



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ricardo Abeche Fermoze

APOPTOSE NO CARCINOMA DE PRÓSTATA

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Patologia Humana.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima

**Botucatu
2015**

Ricardo Abeche Fermoze

APOPTOSE NO CARCINOMA DE PRÓSTATA

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre
em Patologia Humana.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima

Botucatu
2015

Dedico este trabalho aos meus pais, modelos de dedicação e perseverança, sem os quais jamais teria alcançado as conquistas que obtive. Dedico também à minha esposa, cujo amor, carinho e apoio foram cruciais para superar os obstáculos e momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio que deram durante toda a minha vida.

À minha esposa, pelo incentivo e carinho que me mantiveram esperançoso durante este trajeto.

Aos docentes, funcionários e colegas residentes do Departamento de Patologia desta universidade, que me acolheram e apoiaram nos anos que tivemos de convivência, em especial Profa. Dra. Denise Fechio, coordenadora da PG, Sr. Carlos Cesar Ramos pela confecção dos blocos de TMA, e Srta. Cícera Aparecida da Silva Brito, pelo auxílio na documentação da casuística.

Ao meu orientador, Flávio de Oliveira Lima, pelo suporte, correções e incentivos na elaboração do trabalho.

Aos colegas/alunos de Iniciação Científica Guilherme Palhares Aversa Santos, pelo imprescindível auxílio no levantamento dos casos e na obtenção de dados dos prontuários dos pacientes do estudo, e Leonardo Ribeiro Nascimento e Patrícia Perola Dantas, pelo auxílio no levantamento dos casos.

Ao Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina, em especial Sr. Joaquim Soares de Almeida, pela confecção dos cortes das lâminas de TMA.

Ao Departamento de Patologia do Hospital AC Camargo Cancer Center na pessoal do diretor do Departamento de Patologia. Prof. Titular Fernando Augusto Soares e a Sra. Sueli Nonogaki pela realização das reações imuno-histoquímicas.

APOPTOSE NO CARCINOMA DE PRÓSTATA

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima

Pesquisador: Ricardo Abeche Fermoze

Instituição Sede: Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP

RESUMO

O Carcinoma de Próstata é frequente causa de morbi-mortalidade nas populações ocidentais, tendo alta frequência no Brasil. É a neoplasia mais comum do homem, e a segunda causa de óbito, precedido pelo câncer de pulmão. Sua incidência vem aumentando continuamente nas últimas décadas devido ao aumento da perspectiva de vida e ao estilo de vida ocidental. A apoptose é mecanismo de morte celular que ocorre em diversos processos fisiológicos. Sabe-se que neoplasias tem progressiva resistência à apoptose. Esta é regulada pelas caspases, enzimas efetoras da apoptose, cuja ativação é rigorosamente controlada pelas proteínas inibidoras da apoptose, as IAPs, que por sua vez tem atividade modulada por moléculas inibidoras de IAPs, sendo a SMAC/Diablo a principal e a mais estudada. Neste trabalho estudamos a relação entre as IAPs e SMAC nos carcinomas prostáticos e sua correlação com o Índice Apoptótico (IA), proliferação celular, imuno-expressão da proteína p53 e taxa de sobrevida dos pacientes. Foram confeccionados blocos de parafina de TMA com tecido de câncer prostático de pacientes operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu de 1980 a 2000. Estes foram submetidos à reação imuno-histoquímica para Survivina, XIAP, SMAC, p53, Caspase 3 Clivada (índice apoptótico) e Ki67 (índice de proliferação celular). As laminae foram lidas por dois patologistas, sendo obtidas graduações de intensidade de imuno-expressão e/ou percentuais de positividade celular. Esses resultados foram correlacionados com a graduação de Gleason, categorias prognósticas (ISUP) e dados de sobrevida dos pacientes. Houve correlação entre a diferenciação da neoplasia e o índice de proliferação celular. A intensidade da marcação para p53 também esteve associada ao grau de diferenciação neoplásica. A sobrevida dos pacientes foi maior nos casos com menor ki67 e menores Gleason e Categorias Prognósticas.

APOPTOSIS IN PROSTATE CARCINOMA

Responsible Researcher: Prof. Dr. Flávio de Oliveira Lima

Researcher: Ricardo AbecheFermozelli

Home Institution: Botucatu Medical School -UNESP

ABSTRACT

Prostate carcinoma is a frequent cause of morbidity and mortality in Western populations, with high frequency in Brazil. It is the most common cancer among men and the second leading cause of death, preceded by lung cancer. Its incidence has increased continuously in recent decades due to increased life expectancy and the western lifestyle. Apoptosis is a cell death mechanism that occurs in many physiological processes. It is known that tumors show progressive resistance to apoptosis. It is regulated by caspases, apoptosis effector enzymes, whose activation is strictly controlled by Inhibitors of Apoptosis Proteins, IAPs, which in turn are modulated by IAP activity inhibitory molecules, with SMAC/Diablo being the main one and the most studied. We studied the relationship between IAPs (XIAP and Survivin) and SMAC in prostatic carcinomas and its correlation with the Apoptotic Index (AI), cellular proliferation, immunohistochemistry expression of protein p53 and patient survival rate. TMA paraffin blocks were made with prostate cancer tissue from patients operated at the Clinics Hospital, Botucatu School of Medicine, from 1980 to 2000. These were submitted to immunohistochemical reaction to Survivin, XIAP, SMAC, p53, cleaved Caspase 3 (apoptotic index) and Ki67 (cell proliferation index). The slides were read by two pathologists, which graduated the intensity and percentage of positive cells according to immuno-expression of each marker. These results were correlated with the Gleason grade, prognostic categories (ISUP) and patient survival data. A correlation was verified between tumor differentiation and the cell proliferation rate. The intensity of p53 reaction was also associated with the degree of neoplastic differentiation. Patient survival was higher in cases with lower ki67 labelling and lower Gleason and Prognostic Categories grading.

Sumário

1) INTRODUÇÃO	5
1.1) XIAP	7
1.2) SURVIVINA	8
1.3) SMAC/DIABLO	9
2) JUSTIFICATIVA.....	11
3) OBJETIVOS	12
4) MATERIAIS E MÉTODOS	13
5) RESULTADOS.....	17
5.1) DESCRITIVA DA CASUÍSTICA.....	17
5.2) CORRELAÇÕES	31
5.2.1) Graduação de Gleason e Ki67 em escala de 3.....	31
5.2.2) Graduação de Gleason e p53	32
5.2.3) Graduação de Gleason e I.A.....	33
5.2.4) Graduação de Gleason e marcadores de apoptose estudados	34
5.2.5) Categoria Prognóstica e Ki67.....	36
5.2.6) Categoria Prognóstica e p53.....	37
5.2.7) Categoria Prognóstica e I.A.....	39
5.2.8) Categoria Prognóstica e Marcadores de apoptose estudados	40
5.2.9) Correlações entre os marcadores	43
5.2.10) Sobrevida e Marcadores estudados.	43
6) DISCUSSÃO	46
7) CONCLUSÕES.....	49
8) BIBLIOGRAFIA.....	50

Lista de siglas

BIR.....	Baculovirus IAP Repetition
c-IAP1.....	Cellular IAP1
c-IAP2.....	Cellular IAP2
dATP.....	Deoxy Adenosine Triphosphate
DIABLO.....	Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding Protein with Low pI
FADD.....	FAS Associated Death Domain
IAP.....	Inhibitor of Apoptosis Protein
IBM.....	IAP Binding Motif
SM.....	SMAC Mimetics
SMAC.....	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
TMA.....	Tissue Micro-Array
TNF.....	Tumoral Necrosis Factor
XIAP.....	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

1) INTRODUÇÃO

Excluindo as neoplasias de pele, o câncer de próstata é a neoplasia mais comum do homem, e a segunda causa de óbito, precedido apenas pelo câncer de pulmão. Sua incidência vem aumentando continuamente nas últimas décadas, devido, principalmente, ao aumento da perspectiva de vida e ao estilo de vida ocidental^{1,2}. Nos Estados Unidos, estima-se mais de 220 mil novos casos em 2015, enquanto no Brasil a estimativa de risco é de 54 novos casos para cada 100 mil homens³⁻⁴.

A apoptose (morte celular programada) é um mecanismo fisiológico eficiente de “suicídio” celular, importante para os processos de crescimento e diferenciação celulares em organismos animais multicelulares, controlando o número de células assim como o tamanho dos órgãos^{5,6}.

Sua ativação pode ocorrer por duas vias distintas: a via dos receptores de morte celular (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca). Na primeira, ligantes como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) ou o ligante FAS (CD95L) interagem com seus receptores, levando ao recrutamento do domínio de morte associado ao FAS (FADD) e ativação da caspase-8. A iniciação pela via intrínseca ocorre através da liberação do citocromo c do espaço entre as membranas mitocondriais. Este interage com o fator 1 apoptótico ativador de protease e, junto com dATP, recrutam e ativam a caspase-9. Ambas (caspases 8 e 9) deflagram a cascata de caspases, família de cisteíno-proteases que constituem o mecanismo regulador central da morte por apoptose. As alterações morfológicas então observadas são originadas, em especial, pela ação da caspase 3, principal efetora do processo apoptótico^{6, 7-8}. A figura 1 ilustra o processo apoptótico⁹. Uma das características marcantes da grande maioria dos cânceres é sua progressiva resistência estes mecanismos.

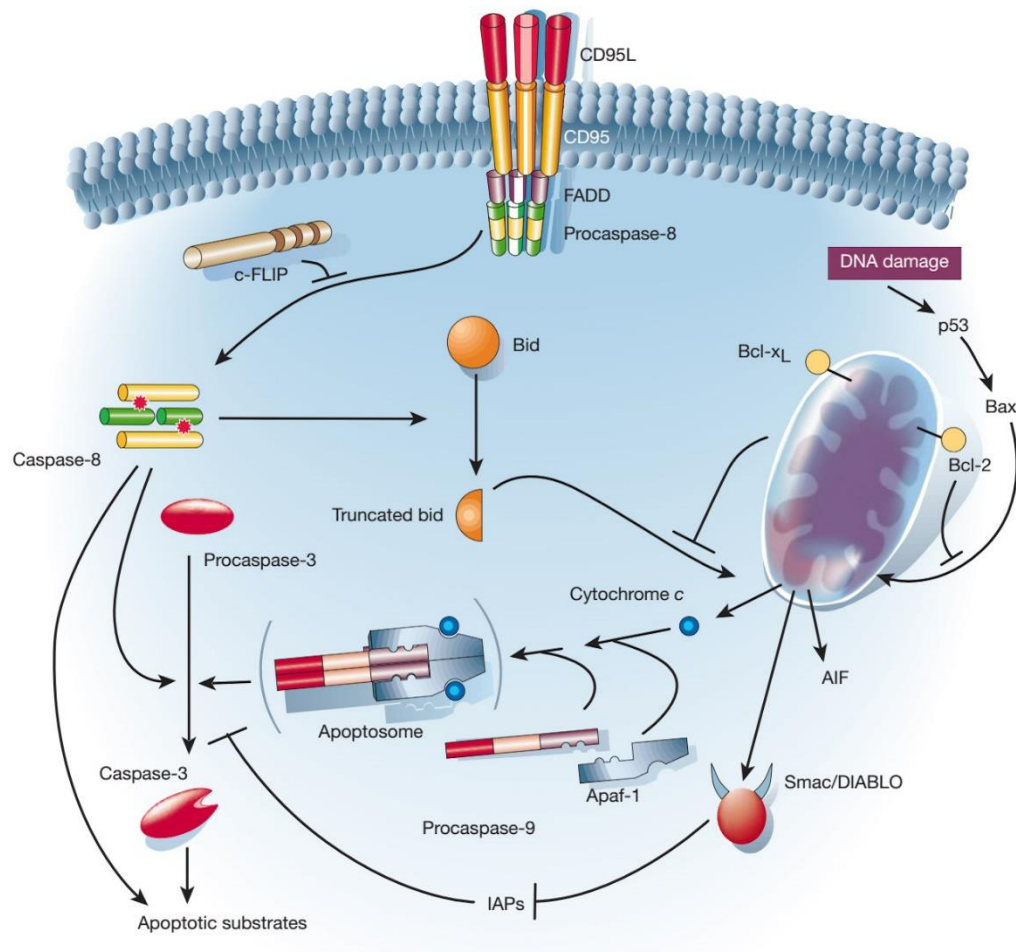


Figura 1: O processo apoptótico⁹

Um regulador importante da morte celular programada é a proteína p53. Ao detectar dano ao DNA, esta é capaz de bloquear o ciclo celular e induzir a apoptose⁷. Seu mecanismo de ação é a iniciação da apoptose pela via intrínseca, através da permeabilização da membrana externa mitocondrial ao ativar membros pró-apoptóticos (BAX e BAK) da família de proteínas Bcl2¹⁰.

Uma vez desencadeado, o processo apoptótico torna-se rapidamente irreversível. Portanto, as moléculas inibitórias do apoptose (IAPs) são necessárias para proteger as células de interferências do ambiente que levariam à morte não fisiológica por apoptose. Estas constituem uma família de proteínas inicialmente descobertas em baculovírus, que se mantiveram altamente preservadas durante o processo evolutivo. Dois anos após sua descoberta em insetos, foram caracterizadas, em humanos, a Proteína Neuronal Inibidora de Apoptose (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein – NAIP), assim como as IAP celulares 1 e 2 (cIAP-1 e cIAP-2),

seguida pela IAP ligada ao cromossomo X (XIAP), Survivina, Apollon, Livina (IAP de melanoma) e proteína semelhante a IAP 2 (IAP LikeProtein 2 – ILP2)^{6, 11}.

A SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) é uma proteína mitocondrial liberada no citoplasma após estresse apoptótico. Tem capacidade de ligar-se e inibir as IAPs. Tanto as IAPs, como seu inibidor SMAC, são considerados alvos terapêuticos potenciais no tratamento das neoplasias, já que mostraram-se alteradas em uma diversidade de neoplasias em humanos. Entre estas, está o Carcinoma de Próstata, com estudos mostrando aumento da expressão de XIAP, cIAP-1 e c-IAP2^{6,11}.

Ao tratar Melanoma em ratos imunocompetentes com miméticos da SMAC (SM, abreviado do inglês, SMAC Mimetics), observou-se inibição significativa do crescimento tumoral. Esta inibição ocorreu através da morte de células endoteliais tumorais que, na presença de SM, tornaram-se susceptíveis à apoptose através da ação do TNF¹².

Em carcinomas invasivos da bexiga, a superexpressão de XIAP mostrou-se correlacionada com lesões de alto grau e estágios avançados da doença¹³. Já em algumas linhagens de carcinomas da mama, a associação de drogas que visam os receptores ErbB com antagonistas de IAPs levou a redução dramática do “turnover” celular¹⁴.

