV, the 2005 ISUP modifications made a difference.

MNV was always significantly different when comparing control regions (non-tumor) with regions containing the tumor, indicating that MNV is an effective alternative to evaluate PCa in cases where immunohistochemistry is unavailable or to increase the reliability of a diagnosis. In addition, MNV value increased from Gpp 3 to Gpp 5 and was different between Gpp 3 and Gpp 5 and between Gpp 4 and Gpp 5. We emphasize that the observation of no difference in MNV between Gpp 3 and Gpp 4 is possibly due to sample size. Further studies could clarify this point in the future.

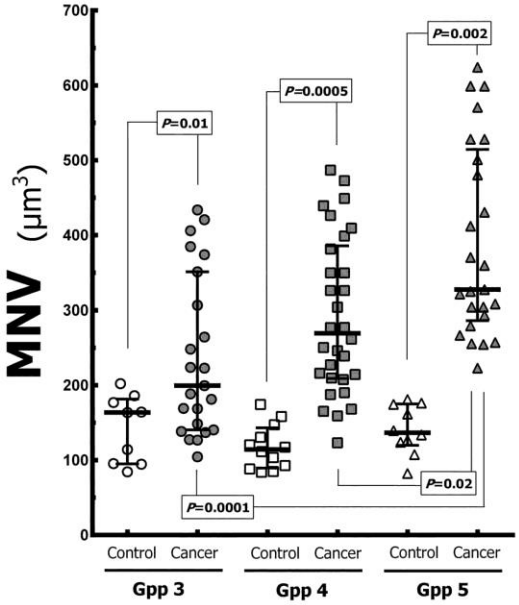


Figure 4. Dispersion of mean nuclear volume (MNV) in the groups with median (horizontal line) and 95% interval confidence noted (see also Table 1). The statistical significance is indicated.
doi:10.1371/journal.pone.0102156.g004

Conventional and modified Gleason grading both correlated with age, serum PSA and cancer involvement in needle biopsies [15]. Moreover, there was a strong correlation between GSc and tumor volume in well/intermediate differentiated PCa, and given that relatively high amount of PSA per unit volume of cancer are produced, high PSA density was the strongest single predictor of tumor undergrading. However, as higher grade tumors produce less PSA per unit volume, PSA density loses its predictive ability, and other clinical markers of tumor volume such as palpable disease and numbers of positive cores become more predictive [16,17], as MNV may contribute significantly to the prediction of a biochemical control (PSA) [18].

Studies have shown that the inter-observer reproducibility of the Gleason grading system remains moderate [6,7,19]. Although the magnitude of disagreement was rather modest, substantial proportions of biopsy and prostatectomy specimens had different GSc assigned at diagnosis (63% for biopsy and 72% for prostatectomy), compared to those assigned by expert review [20]. We should remark that, in the present study, the material studied came from radical prostatectomies as the first-choice therapy for localized and locally advanced PCa, and GSc was assigned by only one expert pathologist, which certainly tends to minimize the bias in GSc assignment.

The reliable identification of well-differentiated prostatic adenocarcinoma in biopsy specimens remains challenging [21]. To measure this reliability, agreement among pathologists was tested, and the GSc assigned by 15 expert uropathologists for fifteen PCa biopsy samples were compared GSc assigned by 337 members of the European Network of Uropathology. Agreement between expert and member was poor (mean 71.4% in GSc 6, and

Table 1. The mean nuclear volume (MNV) in the groups.

Score	Control (MNV, μm^3)		Cancer (MNV, μm^3)		Variation		
	Median	95% CI	Median	95% CI	%		
3	163.6	94.7 to 186.2	199.6	148.5 to 306.6	C3 *vs.* G3 +22	G3 *vs.* G5	+64
4	114.4	88.3 to 147.4	269.3	216.0 to 349.6	C4 *vs.* G4 +135	G3 *vs.* G4	-
5	136.6	107.2 to 176.2	327.4	304.3 to 480.5	C5 *vs.* G5 +140	G4 *vs.* G5	+22

The significant variations between the Control (C) and the Gleason primary pattern in the cancer groups (G) are indicated.
doi:10.1371/journal.pone.0102156.t001

mean 56.4% in GSc 7 ($P=0.009$) [22]. The classification of high-grade PCa as GSc 4+3 and GSc 8 10 resulted in higher levels of agreement between biopsy and radical prostatectomy.