Nos carcinomas prostáticos, ao regular para baixo a expressão de XIAP, há aumento do índice apoptótico, assim como da sensibilidade da neoplasia a agentes quimioterápicos, como a cisplatina¹⁵.

1.1) XIAP

Como mais potente inibidora de caspases, a XIAP é a única IAP capaz de inibir suas formas ativadas em concentrações fisiológicas. É uma proteína de 57kDa, e possui três domínios BIR, um UBA e um RING terminal. Inibe as caspases 3 e 7 através da interação destas com os domínios BIR-2 e BIR3, inserindo um resíduo de ácido aspártico no sítio ativo catalítico dessas caspases, mas em orientação espacial inversa à adotada pelos substratos ativadores quando entram nesse mesmo sítio catalítico. A inibição da caspase 9 ocorre por mecanismo distinto. O domínio BIR-3 liga-se ao terminal amino processado da caspase 9 monomérica, impedindo sua dimerização e consequente ativação¹⁶⁻¹⁹. A XIAP tem sido pesquisada como alvo terapêutico, buscando-se maior sensibilização à apoptose por quimioterapia²⁰⁻²².

Em ratos, carcinomas prostáticos resistentes à castração cirúrgica exibem aumento da expressão de XIAP, e sua inibição está relacionada supressão do crescimento tumoral²³. Em humanos, esta inibição aumenta a sensibilidade da neoplasia a agentes quimioterápicos^{15,24}. Foi demonstrado, também, que drogas inibidoras da XIAP, em associação com anti-androgênicos, mostraram eficiência ao inibir o crescimento tumoral em neoplasias avançadas da próstata²⁵.

Células neoplásicas isoladas, que se desprendem do carcinoma primário e perdem a interação com a matriz extracelular, exibem resistência à apoptose devido à superexpressão desta IAP, favorecendo, desta maneira, a sua sobrevivência e ocorrência de metástases à distância²⁶.

1.2) SURVIVINA

A survivina é amplamente expressa em células fetais e embrionárias, e inicialmente acreditou-se ser silenciada em células adultas normais não neoplásicas. Devido ao fato de esta ser a única IAP associada às estruturas cromatínicas, sua função no ciclo celular é monitorar o sucesso da segregação e replicação cromossômica, suprimindo as caspases no núcleo. Menor IAP dos mamíferos, com apenas 16,5 kDa, possui apenas um domínio BIR, e apresenta três transcritos: a forma selvagem e duas isoformas, a survivina Δ Ex3 e a survivina 2b. Sua localização citoplasmática predominante dá-se por exportação do núcleo via CRM-1 dependente. Uma sequência rica em lisina no seu terminal carboxila, ausente na isoforma nuclear Δ Ex3, é necessária para essa exportação. É superexpressa em uma série de linhagens celulares transformadas e em células de câncer de pulmão, intestino, pâncreas, próstata, mama, linfomas não-Hodgkin, sendo associada a fatores de risco de recidivas e de mau prognóstico, além de correlacionar-se significativamente com a mutação da proteína p53 em carcinomas mamários²⁷⁻³¹.

Apesar de imunolocalizar-se em gel com as caspases 3 e 9, não se liga fisicamente a estas, não inativando-as diretamente. Sua provável ação antiapoptótica se dá pela sua capacidade de ligar-se aos inibidores das IAPs (SMAC/DIABLO e Omi/HtrA2), ubiquitinizando-os e marcando-os para degradação e liberando a XIAP para se ligar e inibir as caspases^{29,32,33}.

O uso de alfa-santalol, um dos componentes principais do óleo de sândalo, tem sido estudado em carcinomas de próstata e pele. Seu efeito se dá pela indução da apoptose através de uma redução importante da atividade da Survivina. Além disso, a

susbstância também leva a liberação de citocromo c através da membrana mitocondrial, com ativação da via intrínseca da apoptose^{34, 35}.

1.3) SMAC/DIABLO

Após estresse apoptótico, há liberação da SMAC no citoplasma, a partir da mitocôndria, de forma semelhante ao citocromo C, porém por mecanismo diferente. Está localizada no espaço mitocondrial intermembranoso como proteína mitocondrial precursora, ativada pela remoção da sequência N-terminal. Liga-se a todas as IAPs que foram submetidas a estudos de inibição: XIAP, cIAP-1, cIAP-2 e survivina. Esta ligação se faz especificamente aos domínios BIR-2 e BIR-3 da XIAP através de um domínio ligante de IAPs RHG (REAPER/HID/GRIM), e por IBMs (IAP Binding Motifs), no mesmo sítio da ligação da caspase 9, impedindo assim a sua inibição³⁶.

A ação antiapoptótica de algumas IAPs, como a survivina, ocorre pelo sequestro molecular da SMAC/DIABLO, liberando as moléculas de XIAP para a inibição das caspases²². Foram propostos modelos matemáticos da relação entre o número de moléculas de survivina, XIAP e Smac-Diablo. O desbalanceamento do equilíbrio homeostático molecular leva as células à apoptose ou permite a sobrevivência de células com alterações gênicas graves^{32, 33, 36}.

Ao transferir o gene SMAC para linhagens de carcinoma prostático, mostrou-se redução significativa de XIAP, além de elevação dos níveis de caspas 3 e aumento da atividade apoptótica nestas neoplasias³⁷.

Medicamentos que mimetizam a SMAC/DIABLO em pacientes com doença avançada mostraram-se bem tolerados, levando a indução rápida e constata da degradação de cIAP, mostrando boa ação antitumoral tanto em uso combinado quanto em uso isolado³⁸.

1.4) P53

Localizado no braço curto do cromossomo 17, o gene supressor de tumor p53 codifica a proteína p53, que tem a função de monitorar a integridade do genoma. Ao detectar danos ao DNA, impede que a célula mutada se divida parando o ciclo celular ou induzindo a apoptose³⁹. Células com mutação deste gene e inativação da proteína p53 são incapazes de parar

o ciclo celular para reparo ao DNA, acumulando, desta forma, mutações e rearranjos cromossômicos com consequente transformação neoplásica⁴⁰.

A presença de acúmulo de proteína p53 mutada, em carcinomas prostáticos, detectada pelo método imuno-histoquímico, indica pior prognóstico e progressão da doença⁴. A sua positividade também correlaciona-se com falha no tratamento por radioterapia externa⁴².

1.5) Ki67

Células neoplásicas possuem, como uma das principais características, a resistência à apoptose. Dessa forma, proliferam-se de maneira desordenada, carregando mutações sucessivas ao seu DNA.

Durante todo o ciclo celular, com exceção da fase G0, as células expressam uma proteína não-histona de meia-vida curta, denominada Ki67^{43,44}. O estudo imuno-histoquímico utilizando anticorpos que ligam-se a esta proteína é amplamente utilizado na prática dos patologistas. Seu uso como fator preditivo de progressão nos carcinomas prostático foi estudado no passado, sendo que em diversos estudos esteve correlacionado com maior mortalidade e metástases à distância^{45,46,47}.

Estudos de fatores preditivos e prognósticos são comumente realizados utilizando-se blocos de TMA (Tissue Micro-array). Esta técnica, descrita em 1998, por Kononen⁴⁸, consiste na construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras de tecidos obtidos de dezenas ou centenas de blocos de parafinas originais que são dispostos no bloco receptor seguindo uma ordem predeterminada^{15,49}. Permite desta forma, que numerosas amostras de tecidos sejam avaliadas de uma única vez e é mais comumente utilizado na pesquisa de novos marcadores prognósticos. Nos últimos anos tem aumentado significativamente o número de artigos científicos que relatam a utilização dessa técnica. As vantagens deste método incluem grande economia de tempo, reagentes, tecidos histológicos e anticorpos; uniformização das reações e facilidade na interpretação comparativa dos casos de uma pesquisa; possibilidade de repetição das reações, inclusive em múltiplos níveis de um mesmo bloco; e simplificação na execução de estudos pela utilização do bloco em mais de um experimento⁴⁹⁻⁵¹.

2) JUSTIFICATIVA

Devido à elevada incidência de carcinoma de próstata, assim como grande quantidade de publicações a respeito das proteínas envolvidas no processo apoptótico como possível alvo terapêutico no tratamento de diversas neoplasias, optamos pela realização deste trabalho para comprovar achados de literatura e avaliar a relação da apoptose com a sobrevida dos pacientes. Desta forma, estudamos a importância deste mecanismo de morte celular induzida, assim como o possível impacto de tratamentos visando a indução da apoptose nos carcinomas de próstata.

3) OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é avaliar a imuno-expressão de Survivina, XIAP, Caspase 3 clivada e SMAC/DIABLO em tecido tumoral de pacientes com câncer prostático, correlacionando os resultados com o índice de proliferação celular, imunoexpressão da proteína p53 nestes mesmos tecidos, com a gradação de Gleason, categorias prognósticas e com a sobrevida dos pacientes. Visa, também, implantar e implementar a tecnologia do Tissue Micro Array (TMA, arranjos teciduais em matriz) no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP, com pessoal médico e técnico treinado no uso da técnica. Com isso, busca-se o fortalecimento das linhas de pesquisa em Oncopatologia clínica e experimental do Departamento de Patologia, em especial da área de Uropatologia, organizando uma casuística histórica com amostras de tecido tumoral que contem com informações clínicas e de sobrevida

4) MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado o levantamento das informações clínicas e de sobrevida dos pacientes com diagnóstico de carcinoma prostático feito por biópsia, ressecção transuretral de próstata ou prostatectomia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), que tinham blocos de parafina e laudos disponíveis no Departamento de Patologia da FMB, a partir do ano de 1980 até o ano 2000, material estocado por longo período de tempo, cujo uso não mais afetará negativamente qualquer dos pacientes.

Novas lâminas coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina foram confeccionadas a partir de todos os blocos de parafina obtidos. Estas foram revisadas por dois patologistas, e os carcinomas prostáticos foram reclassificados de acordo com critérios recentes estabelecidos pela Classificação de Tumores da Organização Mundial de Saúde e International Society of Urological Pathology (ISUP) ^{52,53}.

Casos em que o material restante era escasso, ou em que o tumor exibia estado de conservação prejudicado, foram sistematicamente excluídos, assim como pacientes que não possuíam blocos de parafina com tecido tumoral disponível. Com isso, foram selecionados 115 casos em que o material encontrava-se em quantidade suficiente e estado de conservação adequado para análise e posterior realização de estudo imuno-histoquímico.

Após a nova avaliação e reclassificação dos tumores, foram confeccionados blocos de Tissue Micro-array (TMA), com duas amostras de cada neoplasia. Estes foram encaminhados para cortes histológicos no departamento de Patologia da EPM-UNIFESP onde novas lâminas foram obtidas, e esses foram então submetidos a técnica de imuno-histoquímica no departamento de Patologia do A C Camargo Cancer Center.

As lâminas foram desparafinizadas em xilol a 60°C por 20 minutos, seguida por xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida foram colocadas, sucessivamente, em etanol 100%, etanol 85% e etanol 70%, permanecendo 30 segundos em cada solução. Após, foram lavadas em água corrente e destilada.

Para a reação imuno-histoquímica, a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 foi fervida em panela de pressão (Solar, Rapid Express, 4 ½ litros, Tramontina®) destampada e, ao atingir ebulição, foram mergulhadas as lâminas. A panela foi então

lacrada com a válvula seletora de pressão no número 2, sendo após 3 minutos girada novamente para liberação do vapor. Ao final da despressurização total, com a panela fechada sob água corrente, foi retirada a tampa desta e as lâminas foram, então, lavadas novamente em água corrente e destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com H_2O_2 a 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada. Findadas as trocas, as lâminas passaram por água corrente e destilada. A solução salina tamponada foi lavada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos.

As lâminas foram, então, incubadas com os anticorpos primários diluídos em títulos pré-estabelecidos, conforme tabela 1, abaixo, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, St Louis, MO, EUA) e azida sódica 0,1% (Merck, 6688), por 30 min a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Tabela 1: Anticorpos utilizados na reação imuno-histoquímica, assim como seu respectivo clone, titulação e fabricante.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Ki-67	MiB-1	1:200	Dako #M7240, Glostrup, Dinamarca
Caspase 3 clivada (D175)	policlonal	1:200	Cell Signaling #9661, Danvers, MA EUA
p53	DO-7	1:200	Dako #M7240
Smac/Diablo	Y12 monoclonal em coelho	1:100	Epitomics # 1012-1, Burlingame, CA, EUA
Survivin (ab-6)	policlonal	1:100	Thermos/Neomarkers # Rb1629, Fremont, CA EUA
XIAP(H202)	policlonal	1:600	Santa Cruz #sc11426, Santa Cruz, CA, EUA

Foi feita lavagem em tampão PBS com três trocas de três minutos cada. Em seguida, sucedeu-se à incubação das lâminas com NovoLink Post PrimaryBlock (NovoLink Max Polymer, LeicaBiosystems Newcastle Ltd, RE7260-k, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) por 30 min a 37° C. Antes e após esta etapa, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, sendo realizadas 3 trocas de 3 minutos cada.

A etapa seguinte foi a incubação em solução substrato: 100 mg de 3, 3'Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de

Dimetilsulfóxido (DMSO) (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA); 1 mL de H₂O₂ 6% e 100 mL de PBS por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Ao microscópio, observou-se nas lâminas controle o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, sendo que foram lavadas em água corrente e em água destilada antes e após este procedimento. Seguiu-se a imersão, por duas vezes, em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e em água destilada.

A desidratação das lâminas foi realizada banhando-as, por 30 segundos, em soluções de etanol 80%, etanol 95%, etanol 100% (duas vezes) e xilol (quatro vezes).

Por fim, seguiu-se à montagem das lâminas com lamínula e Entellann (Merck, 1.07961, Damstadt, Alemanha).

Foram incluídos controles positivos e negativos nas reações, sendo estes últimos realizados por omissão dos anticorpos primários.

As lâminas foram lidas e os resultados graduados de acordo com cada marcador imuno-histoquímico. Para a leitura das reações imuno-histoquímicas do ki67 e p53 foram realizadas a contagem de núcleos positivos e calculada sua porcentagem em relação ao total. Devido à falta de consenso na literatura em relação a graduação e valores de corte para os marcadores imuno-histoquímicos utilizados, optamos por realizar variadas formas de analisar os resultados, no intuito de obter maior significância estatística⁴⁵.

Na avaliação do índice de proliferação celular, dividimos os resultados em baixa, média e alta expressão para Ki67 em uma das avaliações. Os cortes utilizados foram de até 15% para baixa (atribuído valor 0), 16% a 30% para média (valor 1), e acima de 31% para alta imunoexpressão (2). Fizemos outras clivagens da expressão de Ki67 em imunoexpressão baixa (até 15%, valor 0) alta (mais de 16%, 1), e com nível de corte em até 10% (1) e mais de 11 % (2), no intuito de definir qual o limiar mais útil para avaliação.

Para a imunoexpressão de p53 dividimos em quatro grupos, sendo no primeiro grupo considerada imunoexpressão baixa/negativa até 25% de positividade nuclear

(células tumorais), e atribuído valor 0 (zero), no segundo grupo com imunoexpressão baixa de 26% a 50% com valor 1, imunoexpressão média de 51% a 75% com valor 2, e imunoexpressão alta com mais de 75% de positividade em núcleos de células neoplásicas, com valor 3. Também estudamos os resultados em escala de 2, onde 0 foi atribuído para até 30% das células com núcleos positivos, e 1 para mais de 30%. A avaliação dos resultados imuno-histoquímicos para p53 segundo a intensidade da reação nuclear foi de valor 0 para reação negativa, 1 para reação fraca, 2 para moderada, e 3 para reação forte. O escore de p53 foi obtido multiplicando-se a intensidade da reação pela porcentagem de células com núcleos positivos.

O Índice Apoptótico (IA) foi avaliado contando-se as células com positividade citoplasmática para caspase-3-clivada, e divididas em grupos de IA baixo (até 10% de células tumorais positivas, e atribuído valor 0, I.A. médio de 11% a 25% com valor 1 e IA alto com mais de 26%, atribuído valor 2. Também estudamos os resultados em duas escalas de 2, onde numa delas o valor 0 foi atribuído para casos com até 10% das células com citoplasma positivo, e valor 1 para mais de 10%. Na outra escala o corte foi em até 35% de células positivas (valor 0) e mais de 35% (valor 1).

As marcações para XIAP, Survivina, Smac/DIABLO e Caspase 3 clivada foram graduadas de acordo com sua intensidade de imunocoloração e categorizadas em escala de 4, onde: 0(zero) – negativo; 1 –positividade fraca; 2 – positividade média; 3 – positividade forte. O cálculo da porcentagem de células positivas para esses marcadores não se mostrou relevante. Para posterior avaliação estatística, os resultados dos marcadores SMAC e Survivina foram também categorizados em escala de 2, sendo consideradas expressão baixa aqueles anteriormente avaliados como 0 e 1, e expressão alta os anteriormente avaliados como 2 e 3. Os resultados para XIAP foram apenas reações fraca ou negativa, e foram naturalmente categorizados em escala de 2.

5) RESULTADOS

5.1) DESCRITIVA DA CASUÍSTICA

A revisão e reclassificação das neoplasias demonstrou 32 casos (27,83%) classificados como Gleason 6 (3+3); 24 casos (20,87%) como Gleason 7 (3+4), 1 caso (0,87%) de Gleason 8 (3+5); 21 casos (18,26%) como Gleason 7 (4+3), 20 casos (17,39%) de Gleason 8 (4+4); 6 casos (5,22%) de Gleason 9 (4+5); 1 caso (0,87%) com Gleason 8 (5+3); 6 casos (5,22%) com Gleason 9 (5+4) e, por fim, 4 casos classificados como Gleason 10 (5+5) (tabela 2).

Tabela 2: distribuição dos pacientes nos diversos graus de Gleason, revisados segundo o consenso ISUP/OMS 2005:

Gleason revisado	Frequência	%
3+3	32	27.83
3+4	24	20.87
3+5	1	0.87
4+3	21	18.26
4+4	20	17.39
4+5	6	5.22
5+3	1	0.87
5+4	6	5.22
5+5	4	3.48
total	115	100.00

Estes foram, então, agrupados em categorias prognósticas estabelecidas pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP, do inglês International Society of Urological Pathology). Desta forma, neoplasias classificadas como Gleason 6 (3+3) pertencem à categoria prognóstica 1; Gleason 7 (3+4) à categoria 2; Gleason 7 (4+3) à categoria 3; todos os casos com Gleason total de 8 à categoria 4 e os casos com Gleasons 9 e 10 à categoria 5.

Obtivemos, desta maneira, 32 casos (27,83%) pertencentes à categoria prognóstica 1, 24 casos (20,87%) à categoria 2, 21 casos (17,39%) à categoria 3, 22 casos (19,13%) à categoria 4 e 16 casos (14,78%) à categoria 5 (gráfico 1)

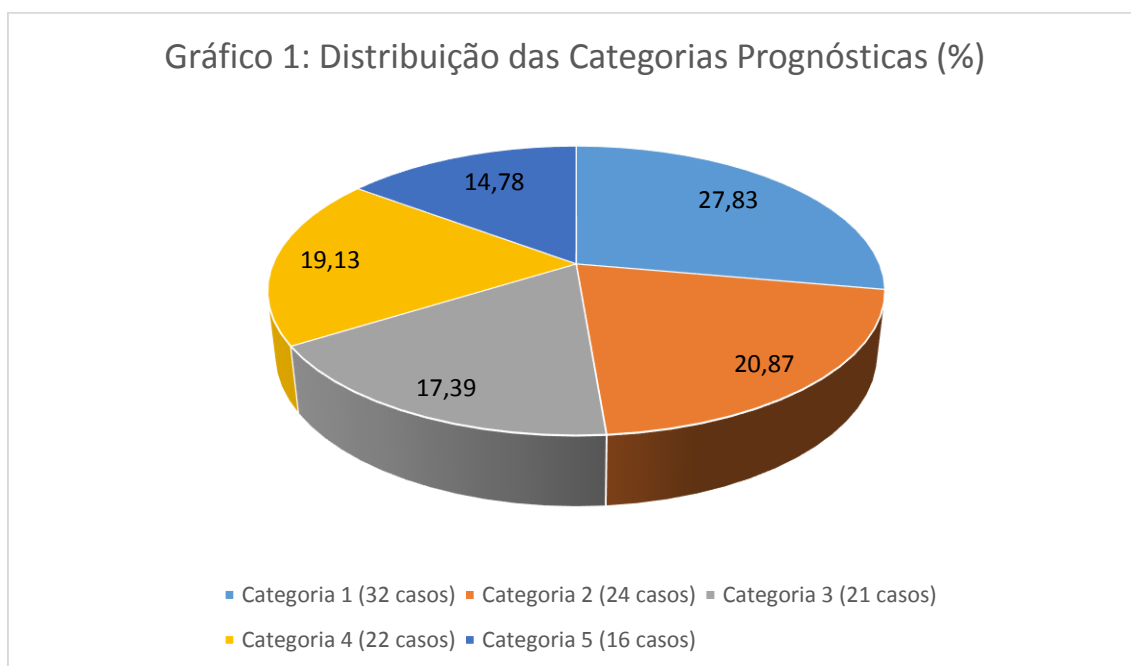


Gráfico 1: distribuição dos pacientes segundo categorias prognósticas propostas pela ISUP:

Ao avaliar os resultados imuno-histoquímicos das reações para KI67 (figura 2) obtivemos 79 casos (78,2%) com baixa imuno-expressão (valor atribuído 0); 15 casos (14,85%) com imuno-expressão média (valor 1) e 2 casos (6,98%) com imuno-expressão alta (valor 2) (gráfico 2). Utilizando a escala com somente duas categorias, obtivemos 79 casos (78,22%) com imuno-expressão baixa e 22 casos (21,78%) com imuno-expressão alta (gráfico 3) quando usamos valor de corte de 15%. Ao usarmos 10% como valor de corte, constatamos que setenta casos (69,31%) expressaram até 10% das células positivas para KI67, e em 31 casos (30,69%) mais de 10% das células foram positivas (gráfico 4). Em 14 casos tivemos perdas de amostras nos cortes de TMA imunocorados para Ki-67.

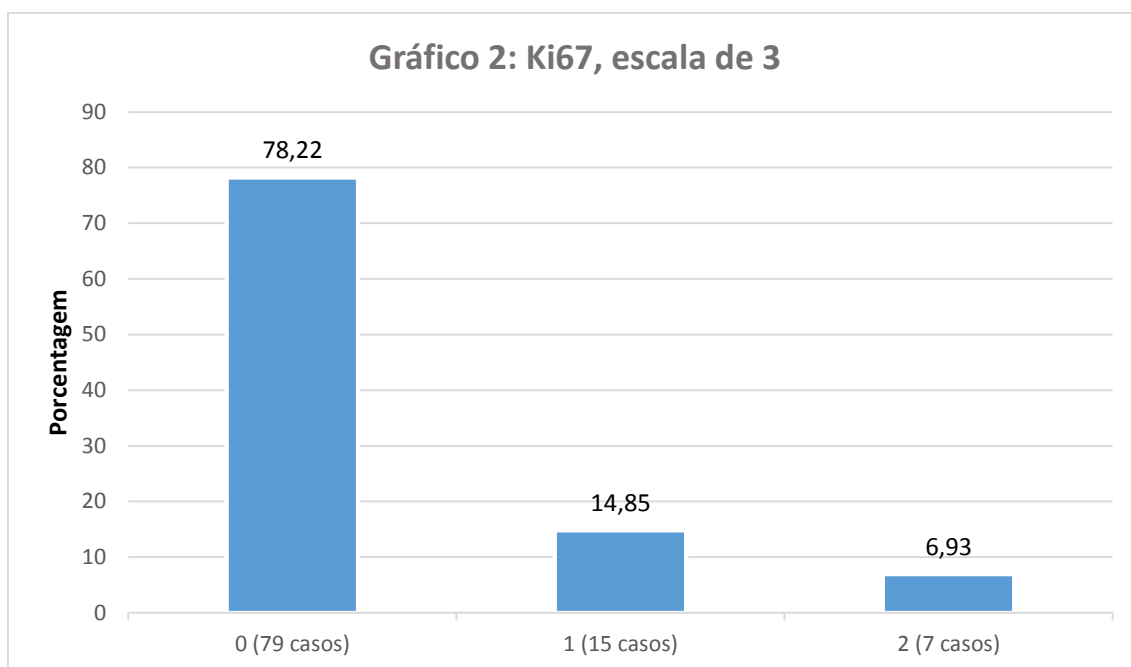


Gráfico 2: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para Ki67 nos pacientes da casuística, em escala de 3 onde: 0 – até 15% das células com núcleos positivos, 1- de 16% a 30%, 2- mais de 30%. Dados perdidos: 14.

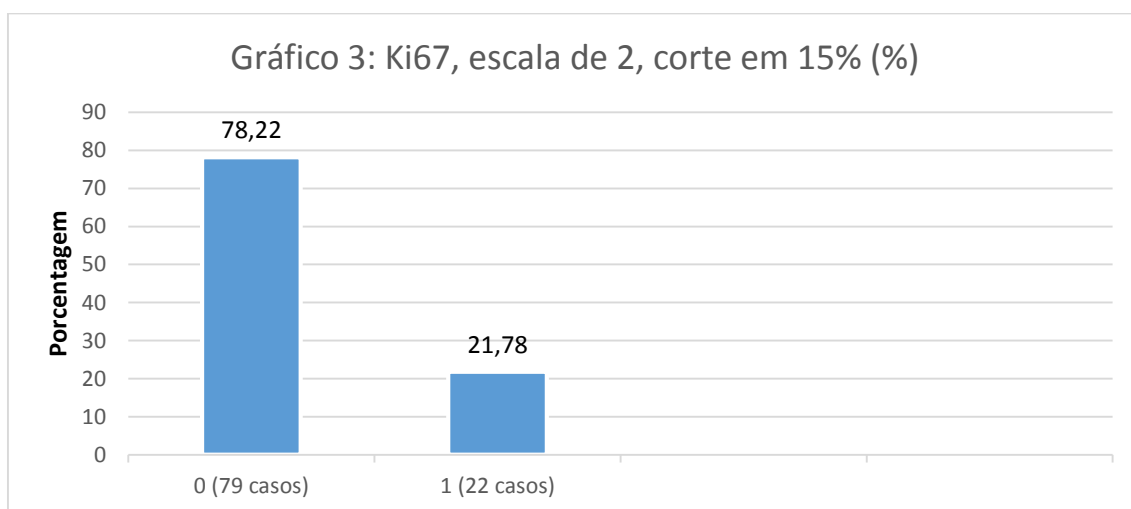


Gráfico 3: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para Ki67 nos pacientes da casuística, em escala de 2 onde: 0 – até 15% das células com núcleos positivos, 1- mais de 15. Dados perdidos: 14.

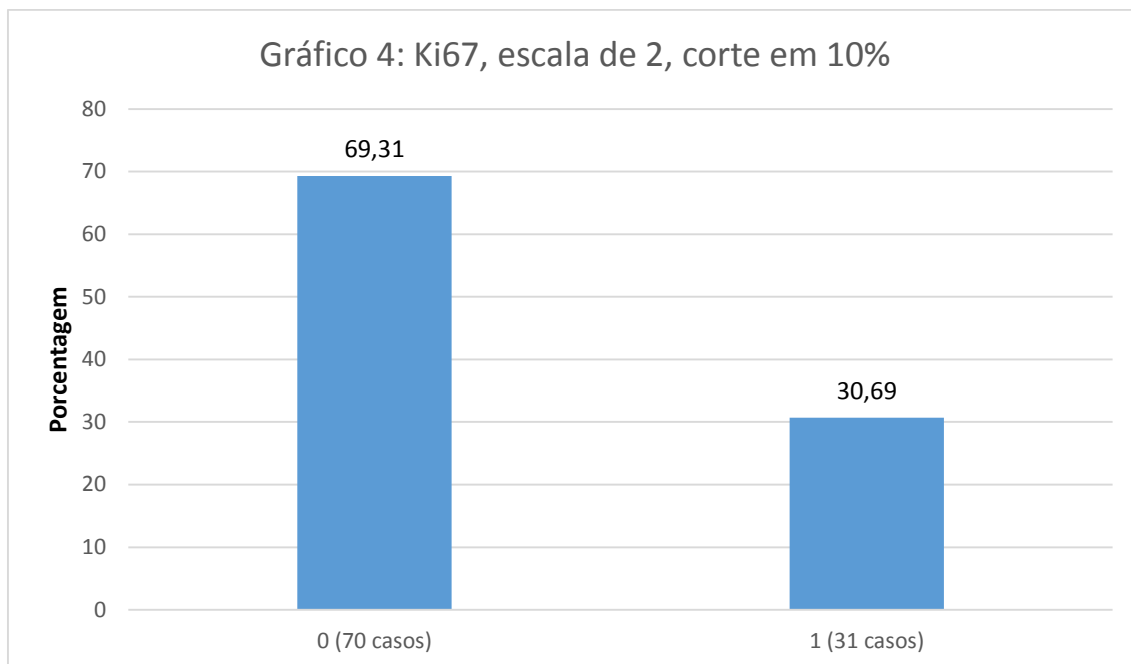


Gráfico 4: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para Ki67 nos pacientes da casuística, em escala de 2 onde: 0 – até 10% das células com núcleos positivos, 1- mais de 10%. Dados perdidos: 14.