In addition, there is abundant literature reporting dissension between the GSc assigned to patients with a needle biopsy diagnosis and after radical prostatectomy [9,23]. Consequently, there is an overall tendency to undergrade biopsy samples, and this degree of concordance is possibly supported by the number of biopsy cores obtained (ten or more needle biopsy cores increased the proportion of an exact match to 72%) [23] or by the fact that more than one third of patients were found to have been undergraded based on their initial prostate biopsy [9]. On the other hand, the overestimation of GSc in extended prostate biopsies or the presence of a tertiary higher Gleason pattern obtained in a needle biopsy sample, which is found in almost 20% of radical prostatectomies, may subject individuals to unnecessary aggressive treatment [8,24]. Therefore, the homogeneity of the samples and the report of GSc in the current study should be considered a valid contribution to the classification and diagnosis of PCa.

It should be noted that the present study was performed with samples obtained from radical prostatectomies, and the GSc took into consideration the modifications made by the ISUP in 2005, which attempted to improve the correlation between biopsy and radical prostatectomy. These changes could be the reasons for some differences concerning the correlation between MNV and GSc when comparing findings reported previously (before 2005) [13], when histological samples were taken from needle biopsies, and the present findings.

The study of the pathophysiological changes associated with human diseases involving mutations in nuclear structure has clarified many physiological functions of nuclear structure and organization. Changes in nuclear shapes can be a result of forces acting on the extracellular matrix or of intracellular processes, which are thought to be transmitted to the nucleus via the cellular cytoskeleton [25]. As malignant tumors can alter nuclear shape and increase its size, the estimation of nuclear enlargement in terms of volume in a three-dimensional method appears to be necessary [26].

The updated information from the Brazilian Institute of Geography and Statistics informs that the city of Rio de Janeiro has about 6.32 million people, and then we can accept that 3.16 million are men. The "pyramid of age" of Brazil indicates 9.5% of the population of men has over 50 years of age. Then, in the city of Rio de Janeiro, we can accept that 300,200 men are over 50 years old (which is the age group comparable to the present study of prostate cancer).

Prostate cancer in southeastern Brazil (where is located the city of Rio de Janeiro) has a prevalence of 80.06 cases per 100,000 individuals per year (2014 data from the National Cancer Institute of Brazil). Therefore, we may estimate at 210 the new cases per year of prostate cancer in the city of Rio de Janeiro.

The sample size studied in the present manuscript is a limitation of the survey. However, it is relevant to say that the cases studied account for about 35% of expected new cases in one year in the city of Rio de Janeiro.

Since 1985, pathologists and researchers have explored the possibility of estimating the mean volume of particles of arbitrary shape [14]. A previous study showed an association between MNV and PSA doubling time, which positively correlated MNV with PCa behavior and prognosis [27], suggesting MNV as a predictor of PSA failure for patients with clinically organ-confined disease treated with radical prostatectomy [28]. The findings of the current study are in agreement with this correlation between MNV and PSA levels, as well as MNV and Gpp. In addition, the results of studies combining PSA and estimated tumor volume with estimates of MNV have significantly contributed to the prediction of the pathological stage of PCa, suggesting the use of these three factors to predict the pathological stage of PCa before surgery [29,30].

Conclusions

Current data are in favor of the use of MNV associated with GSc and PSA in the assessment of PCa. Estimation of MNV requires a design-based approach with some involvement from mathematics and statistics. Indeed, this can be considered impractical for wide use in the routine evaluation of PCa by the classic pathologist. However, proper study planning, as well as the current availability of equipment and software for morphological quantification, can permit the quick and accurate estimation of MNV as an adjunct parameter for the assessment of PCa.

Supporting Information

Table S1 Data organized to calculate the coefficient of correlation of Spearman: Gleason score vs. prostatic specific antigen (PSA, ng/mL), and mean nuclear volume (MNV, μm^3) vs. PSA.
(PDF)

Table S2 Data organized to calculate de coefficient of correlation of Spearman: mean nuclear volume (MNV, μm^3) in each Gleason primary pattern (G3, G4 or G5) vs. prostatic specific antigen (PSA, ng/mL).
(PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CML. Performed the experiments: EL CMO. Analyzed the data: EL CML. Contributed reagents/materials/analysis tools: CML. Contributed to the writing of the manuscript: EL CMO CML.