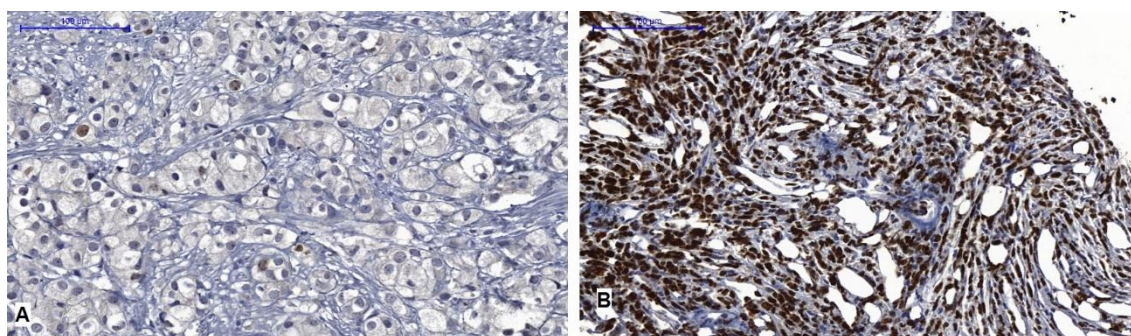


Figura 2: Imunomarcação para Ki6. Baixo índice (A) e alto índice (B)

O gráfico 5 mostram a distribuição dos resultados das reações para o marcador p53 (figura 3), sendo estratificados em categoria 0 (zero) os casos com reação negativa, categoria 1 os casos com reatividade fraca, categoria 2 os resultados com reação moderada e categoria 3 os casos com reação forte. Desta forma, observamos 27,18% dos casos negativos, 53,40% dos casos com reatividade fraca, 16,50% dos casos com reatividade moderada e 2,91% dos casos com reatividade forte. Dentre o total de casos, 34,95% mostraram até 25% de núcleos positivos (categoria 0); 21,36% mostram positividade entre 26 e 50% dos núcleos (categoria 1); 22,33% mostraram positividade entre 51 e 75% dos núcleos (categoria 2) e 21,36% mostraram positividade em mais de 75% dos núcleos (categoria 3) (gráfico 6). Se dividirmos os

resultados em dois grupos, utilizando como corte o valor de 30% de núcleos positivos, observamos que em 48 casos (46,60%) a positividade foi de até 30% dos núcleos, mantendo-se acima deste resultado em 55 casos (53,40%) (gráfico 7). Houve perda de 12 casos na realização deste marcador durante na confecção de cortes e imunorreação dos blocos de TMA.

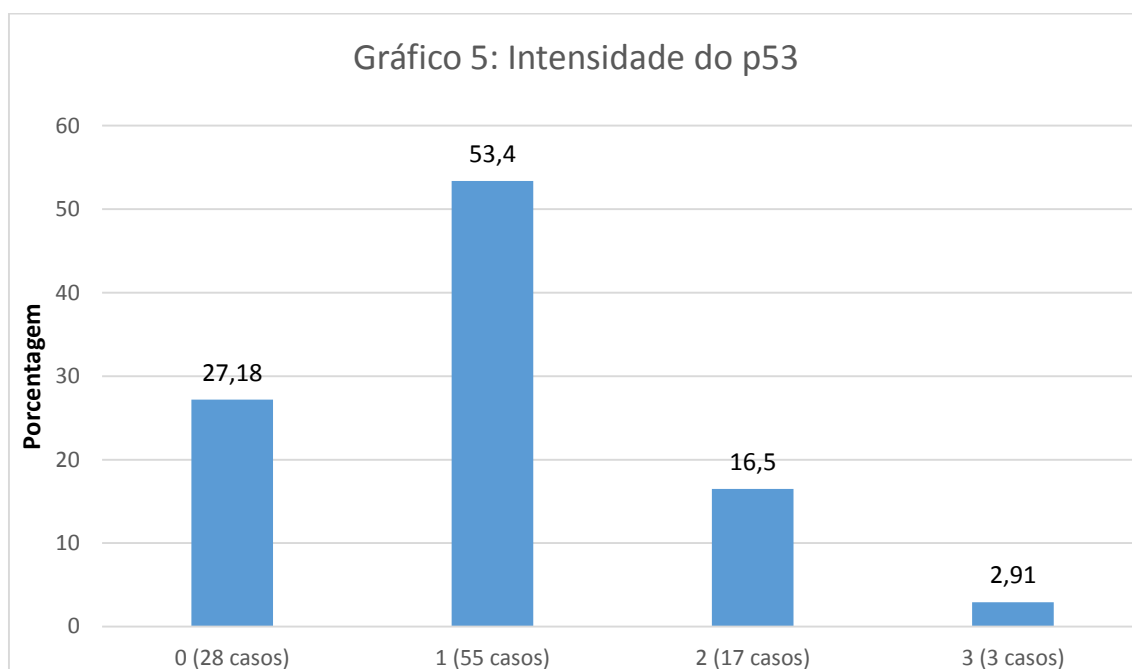


Gráfico 5: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para p53 nos pacientes da casuística segundo a intensidade da reação nuclear, onde: 0 – reação negativa, 1- reação fraca, 2- moderada, 3- forte. Dados perdidos: 12.

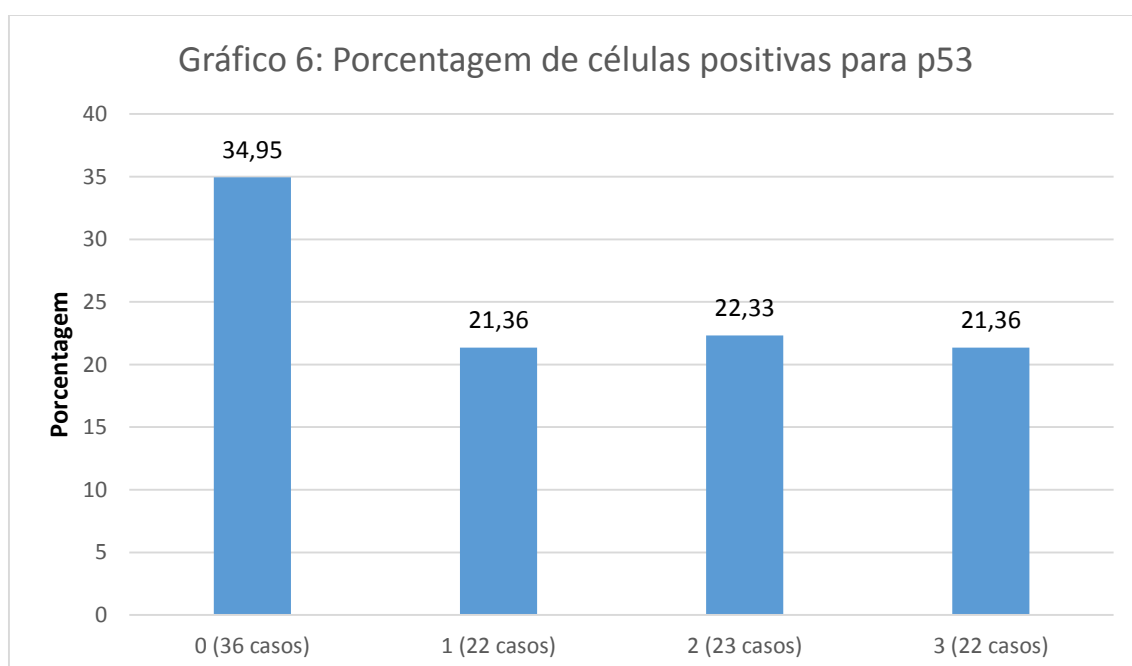


Gráfico 6: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para p53 nos pacientes da casuística, em escala de 4 onde: 0 – até 25% das células com núcleos positivos, 1- de 26% a 50%, 2- de 51% a 75%, 3- mais de 75%. Dados perdidos: 12

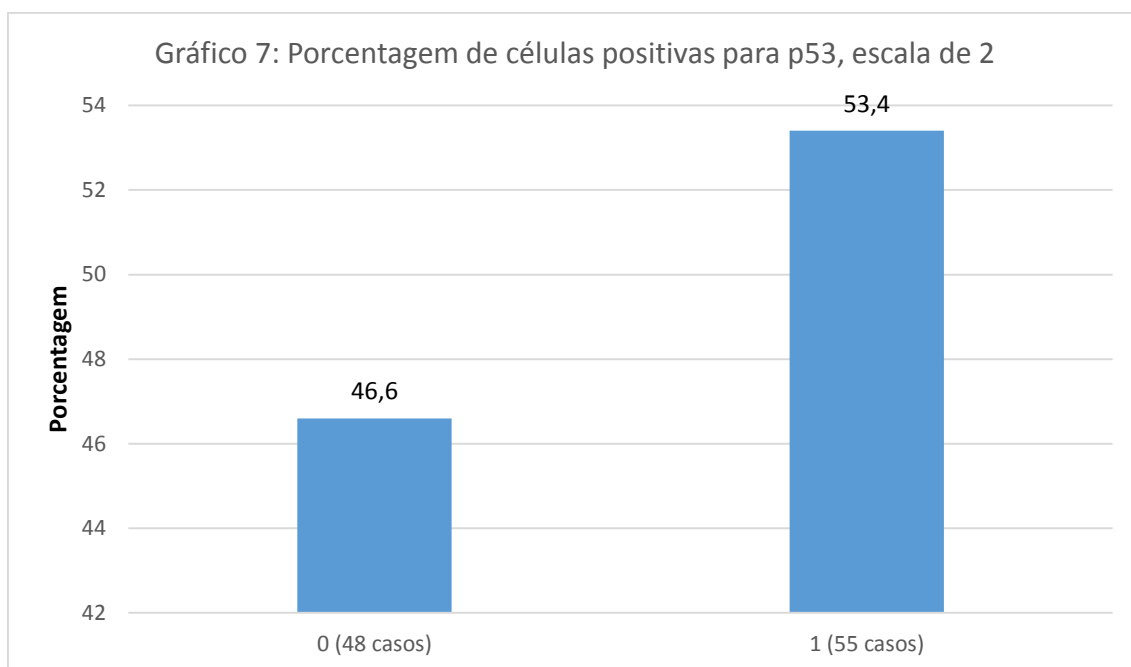


Gráfico 7: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para p53 nos pacientes da casuística, em escala de 2 onde: 0 – até 30% das células com núcleos positivos, 1- mais de 30%. Dados perdidos: 12.

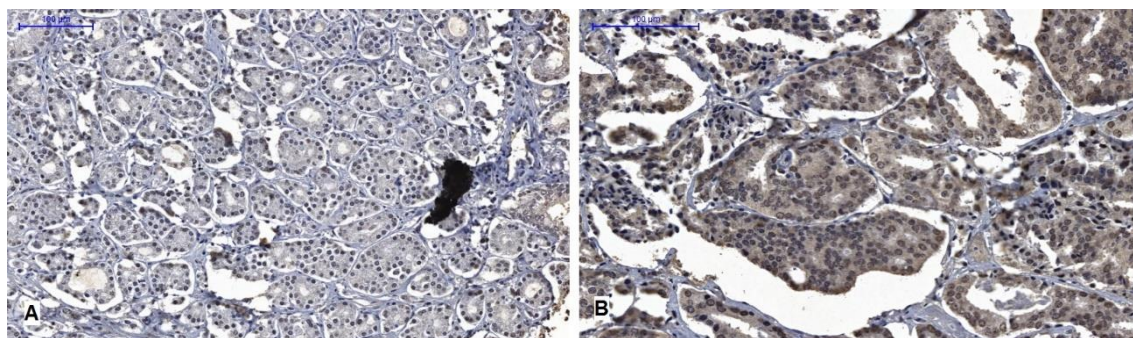


Figura 3: Imunomarcação para p53. Negativa (A) e em mais de 75% das células (B).

A avaliação do índice apoptótico através da imunoexpressão de caspase-3-clivada (figura 4) demonstrou 12 casos (12,77%) com até 10% de células positivas; 37 casos (39,36%) com 11 a 35% de células positivas e 45 casos (47,87%) com mais de 35% de células positivas (gráfico 8). Em 12 casos (12,63%) houve positividade em até 10% das células, e em 83 casos (87,37%) a positividade foi acima de 10% (gráfico 9). Ao utilizar 35% das células positivas como valor de corte para agrupar os casos, observamos que 49 casos (51,58%) estavam iguais ou abaixo deste valor, e 46 casos (48,42%) estavam acima (gráfico 10). Houve perda de 21, 20 e 20 casos nos blocos de TMA, respectivamente.

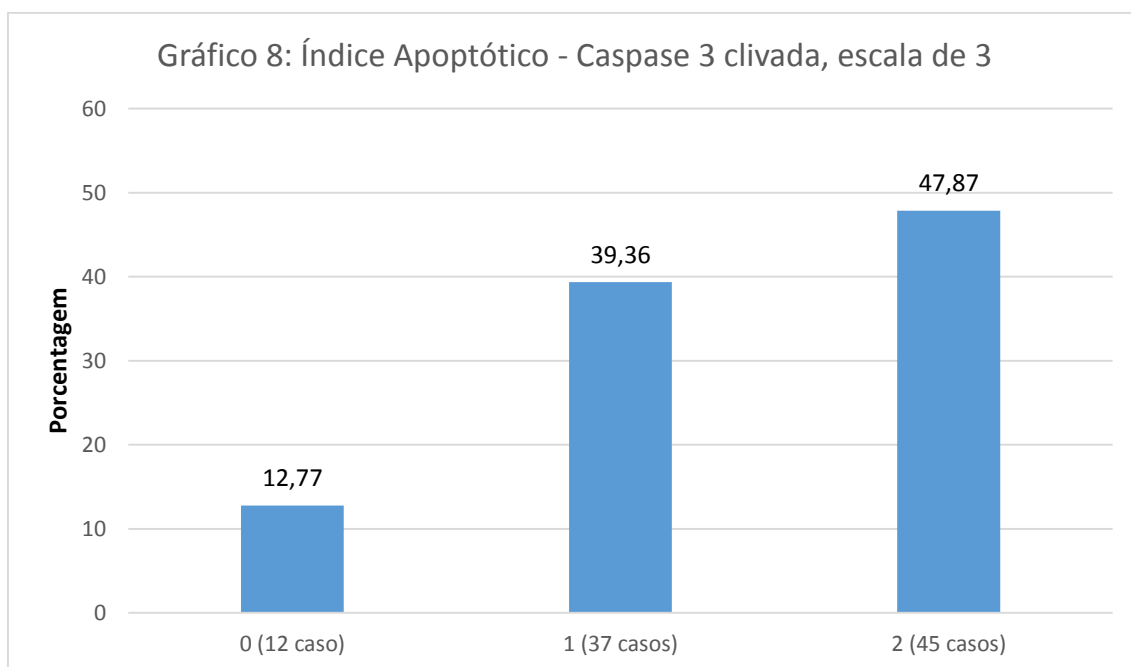


Gráfico 8: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para Índice Apoptótico (I.A.) com caspase-3-clivada nos pacientes da casuística, em escala de 3 onde: 0 – até 10% das células com citoplasma positivo, 1- de 11% a 35%, 2- mais de 35%. Dados perdidos: 21.

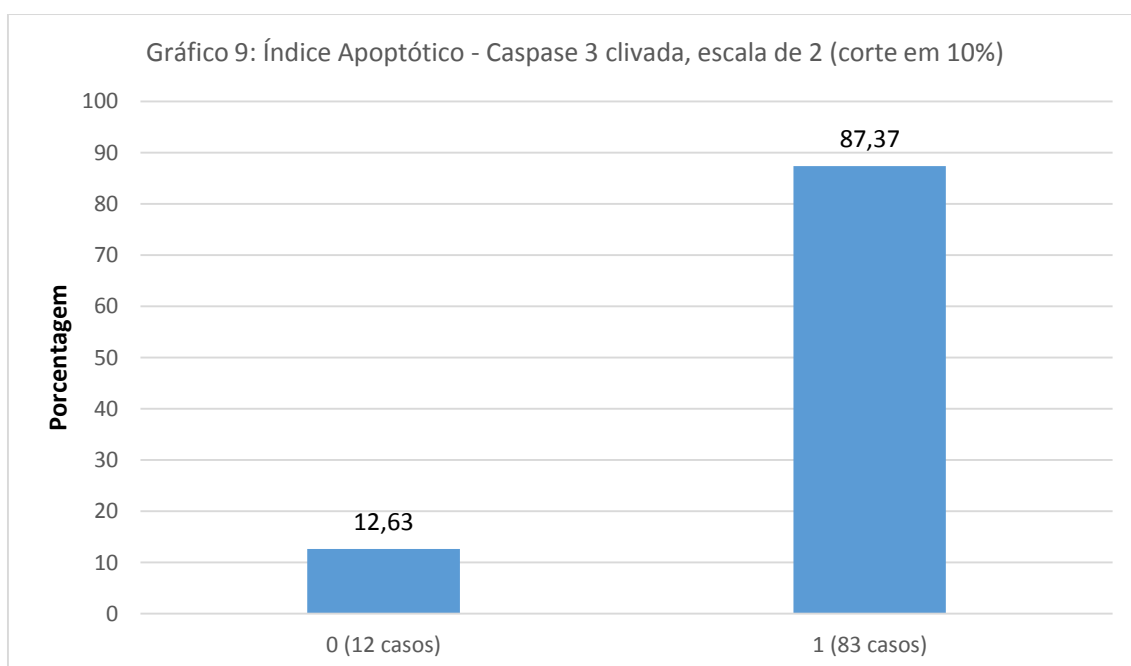


Gráfico 9: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para Índice Apoptótico (I.A.) com caspase-3-clivada nos pacientes da casuística, em escala de 2 onde: 0 – até 10% das células com citoplasma positivo, 1- mais de 10%. Dados perdidos: 20.

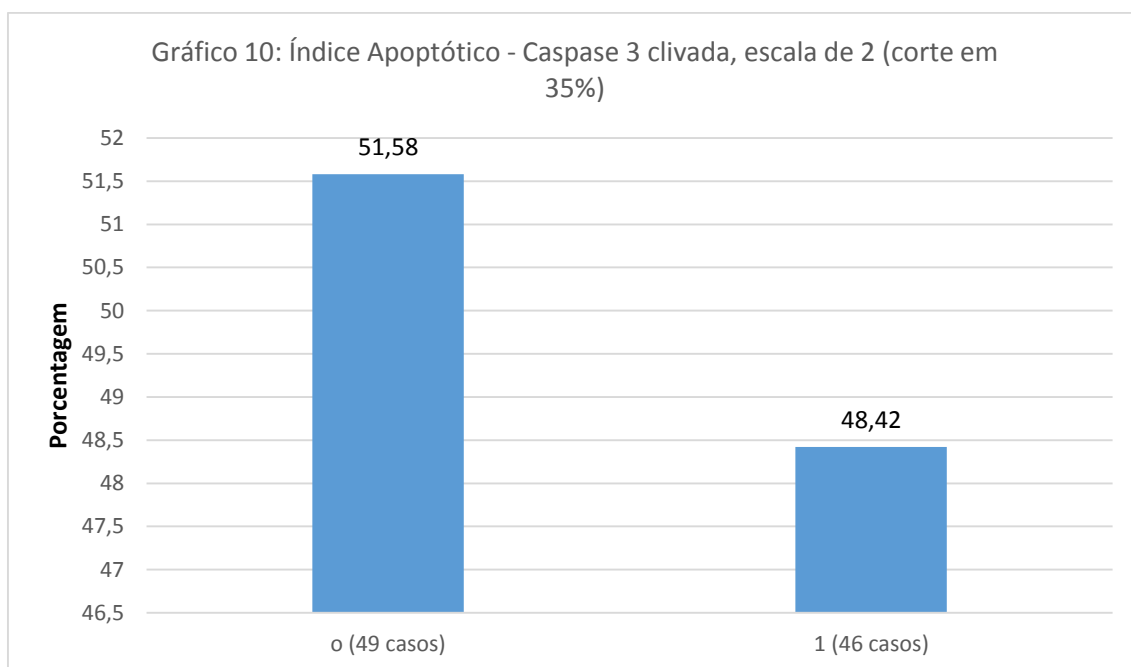


Gráfico 10: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para Índice Apoptótico (I.A.) com caspase-3-clivada nos pacientes da casuística, em escala de 2 onde: 0 – até 35% das células com citoplasma positivo, 1- mais de 35%. Dados perdidos: 20

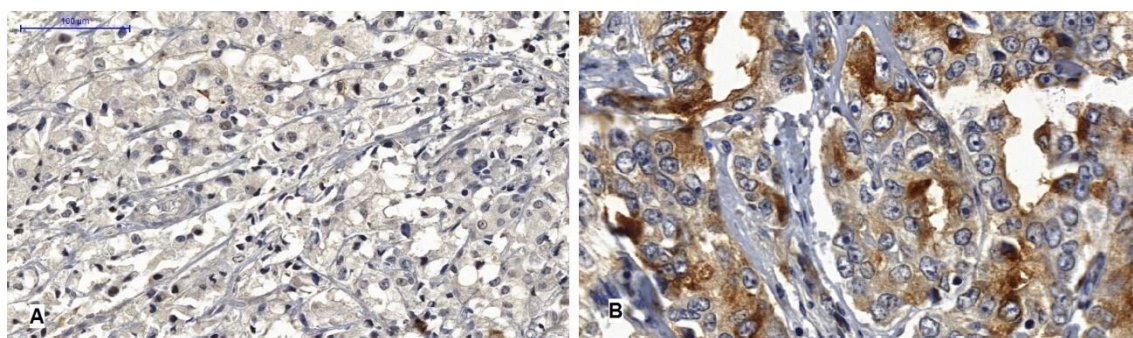


Figura 4: Índice apoptótico (através da caspase 3 clivada). Marcação negativa (A) e em mais de 35% das células (B).

Em 18 casos (17,48%) houve negatividade para SMAC/DIABLO (figura 5). Trinta e nove casos (37,86%) foram fracamente positivos, 20 casos (19,42%) exibiram moderada intensidade de reação e 26 casos (25,24%) foram fortemente positivos (gráfico 11). Ao dividir os casos agrupando as reações negativas com as fracas e as reações moderadas com as fortes, obtivemos 57 casos (55,34%) no primeiro grupo e 46 casos (4,66%) no segundo (gráfico 12). Houve perda de 12 casos.

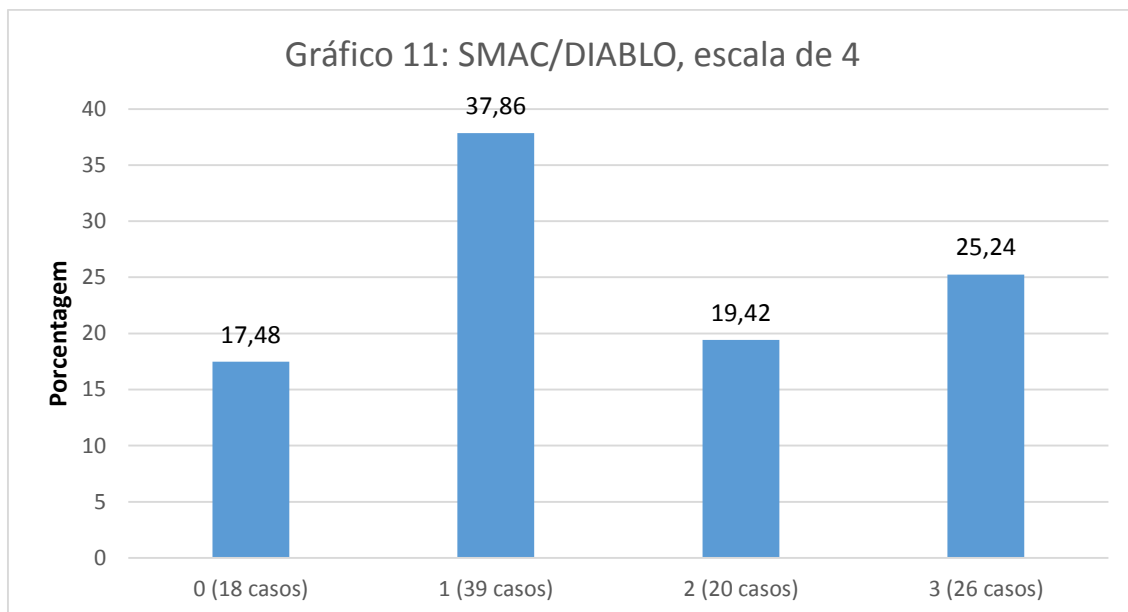


Gráfico 11: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para SMAC/DIABLO nos pacientes da casuística segundo a intensidade da reação citoplasmática em escala de 4, onde: 0 – reação negativa, 1- reação fraca, 2- moderada, 3- forte. Dados perdidos: 12.

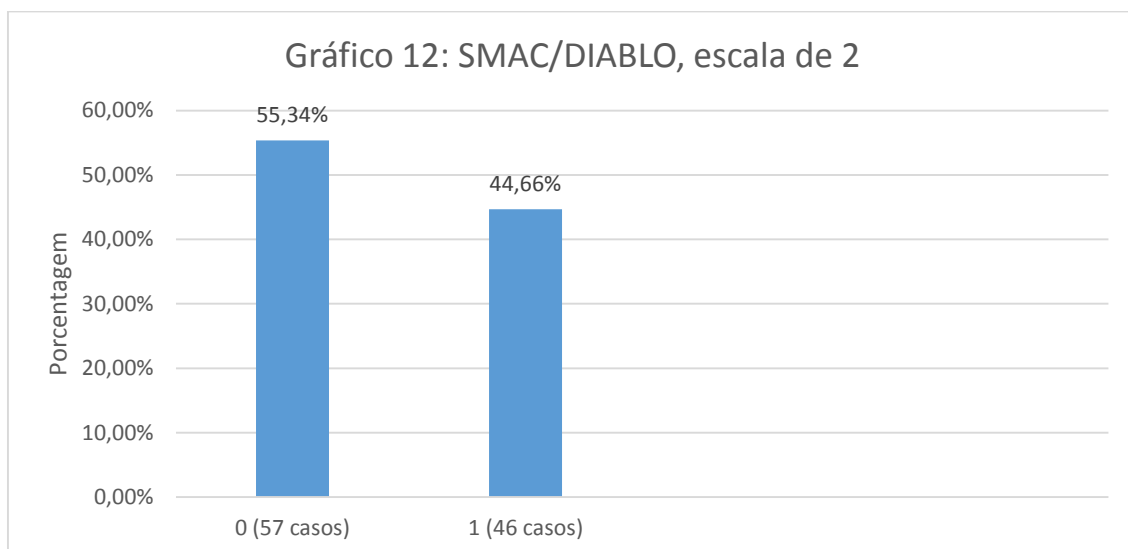


Gráfico 12: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para SMAC/DIABLO nos pacientes da casuística segundo a intensidade da reação citoplasmática em escala de 2, onde: 0 – reação negativa/fraca, 1- reação moderada/forte. Dados perdidos: 12.

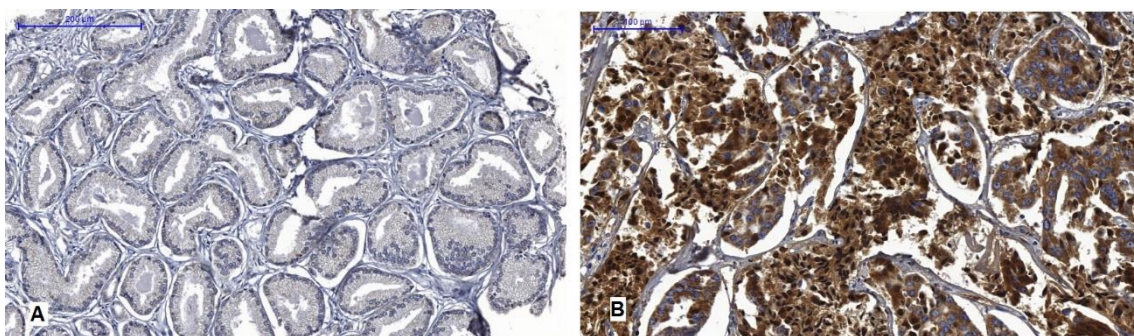


Figura 5: SMAC/DIABLO. Marcação negativa (A) e forte (B)

A survivina (figura 6) mostrou-se negativa em 43 casos (41,35%); fracamente positiva em 50 casos (48,08%); moderadamente positiva em 10 casos (9,62%) e somente em 1 caso (0,96%) esta foi fortemente positiva (gráfico 13). Utilizando uma escala com duas estratificações, sendo a primeira constituída pelos casos negativos e fracamente positivos, e a segunda constituída pelos casos moderada e fortemente positivos, notamos 93 casos (89,42%) pertencentes ao primeiro e 11 casos (10,58%) pertencentes ao segundo (gráfico 14). Houve perda de 11 casos.