References

1. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G (2008) The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. Can J Urol 15: 3866 3871.
2. Epstein JI (2010) An update of the Gleason grading system. J Urol 183: 433 440.
3. Billis A, Guimaraes MS, Freitas LL, Meirelles L, Magna LA, et al. (2008) The impact of the 2005 international society of urological pathology consensus conference on standard Gleason grading of prostatic carcinoma in needle biopsies. J Urol 180: 548 552.
4. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI (2013) Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. BJU Int 111: 753 760.
5. Burchardt M, Engers R, Muller M, Burchardt T, Willers R, et al. (2008) Interobserver reproducibility of Gleason grading: evaluation using prostate cancer tissue microarrays. J Cancer Res Clin Oncol 134: 1071 1078.
6. Allsbrook WC Jr, Mangold KA, Johnson MH, Lane RB, Lane CG, et al. (2001) Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: urologic pathologists. Hum Pathol 32: 74 80.
7. Allsbrook WC Jr, Mangold KA, Johnson MH, Lane RB, Lane CG, et al. (2001) Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: general pathologist. Hum Pathol 32: 81 88.
8. Epstein JI, Feng Z, Trock BJ, Pierorazio PM (2012) Upgrading and downgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy: incidence

and predictive factors using the modified Gleason grading system and factoring in tertiary grades. Eur Urol 61: 1019 1024.
9. Shapiro RH, Johnstone PA (2012) Risk of Gleason grade inaccuracies in prostate cancer patients eligible for active surveillance. Urology 80: 661 666.
10. Chen X, Xu S, McClelland M, Rahmatpanah F, Sawyers A, et al. (2012) An accurate prostate cancer prognosticator using a seven-gene signature plus Gleason score and taking cell type heterogeneity into account. PLoS One 7: e45178.
11. Cirak Y, Sarsik B, Cakar B, Sen S, Simsir A, et al. (2013) Predictive and prognostic values of Tau and BubR1 protein in prostate cancer and their relationship to the Gleason score. Med Oncol 30: 526.
12. Veltri RW, Miller MC, Isharwal S, Marlow C, Makarov DV, et al. (2008) Prediction of prostate-specific antigen recurrence in men with long-term follow-up postprostatectomy using quantitative nuclear morphometry. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17: 102 110.
13. Arima K, Sugimura Y, Hioki T, Yamashita A, Kawamura J (1997) Stereologically estimated mean nuclear volume of prostatic cancer is a reliable prognostic parameter. Br J Cancer 76: 234 237.
14. Gundersen HJ, Jensen EB (1985) Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. J Microsc 138: 127 142.
15. Helpap B, Egevad L (2008) Correlation of modified Gleason grading of prostate carcinoma with age, serum prostate specific antigen and tumor extent in needle biopsy specimens. Anal Quant Cytol Histol 30: 133 138.
16. Corcoran NM, Casey RG, Hong MK, Pedersen J, Connolly S, et al. (2012) The ability of prostate-specific antigen (PSA) density to predict an upgrade in Gleason score between initial prostate biopsy and prostatectomy diminishes with increasing tumor grade due to reduced PSA secretion per unit tumor volume. BJU Int 110: 36 42.
17. Oh JJ, Hong SK, Lee JK, Lee BK, Lee S, et al. (2012) Prostate-specific antigen vs prostate-specific antigen density as a predictor of upgrading in men diagnosed with Gleason 6 prostate cancer by contemporary multicore prostate biopsy. BJU Int 110: E494 499.
18. Matsui Y, Ichioka K, Terada N, Yoshimura K, Terai A, et al. (2004) Impact of volume weighted mean nuclear volume on outcomes following salvage radiation therapy after radical prostatectomy. J Urol 171: 687 691.
19. Oyama T, Allsbrook WC Jr, Kurokawa K, Matsuda H, Segawa A, et al. (2005) A comparison of interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma in Japan and the United States. Arch Pathol Lab Med 129: 1004 1010.
20. Goodman M, Ward KC, Osunkoya AO, Datta MW, Luthringer D, et al. (2012) Frequency and determinants of disagreement and error in gleason scores: a population-based study of prostate cancer. Prostate 72: 1389 1398.
21. Fanning DM, Kay E, Fan Y, Fitzpatrick JM, Watson RW (2010) Prostate cancer grading: the effect of stratification of needle biopsy Gleason Score 4+3 as high or intermediate grade. BJU Int 105: 631 635.
22. Egevad L, Ahmad AS, Algaba F, Berney DM, Boccon-Gibod L, et al. (2013) Standardization of Gleason grading among 337 European pathologists. Histopathology 62: 247 256.
23. Rapiti E, Schaffar R, Iselin C, Miralbell R, Pelte MF, et al. (2013) Importance and determinants of Gleason score undergrading on biopsy sample of prostate cancer in a population-based study. BMC Urol 13: 19.
24. Katz B, Srougi M, Dall'Oglio M, Nesrallah AJ, Sant'anna AC, et al. (2012) Are we able to correctly identify prostate cancer patients who could be adequately treated by focal therapy? Urol Oncol 30: 794 797.
25. Dahl KN, Ribeiro AJ, Lammerding J (2008) Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. Circ Res 102: 1307 1318.
26. Buhmeida A, Kuopio T, Collan Y (2000) Nuclear size and shape in fine needle aspiration biopsy samples of the prostate. Anal Quant Cytol Histol 22: 291 298.
27. Arai Y, Egawa S, Kuwao S, Ogura K, Baba S (2001) The role of volume-weighted mean nuclear volume in predicting tumor biology and clinical behaviour in patients with prostate cancer undergoing watchful waiting. BJU Int 88: 909 914.
28. Arai Y, Okubo K, Terada N, Matsuta Y, Egawa S, et al. (2001) Volume-weighted mean nuclear volume predicts tumor biology of clinically organ-confined prostate cancer. Prostate 46: 134 141.
29. Fujikawa K, Aoyama T, Itoh T, Nishio Y, Miyakawa M, et al. (2000) Volume-weighted mean nuclear volume. Is this new prognosticator comparable in different institutions? Anal Quant Cytol Histol 22: 55 62.
30. Fujikawa K, Matsui Y, Kobayashi T, Miura K, Oka H, et al. (2000) Predicting pathological stage of localized prostate cancer using volume weighted mean nuclear volume. J Urol 164: 1587 1590.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Volume Nuclear Médio Ponderado e a classificação de Gleason na avaliação do câncer de próstata