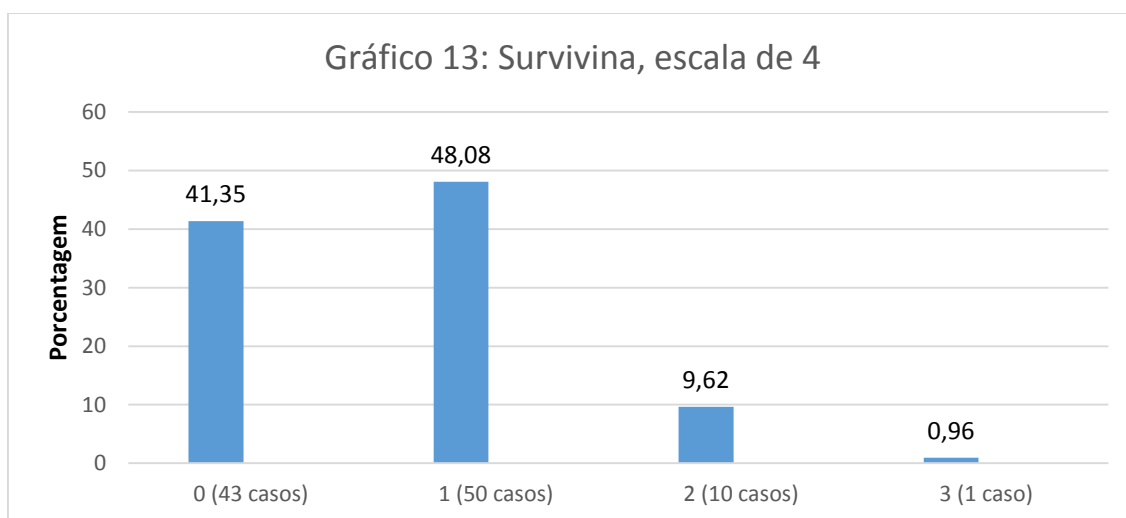


Gráfico 13: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para Survivina nos pacientes da casuística segundo a intensidade da reação citoplasmática e, escala de 4, onde: 0 – reação negativa, 1- reação fraca, 2- moderada, 3- forte. Dados perdidos: 11.

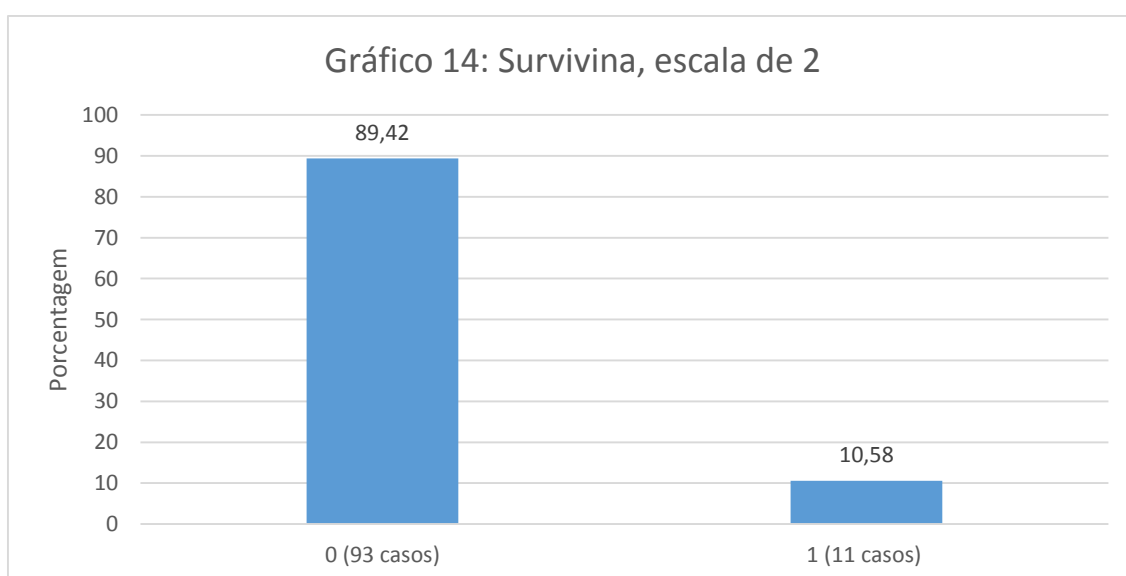


Gráfico 14: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para Survivina nos pacientes da casuística segundo a intensidade da reação citoplasmática em escala de 2, onde: 0 – reação negativa/fraca, 1- reação moderada/forte. Dados perdidos: 11.

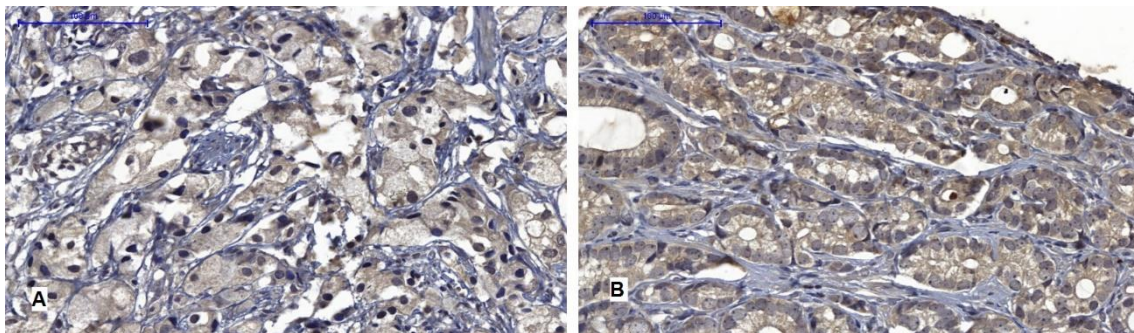


Figura 6: Survivina. Marcação fraca (A) e forte (B).

O teste imuno-histoquímico para XIAP (figura 7) resultou negativo em 95 casos (95,96%), e em 4 casos (4,04%) foi positiva (gráfico 15).

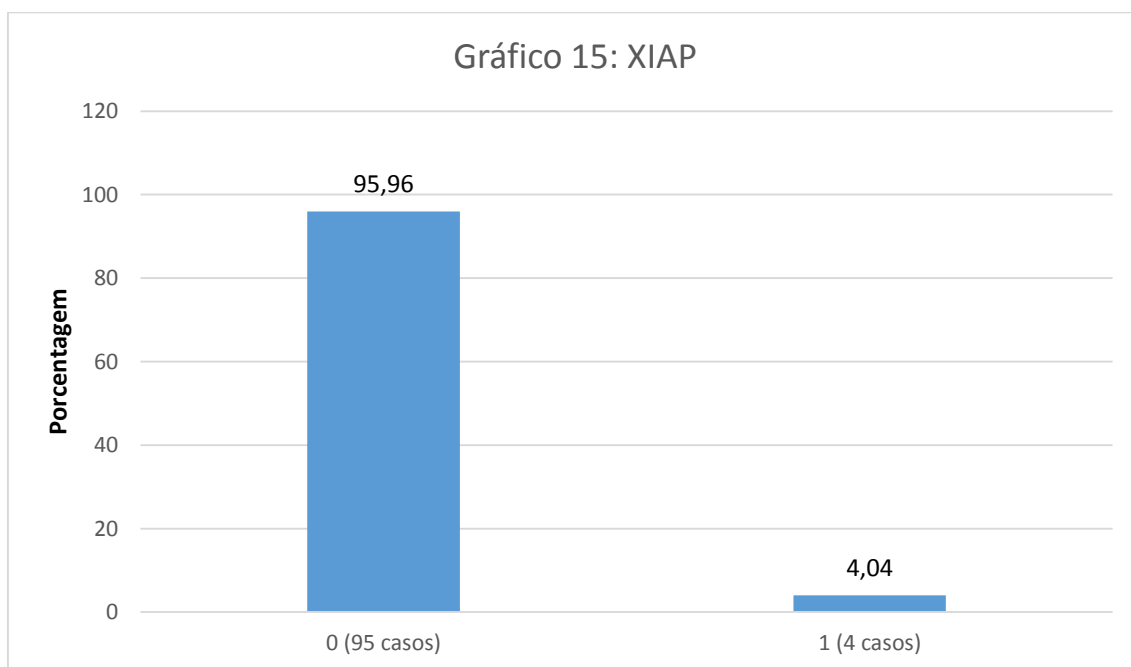


Gráfico 15: distribuição dos resultados imuno-histoquímicos das reações para XIAP nos pacientes da casuística segundo a intensidade da reação nuclear, onde: 0 – reação negativa, 1- reação positiva. Dados perdidos: 16.

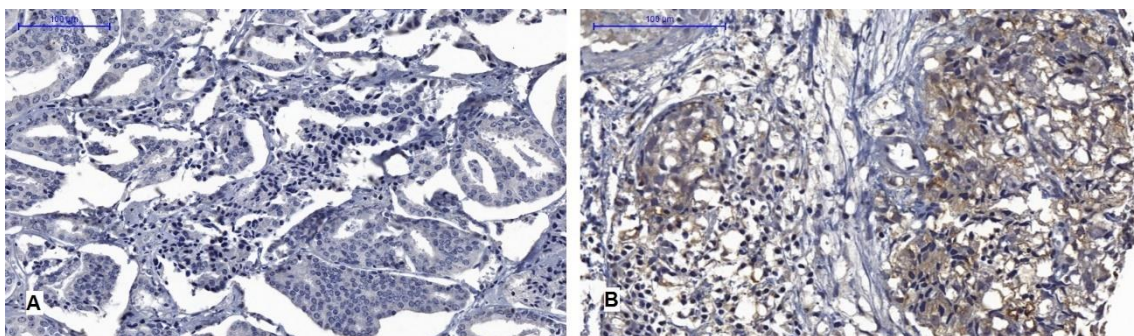


Figura 7: XIAP. Marcação negativa (A) e positiva (B).

As médias obtidas foram de 10,51 para a porcentagem de Ki67, com desvio padrão de 18,38 e mediana de 3,00, em um total de 101 casos. Para a porcentagem de p53 a média foi 40,54%, com desvio padrão de 32,93% e mediana de 40,00% em um total de 103 casos. O índice apoptótico teve média de 33,21%, com desvio padrão de 16,71% e mediana de 35,00%, totalizando 95 casos. Com a utilização de escores para a análise do p53, a média foi 1,80, com desvio padrão de 2,04 e mediana de 1,00 em 10 casos estudados.

Houve perda de seguimento ou falta de informações nos prontuários de 36 pacientes. Vinte e oito pacientes morreram em consequência da doença, sendo que outros 5 morreram com neoplasia, porém de outra causa. Vinte pacientes apresentaram cura, sendo que, destes, 7 foram a óbito livres de doença posteriormente. Encontram-se vivos 17 pacientes, 7 dos quais ainda estão acometidos pela neoplasia.

A sobrevida média dos pacientes, em meses, foi 105,71 meses, com desvio padrão de 63,63 meses e mediana de 111,50 meses em um total de 56 casos com informação no prontuário. O menor tempo de sobrevida, em paciente que foi a óbito devido à neoplasia, foi de 10 meses, sendo que o carcinoma foi classificado como Gleason 7 (3+4). A maior sobrevida, dentre os pacientes que morreram pela doença, foi de 186 meses, com carcinoma também classificado como Gleason 7 (3+4). Os dados encontram-se resumidos na tabela 3.

Tabela 3: Gleason revisado, Categorias Prognósticas, tempo de sobrevida e desfecho dos pacientes.

Identificação	Gleason Revisado	Categoria Prognóstica (ISUP)	Tempo de Sobrevida (meses)	Desfecho
PR1	4+4	4		Sem informações no prontuário
PR2	4+4	4		Sem informações no prontuário
PR3/PR4	4+4	4	123	Morte pela doença
PR5 / PR6	4+4	4	63	Morte pela doença
PR10	4+4	4	28	Morte pela doença
PR11	4+5	5		Sem informações no prontuário
PR12	4+5	5		Sem informações no prontuário
PR13	4+4	4	32	Morte pela doença
PR14	3+4	2		Perda de seguimento
PR15	5+4	5	36	Morte pela doença
PR16	4+4	4		Sem informações no prontuário
PR17	5+4	5		Sem informações no prontuário
PR18	4+3	3		Sem informações no prontuário
PR19	4+4	4	26	Morte pela doença

PR20	4+4	4	160	Morte pela doença
PR21	3+3	1		Sem informações no prontuário
PR22	4+4	4	49	Morte pela doença
PR23	4+3	3		Perda de seguimento
PR24	5+5	5		Sem informações no prontuário
PR25	3+3	1	215	Morte sem doença
PR26	5+5	5		Sem informações no prontuário
PR27	3+4	2		Perda de seguimento
PR28	3+3	1		Sem informações no prontuário
PR29	4+4	4		Sem informações no prontuário
PR30	3+4	2		Perda de seguimento
PR31	5+5	5	120	Morte com doença (outra causa)
PR32	4+3	3	146	Morte pela doença
PR33	3+3	1		Perda de seguimento
PR34	3+4	2		Perda de seguimento
PR35	3+3	1	159	Morte pela doença
PR36	3+4	2	186	Morte pela doença
PR37	4+4	4	24	Morte pela doença
PR38	3+3	1		Perda de seguimento
PR39	3+4	2		Sem informações no prontuário
PR40	4+4	4		Perda de seguimento
PR41	3+4	2		Perda de seguimento
PR42	3+3	1	148	Morte sem doença
PR43	3+3	1		Sem informações no prontuário
PR44	3+4	2		Perda de Seguimento
PR45	3+3	1	212	Morte sem doença
PR46	4+3	3		Perda de seguimento
PR47	3+3	1	146	Morte sem doença
PR48	3+4	2		Morte com doença (outra causa)
PR49	4+4	4	46	Morte pela doença
PR50	4+3	3	8	Morte com doença (outra causa)
PR51	5+4	5	104	Morte com doença (outra causa)
PR52	4+4	4	20	Morte pela doença
PR53	4+3	3		Perda de seguimento
PR54	4+3	3		Sem informações no prontuário
PR55	4+3	3		Perda de seguimento
PR56	4+4	4	45	Morte pela doença
PR57	3+4	2		Perda de seguimento
PR58	5+4	5		Sem informações no prontuário
PR59	3+4	2	52	Perda de Seguimento
PR60	4+3	3		Perda de Seguimento
PR61	3+3	1		Perda de Seguimento
PR62	3+4	2		Perda de Seguimento
PR63	3+3	1		Perda de Seguimento
PR64	3+4	2		Perda de Seguimento
PR65	3+4	2	10	Morte pela doença
PR66	4+3	3	155	Perda de seguimento

PR67	4+3	3	43	Morte sem doença
PR68	4+3	3	158	Morte pela doença
PR69	4+4	4	28	Morte pela doença
PR70	3+3	1		Perda de Seguimento
PR71	3+3	1	215	Vivo com doença
PR72	4+3	3		Vivo livre de doença - perda de seguimento em 2008
PR73	3+3	1		Vivo livre de doença - perda de seguimento em 2008
PR74	4+3	3	117	Morte com doença (outra causa)
PR75	4+5	5		Sem informações no prontuário
PR76	5+3	4	60	Morte pela doença
PR77	3+5	4	73	Morte pela doença
PR78	5+4	5		Sem informações no prontuário
PR79	4+3	5	213	Vivo livre de doença
PR80	5+5	5	38	Morte pela doença
PR81	5+4	5	70	Perda de seguimento
PR82	4+4	4	106	Morte pela doença
PR83	3+3	1		Perda de seguimento
PR84	3+3	1		Sem informações no prontuário
PR85	4+5	5		Vivo com doença OS
PR86	4+3	3		Sem informações no prontuário
PR87	4+3	3	173	Vivo com doença
PR88	4+5	5	29	Morte pela doença
PR89	4+3	3		Perda de seguimento
PR90	4+3	3	66	Morte pela doença
PR91	3+3	1		Vivo livre de doença - perda de seguimento
PR92	3+4	2	178	Vivo livre de doença
PR93	3+3	1	45	Morte pela doença
PR94	3+3	1	103	Morte sem doença
PR95	4+3	3	24	Morte pela doença
PR96	3+4	2	148	Morte pela doença
PR98	3+3	1	124	Vivo com doença
PR99	3+3	1		Perda de seguimento
PR100	3+4	2	173	Morte sem doença
PR101	3+4	2		Perda de Seguimento
PR102	3+4	2	46	Morte pela doença
PR103	3+3	1		Perda de Seguimento
PR104	3+3	1	175	Vivo com doença
PR105	3+4	2		Perda de seguimento
PR106	3+3	1		Perda de seguimento
PR107	3+3	1		Perda de seguimento
PR108	4+5	5		Sem informações no prontuário
PR109	3+3	1		Sem informações no prontuário
PR110	3+3	1	141	Vivo com doença
PR111	3+4	2	111	Vivo com doença
PR112	3+3	1	173	Vivo livre de doença
PR113	3+3	1	168	Vivo livre de doença

PR114	4+3	3	163	Vivo livre de doença
PR115	3+3	1		Perda de seguimento
PR116	3+4	2		Perda de seguimento
PR117	3+4	2	177	Vivo livre de doença
PR118	3+3	1	112	Vivo livre de doença
PR119	3+4	2	157	Morte sem doença

5.2) CORRELAÇÕES

De início correlacionamos o grau de Gleason revisado com os resultados obtidos com os diversos marcadores imuno-histoquímicos, e em cada marcador com o tipo de avaliação feita (intensidade, porcentagem de área em várias escalas, escore). Usamos para isso os Teste Qui quadrado ou o Exato de Fisher.

5.2.1) Graduação de Gleason e Ki67 em escala de 3

O Gleason revisado teve correlação com a reação nuclear para Ki67 em escala de 3 (tabela 4), com $p = 0,0169$ (nível de significância com $p < 0,05$). Obtivemos correlação também entre o grau de Gleason revisado e Ki67 em escala de 2, tanto com corte em 15% ($p = 0,04970$) quanto com corte em 10% ($p = 0,0457$).

Tabela 4: Correlação do grau de Gleason (ISUP/OMS 2005) com a imunoexpressão dos marcadores de Ki-67 (teste Qui quadrado).

Gleason		3+3	3+4	4+3	4+4	3+5	5+3	4+5	5+4	5+5	total	Valor de p
Ki67 escala de 3	baixo (0)	25 (89.29 %)	16 (84.21 %)	15 (83.33 %)	15 (78.95 %)	0 (0,0%)	1 (100,0 %)	3 (50.0%)	6 (5.94%)	2 (50.0 %)	79 (78.22%)	perdas 14
	intermediário (1)	3 (10.71 %)	3 (15.79 %)	3 (16.67 %)	2 (10.53 %)	1 (100%)	0 (0,00%)	1 (16.67 %)	1 (20.00 %)	1 (25.0 %)	15 (14.85%)	
	alto (2)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (10.53 %)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (33.33 %)	2 (40.00 %)	1 (25.0 %)	4 (3.96 %)	
	total	28 (27,72 %)	19 (18.81 %)	18 (17.82 %)	19 (18.81 %)	1 (0.99%)	1 (0.99%)	6 (5.94%)	5 (4.95%)	4 (3.96 %)	101 (100.00%)	
Ki67 em escala de 2 com corte em 15%	baixo (0)	25 (89.29 %)	16 (84.21 %)	15 (83.33 %)	15 (78,95 %)	0 (0,0%)	1 (100,00%)	3 (50.00 %)	2 (40.00 %)	2 (50.0 %)	79 (78.22%)	perdas 14
	alto (1)	3 (10.71 %)	3 (15.79 %)	3 (16.67 %)	4 (21,05 %)	1 (100%)	0 (0,00%)	3 (50.00 %)	3 (60.00 %)	2 (50.00 %)	22 (21.78%)	
	total	28 (27,72 %)	19 (18.81 %)	18 (17.82 %)	19 (18.81 %)	1 (0.99%)	1 (0.99%)	6 (5.94%)	5 (4.95%)	4 (3.96 %)	101 (100.00%)	
Ki67 em escala de 2 com corte em 10%	baixo (0)	24 (98.71 %)	14 (73.68 %)	13 (72.22 %)	13 (68.42 %)	0 (0.0%0)	0 (0.0%0)	3 (50.00 %)	1 (20.00 %)	2 (50.0 %)	70 (69.31%)	perdas 14
	alto (1)	4 (14.29 %)	5 (26.32 %)	5 (27.78 %)	6 (31,58 %)	1 (100.0 %)	1 (100.0 %)	3 (50.00 %)	4 (80.00 %)	2 (50.0 %)	31 (30,69%)	
	total	28 (27,72 %)	19 (18.81 %)	18 (17.82 %)	19 (18.81 %)	1 (0.99%)	1 (0.99%)	6 (5.94%)	5 (4.95%)	4 (3.96 %)	101 (100.00%)	

5.2.2) Graduação de Gleason e p53

A graduação de Gleason teve forte correlação apenas com a intensidade da imunoexpressão nuclear de p53 ($p < 0,0001$). Não houve correlação com a porcentagem de células com núcleos corados para p53 em escala de 4 ($p = 0,1183$) nem em escala de 2 ($p = 0,3097$). Os dados estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5: Correlação do grau de Gleason (ISUP/OMS 2005) com a imunoexpressão de p53 (teste Qui quadrado).

Gleason		3+3	3+4	4+3	4+4	3+5	5+3	4+5	5+4	5+5	total	Valor de p
p53 intensidade	negativa(0)	5 (19.23%)	5 (23.81%)	6 (30.00%)	6 (30.00%)	0 (0.00%)	1 (100.00%)	2 (33.33%)	3 (60.00%)	0 (0.00%)	28 (27.18%)	<.0001
	baixa(1)	18 (69.23%)	13 (61.90%)	8(40.00%)	10 (50.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (66.67%)	1 (20.00%)	1 (33.33%)	55 (53.40%)	
	intermediária(2)	3 (11.54%)	3 (14.29%)	6(30.00%)	4 (20.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (20.00%)	0 (0.00%)	17 (16.50%)	
	alta(2)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.00%)	1 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (66.67%)	3 (2.91%)	
	total	26 (25.24%)	21 (20.39%)	20 (20.39%)	20 (19.42%)	1 (0.97%)	1 (0.97%)	6 (5.83%)	5 (4.85%)	3 (2.91%)	103 (100.00%)	
perdas 12												
p53 escala de 4	baixa/negativa(0)	5 (19.23%)	6 (28.57%)	8 (40.0%)	9 (45.0%)	0 (0.0%)	1 (100.00%)	3 (50.0%)	4 (80.0%)	0 (0.0%)	36 (34.95%)	0.1183
	baixa(1)	9 (34.62%)	7 (33.33%)	0 (0.0%)	6 (30.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	22 (21.36%)	
	intermediária(2)	6 (23.08%)	3 (14.29%)	7 (35.0%)	2 (10.0%)	1 (100.00%)	0 (0.0%)	2 (33.33%)	0 (0.0%)	2 (66.67%)	23 (22.33%)	
	alta(2)	6 (23.08%)	5 (23.81%)	5 (25.0%)	3 (15.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (16.67%)	1 (20.0%)	1 (33.33%)	22 (21.36%)	
	total	26 (25.24%)	21 (20.39%)	20 (19.42%)	20 (19.42%)	1 (0.97%)	1 (0.97%)	6 (5.83%)	5 (4.85%)	3 (2.91%)	103 (100.00%)	
perdas 12												
p53 em escala de 2	baixo(0)	10 (38.46%)	10 (47.62%)	8 (40.0%)	12 (60.0%)	0 (0.0%)	1 (100.00%)	3 (50.0%)	4 (80.0%)	0 (0.0%)	48 (46.6%)	0.3097
	alto(1)	16 (61.54%)	11 (52.38%)	12 (60.0%)	8 (40.0%)	1 (100.00%)	0 (0.0%)	3 (50.0%)	1 (20.0%)	3 (100.0%)	55 (53.4%)	
	total	26 (25.24%)	21 (20.39%)	20 (19.42%)	20 (19.42%)	1 (0.97%)	1 (0.97%)	6 (5.83%)	5 (4.85%)	3 (2.91%)	103 (100.00%)	
perdas 12												

5.2.3) Graduação de Gleason e I.A.

O Índice Apoptótico não mostrou correlação com ao grau de Gleason revisado em nenhuma das escalas usadas para interpretação (tabela 6), escala de 3 ($p = 0,9567$), escala de 2 com corte em 10% ($p = 0,8597$) ou escala de 2 com corte em

30% ($p = 0,9067$).

Tabela 6: Correlação do grau de Gleason (ISUP/OMS 2005) com o Índice Apoptótico I.A. obtido através da imunexpressão de caspase-3-ativada (teste Qui quadrado).

Gleason		3+3	3+4	4+3	4+4	3+5	5+3	4+5	5+4	5+5	total	Valor de p
I.A. em escala de 3	baixo (0)	2 (9.52%)	3 (16.67%)	1 (5.56%)	4 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (16.67%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	12 (12.77%)	0.9567
	intermediário (1)	8 (38.1%)	7 (38.89%)	9 (50.0%)	6 (30.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	3 (50.0%)	2 (40.0%)	1 (25.0%)	37 (39.36%)	
	alto (2)	11 (52.38%)	8 (44.44%)	8 (44.44%)	10 (50.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (33.33%)	3 (60.0%)	2 (50.0%)	45 (47.87%)	
	total	21 (22.34%)	18 (19.15%)	18 (19.5%)	20 (21.28%)	1 (1.06%)	1 (1.06%)	6 (6.38%)	5 (5.32%)	4 (4.26%)	94 (100.0%)	
perdas 21												
I.A. em escala de 2 com corte em 10%	baixo (0)	2 (9.09%)	3 (16.67%)	1 (5.56%)	4 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (16.67%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	12 (12.63%)	0.8597
	alto (1)	20 (90.91%)	15 (83.33%)	17 (94.44%)	16 (80.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	5 (83.33%)	5 (100.0%)	3 (75.0%)	83 (87.37%)	
	total	22 (23.16%)	18 (18.95%)	18 (18.95%)	20 (21.05%)	1 (1.05%)	1 (1.05%)	6 (6.32%)	5 (5.26%)	4 (4.21%)	95 (100.0%)	
perdas 20												
I.A. em escala de 2 com corte em 35%	baixo (0)	10 (45.45%)	10 (56.56%)	10 (56.56%)	10 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	4 (66.67%)	2 (40.0%)	2 (50.0%)	49 (51.58%)	0.9067
	alto (1)	12 (54.55%)	8 (44.44%)	8 (44.44%)	10 (50.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (33.33%)	3 (60.0%)	2 (50.0%)	46 (48.42%)	
	total	22 (23.16%)	18 (18.95%)	18 (18.95%)	20 (21.05%)	1 (1.05%)	1 (1.05%)	6 (6.32%)	5 (5.26%)	4 (4.21%)	95 (100.0%)	
perdas 20												

5.2.4) Gradação de Gleason e marcadores de apoptose estudados

Não obtivemos correlação da gradação de Gleason (2005) com SMAC/DIABLO em escala de 4 ($p = 0,1327$), ou escala de 2 ($p = 0,0703$), embora com essa última avaliação houve discreta tendência a correlação (tabela 7). As avaliações de imunexpressão de Survivina em escala de 4 ($p = 0,7634$) ou escala de 2 ($p = 0,7850$) não mostraram correlação com gradação de Gleason (tabela 8). A avaliação da XIAP

foi feita apenas em escala de 2 uma vez que as imunomarcações para essa proteínas restringiram-se a negativas e fracamente positivas (tabela 9). Não houve correlação ($p = 0,8691$).

Tabela 7: Correlação do grau de Gleason (ISUP/OMS 2005) com Smac (teste Qui quadrado).

Gleason		3+3	3+4	4+3	4+4	3+5	5+3	4+5	5+4	5+5	total	Valor de p
SM AC esc ala de 4	baixa/negativa(0)	5 (18.52%)	7 (33.33%)	4 (22.22%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (16.67%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	18 (17.48%)	0.1327
	baixa(1)	15 (55.56%)	7 (33.33%)	6 (33.33%)	7 (35.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (40.0%)	1 (25.0%)	39 (37.86%)	
	intermediária(2)	3 (11.11%)	2 (9.52%)	5 (27.78%)	6 (30.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (16.67%)	2 (40.0%)	0 (0.0%)	20 (19.42%)	
	alta(2)	4 (14.81%)	5 (23.81%)	3 (16.67%)	7 (35.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (66.67%)	1 (20.0%)	2 (50.0%)	26 (25.24%)	
	total	27 (26.22%)	21 (20.39%)	18 (17.48%)	20 (19.42%)	1 (0.97%)	1 (0.97%)	6 (5.83%)	5 (4.85%)	4 (30.88%)	103 (100.0%)	
SM AC em esc ala de 2	baixo(0)	20 (35.09%)	14 (24.5%)	10 (17.54%)	7 (12.28%)	0 (0.0%)	1 (1.75%)	1 (1.75%)	2 (3.51%)	2 (3.51%)	57 (55.34%)	0.0703
	alto(1)	7 (15.22%)	7 (15.22%)	8 (17.39%)	13 (28.26%)	1 (2.17%)	0 (0.0%)	5 (10.87%)	3 (6.52%)	2 (4.35%)	46 (44.66%)	
	total	27 (26.21%)	21 (20.39%)	18 (0.97%)	20 (17.48%)	20 (19.42%)	6 (5.83%)	1 (0.97%)	5 (4.85%)	4 (3.88%)	103 (100.0%)	

Tabela 8: Correlação do grau de Gleason (ISUP/OMS 2005) com Survivina (teste Qui quadrado).