Pesquisador: Eduardo Moussa de Jabur Leze

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 26713914.5.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto

Patrocinador Principal: Hospital Universitário Pedro Ernesto

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 870.566

Data da Relatoria: 11/11/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto foi revisado, com melhora significativa da apresentação.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o uso da estereologia na avaliação do câncer de próstata e investigar se o volume nuclear médio se correlaciona com o Gleason primário para substituir ou melhorar sua subjetividade de tal forma que ele se torna um método mais objetivo e confiável, sem discordância interobservador.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem riscos evidentes, pois o estudo será realizado com amostras de pacientes previamente operados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo retrospectivo com análise de amostras previamente coletadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Houve solicitação de dispensa de TCLE.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram atendidas as solicitações do Parecer Consubstanciado anterior. Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 13 de Novembro de 2014

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador)

ANEXO B - Prêmio Miguel Couto

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Diploma

Conferido ao Dr. Eduardo Moussa de Jabur Leze, Vencedor do Prêmio Miguel Couto/2014 pelo Trabalho "Associação entre o padrão primário da classificação de Gleason e o volume nuclear médio ponderado no câncer de próstata.

Rio de Janeiro, 30 de junho de 2014

Acadêmico Pietro Novellino
Presidente

Acadêmico José Galvão Alves
Secretário Geral

ANEXO C - Comprovação da submissão do 2º artigo científico

From: **Bernd Wuesthoff** <bernd.wuesthoff@medizin.uni-magdeburg.de>
Date: 2015-05-07 0:22 GMT-03:00
Subject: Submission Confirmation
To: mandarim@uerj.br

Article type: Original Article

Dear Prof Mandarim-de-Lacerda,

We have received your article "**Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as an adjunct marker for prostate cancer staging**" for consideration for publication in Pathology - Research and Practice.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: http://ees.elsevier.com/prp/

2. Enter these login details:
Your username is: mandarim@uerj.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/PRP/automail_query.asp.

3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]