Gleason		3+3	3+4	4+3	4+4	3+5	5+3	4+5	5+4	5+5	total	Valor de p
Survivina escala de 4	baixa/negativa(0)	11 (96.25%)	9 (45.0%)	8 (42.11%)	5 (25.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	3 (50.0%)	3 (60.0%)	3 (75.0%)	43 (41.35%)	0,7634
	baixa(1)	14 (50.0%)	8 (40.0%)	8 (42.11%)	15 (75.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (33.33%)	1 (20.0%)	1 (25.0%)	50 (48,08%)	
	intermediária(2)	3 (10.71%)	3 (15.0%)	2 (10.53%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (16.67%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	10 (9.62%)	
	alta(2)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (5.26%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.96%)	
	total	28 (26.92%)	20 (19,23%)	19 (18.27%)	20 (19.23%)	1 (0.96%)	1 (0.96%)	6 (5.77%)	5 (4.81%)	4 (3.85%)	104 (100.0%)	
Survivina em escala de 2	baixo(0)	25 (24.04%)	17 (16.35%)	16 (15.38%)	20 (21.51%)	1 (0.96%)	1 (0.96%)	5 (4.81%)	4 (3.85%)	4 (3.85%)	93 (89.42%)	0.7850
	alto(1)	3 (2.88%)	3 (2.88%)	3 (2.88%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.96%)	1 (0.96%)	0 (0.0%)	11 (10.58%)	
	total	28 (26.92%)	20 (19,23%)	19 (18.26%)	20 (19,23%)	1 (0.96%)	1 (0.96%)	6 (5.77%)	5 (4.81%)	4 (3.85%)	104 (100.0%)	

Tabela 9: Correlação do grau de Gleason (ISUP/OMS 2005) com XIAP (teste Qui quadrado).

Gleason		3+3	3+4	4+3	4+4	3+5	5+3	4+5	5+4	5+5	total	Valor de p
XIAP em escala de 2	baixo(0)	26 (100.0%)	16 (94.12%)	18 (94.74%)	18 (90.0%)	1 (100.0%)	1 (100.0%)	6 (100.0%)	5 (100.0%)	4 (100.0%)	95 (95.96%)	0.8691
	alto(1)	0 (0.0%)	1 (5.26%)	1 (5.26%)	2 (10.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (4.04%)	
	total	26 (26.26%)	17 (17.17%)	19 (19.19%)	20 (20.20%)	1 (1.01%)	1 (1.01%)	6 (6.06%)	5 (5.05%)	4 (4.04%)	99 (100.0%)	

Procedemos à avaliação de eventuais correlações das variáveis imuno-histoquímicas encontradas com as categorias prognósticas propostas pela ISUP.

5.2.5) Categoria Prognóstica e Ki67

As categorias prognósticas propostas pela ISUP mostraram forte correlação com o índice de proliferação celular com Ki67, sendo em escala de 3 (= 0,0069), ou em escala de 2 com corte em 15% (p = 0,0386). A avaliação com escala de 2 com corte em 10% não mostrou correlação, embora com p próximo ao valor de 0,05 (p =

0,0567) (tabela 10).

Tabela 10: Correlações entre as categorias prognósticas propostas pela ISUP e imunoexpressão de Ki-67 (teste Qui Quadrado).

Categoria Prognóstica		1	2	3	4	5	total	Valor de p
ki-67 em escala de 3	baixa	25 (89.29%)	16 (84.21%)	14 (82.35%)	16 (76.19%)	8 (50.0%)	79 (78.22%)	0.0069
	moderada	3 (15.79%)	3 (15.79%)	3 (17.65%)	3 (14.29%)	3 (18.75%)	15 (14.85%)	
	alta	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (9.52%)	5 (31.25%)	7 (6.93%)	
	total	28 (27.72%)	19 (18.81%)	17 (16.83%)	21 (20.79%)	16 (15.84%)	101 (100.0%)	
perdas 14								
ki-67 em escala de 2 corte em 15%	baixa	25 (89.29%)	16 (84.21%)	14 (82.35%)	16 (76.19%)	8 (50.0%)	79 (78.22%)	0.0386
	alta	3 (10.71%)	3 (15.79%)	3 (17.65%)	5 (23.81%)	8 (50.0%)	22 (21.78%)	
	total	28 (27.72%)	19 (18.81%)	17 (16.83%)	21 (20.79%)	16 (15.84%)	101 (100.0%)	
perdas 14								
ki-67 em escala de 2 com corte em 10%	baixa	24 (85.71%)	14 (73.68%)	12 (70.59%)	13 (61.9%)	7 (43,75%)	70 (69.31%)	0.0567
	alta	4 (14.29%)	5 (26.32%)	5 (29.41%)	8 (38.1%)	9 (56.25%)	31 (30.69%)	
	total	28 (27.72%)	19 (18.81%)	17 (16.83%)	21 (20.79%)	16 (15.84%)	101 (100.0%)	
perdas 14								

5.2.6) Categoria Prognóstica e p53

Não obtivemos correlação da imunoexpressão de p53 com categorias prognósticas de carcinoma prostático em nenhuma das avaliações tentadas (tabelas 11 e 12): intensidade ($p = 0,2016$), escore do p53 ($p = 0,1538$) porcentagem de positividade em escala de 4 ($p = 0,0971$) ou em escala de 2 ($p = 0,6927$).

Tabela 11: Correlações entre as categorias prognósticas propostas pela ISUP e intensidade/escore de imunoexpressão de p53 (teste Qui Quadrado).

Categoria Prognóstica		1	2	3	4	5	total	Valor de <i>p</i>
P53 intensidade	negativa	5 (19.23%)	5 (23.81%)	6 (31.58%)	7 (31.82%)	5 (33.33%)	28 (27.18%)	0.2016
	baixa	18 (69.23%)	13 (61.90%)	7 (36.84%)	10 (45.45%)	7 (46.67%)	55 (53.40%)	
	moderada	3 (11.54%)	3 (14.29%)	6 (31.58%)	4 (18.18%)	1 (6.67%)	17 (16.50%)	
	alta	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (4.55%)	2 (13.33%)	3 (2.91%)	
	total	26 (25.24%)	21 (20.39%)	19 (18.45%)	22 (21.36%)	15 (14.56%)	103 (100.0%)	
P53 escore	0	5 (19.23%)	6 (28.57%)	8 (42.11%)	10 (45.45%)	7 (46.67%)	36 (34.95%)	0.1538
	1	8 (30.77%)	7 (33.33%)	1 (5.26%)	5 (22.73%)	0 (0.00%)	21 (20.39%)	
	2	7 (26.92%)	2 (9.52%)	3 (15.79%)	3 (13.64%)	4 (26.67%)	19 (18.45%)	
	3	4 (15.38%)	3 (14.29%)	1 (5.26%)	1 (4.55%)	2 (13.33%)	11 (10.68%)	
	4	0 (0.00%)	1 (4.76%)	2 (10.53%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (2.91%)	
	6	2 (7.69%)	2 (9.52%)	4 (21.05%)	3 (13.64%)	1 (6.67%)	12 (11.65%)	
	9	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (6.67%)	1 (0.97%)	
	total	26 (25.24%)	21 (20.39%)	19 (18.45%)	22 (21.36%)	15 (14.56%)	103 (100.0%)	

Tabela 12: Correlações entre as categorias prognósticas propostas pela ISUP e porcentagem de células com imunexpressão de p53 (teste Qui Quadrado).

Categoria Prognóstica		1	2	3	4	5	total	Valor de <i>p</i>
P53 em escala de 4	negativa/baixa	5 (19.23%)	6 (28.57%)	8 (42.11%)	10 (45.45%)	7 (46.67%)	36 (34.955)	0.0971
	baixa	9 (34.62%)	7 (33.33%)	0 (0.00%)	6 (27.27%)	0 (0.00%)	22 (21.36%)	
	moderada	6 (23.08%)	3 (14.29%)	6 (31.58%)	3 (13.64%)	5 (33.33%)	23 (22.33%)	
	alta	6 (23.08%)	5 (23.81%)	5 (26.32%)	3 (13.64%)	3 (20.00%)	22 (21.36%)	
	total	26 (25.24%)	21 (20.39%)	19 (18.45%)	22 (21.36%)	15 (14.56%)	103 (100.0%)	Perdas 12
P53 em escala de 2 corte em 15%	baixa	10 (38.46%)	10 (47.62%)	8 (42.11%)	13 (59.09%)	7 (46.67%)	48 (46.60%)	0.6927
	alta	16 (61.54%)	11 (52.38%)	11 (57.89%)	9 (40.91%)	8 (53.33%)	55 (53.40%)	
	total	26 (25.24%)	21 (20.39%)	19 (18.45%)	22 (21.36%)	15 (14.56%)	103 (100.0%)	Perdas 12

5.2.7) Categoria Prognóstica e I.A.

O I.A. não mostrou correlação com as categorias prognósticas (tabela 13), tendo sido avaliadas em escala de 3 ($p = 0,9662$), escala de 2 com corte em 10% ($p = 0,7667$) ou escala de 2 com corte em 35% ($p = 0,9610$).

Tabela 13: Correlações entre as categorias prognósticas propostas pela ISUP e o Índice Apoptótico (I.A.) obtido através da imunexpressão de caspase-3-clivada (teste Qui Quadrado).

Categoria Prognóstica		1	2	3	4	5	total	Valor de p
I.A. em escala de 3	baixa	2 (9.52%)	3 (16.67%)	1 (5.88%)	4 (18.18%)	2 (12.50%)	12 (12.77%)	0.9662
	moderada	8 (38.10%)	7 (38.89%)	8 (47.06%)	7 (31.82%)	7 (43.75%)	37 (39.36%)	
	alta	11 (52.38%)	8 (44.44%)	8 (47.06%)	11 (50.0%)	7 (43.75%)	45 (47.87%)	
	total	21 (22.34%)	18 (19.15%)	17 (18.09%)	22 (23.40%)	16 (17.02%)	94 (100.0%)	
								perdas 21
I.A. em escala de 2 corte em 10%	baixa	2 (9.09%)	3 (16.67%)	1 (5.88%)	4 (18.18%)	2 (12.50%)	12 (12.63%)	0.7667
	alta	20 (90.91%)	15 (83.33%)	16 (94.12%)	18 (81.82%)	4 (87.50%)	83 (87.37%)	
	total	22 (23.16%)	18 (18.95)	17 (17.89%)	22 (23.16%)	16 (16.84%)	95 (100.0%)	
								perdas 20
ki-67 em escala de 2 com corte em 35%	baixa	10 (45.45%)	10 (55.56%)	9 (52.94%)	11 (50.0%)	9 (56.25%)	49 (51.58%)	0.9610
	alta	12 (54.55%)	8 (44.44%)	8 (47.06%)	11 (50.0%)	7 (43.75%)	46 (48.42%)	
	total	22 (26.16%)	18 (18.95%)	17 (17.89%)	22 (23.16%)	16 (16.84%)	95 (100.0%)	
								perdas 20

5.2.8) Categoria Prognóstica e Marcadores de apoptose estudados

A imunexpressão de SMAC em escala de 2 mostrou correlação positiva com a categorização prognóstica proposta pela ISUP ($p = 0,0367$). Porém a avaliação de SMAC na escala de 4 não teve esta correlação ($p = 0,0753$) (tabela 14), embora com discreta tendência a correlação. A imunexpressão de Survivina em escala de 4 ($p = 0,2146$) e escala de 2 ($p = 0,4159$) não mostraram correlação com as categorias prognósticas (tabela 15), assim como a imunexpressão de XIAP ($p = 0,4823$) (tabela 16).

Tabela 15: Correlações entre as categorias prognósticas propostas pela ISUP e porcentagem de células com imunexpressão de Survivina (teste Qui Quadrado).

Categoria Prognóstica		1	2	3	4	5	total	Valor de <i>p</i>
Survivina em escala de 4	negativa/baixa	11 (39.29%)	9 (45.00%)	7 (38.89%)	6 (27.27%)	10 (62.50%)	43 (41.35%)	0.2146
	baixa	14 (50.00%)	8 (40.00%)	8 (44.44%)	16 (72.73%)	4 (25.00%)	50 (48.08%)	
	moderada	3 (10.71%)	3 (15.00%)	2 (11.11%)	0 (0.00%)	2 (12.50%)	10 (9.62%)	
	alta	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (5.56%)	0.00%	0 (0.00%)	1 (0.96%)	
	total	28 (26.92%)	20 (19.23%)	18 (17.31%)	22 (21.15%)	16 (15.38%)	104 (100.0%)	
								Perdas 11
Survivina em escala de 2 corte em 15%	baixa	25 (24.04%)	17 (16.35%)	15 (14.42%)	22 (21.15%)	14 (13.46%)	93 (89.42%)	0.4359
	alta	3 (27.27%)	3 (27.27%)	3 (27.27%)	0 (0.00%)	2 (18.18%)	11 (10.58%)	
	total	28 (26.92%)	20 (19.23%)	18 (17.31%)	22 (21.15%)	16 (15.38%)	104 (100.0%)	
								Perdas 11

Tabela 16: Correlações entre as categorias prognósticas propostas pela ISUP e porcentagem de células com imunexpressão de XIAP (teste Qui Quadrado).

Categoria Prognóstica		1	2	3	4	5	total	Valor de <i>p</i>
XIAP em escala de 2	negativa/baixa	26 (100.0%)	16 (94.12%)	17 (94.44%)	20 (90.91%)	16 (100.0%)	95 (95.96%)	0.4823
	baixa	0 (0.00%)	1 (5.88%)	1 (5.56%)	2 (9.09%)	0 (0.00%)	4 (4.04%)	
	moderada							
	alta							
	total	26 (26.26%)	17 (17.17%)	18 (18.18%)	22 (22.22%)	16 (16.16%)	99 (100.00%)	Perdas 16

5.2.9) Correlações entre os marcadores

Para correlacionar os marcadores imuno-histoquímicos entre si, escolhemos dentro das avaliações as de Ki67 e p53, aquelas com melhor correlação com grau de Gleason ou com as categorias prognósticas. A avaliação de Ki67 em escala de 2 com corte em 15% mostrou discreta tendência a correlação com a intensidade de p53 ($p = 0,0703$), assim como o I.A. em escala de 3 e SMAC em escala de 4 ($p = 0,0654$), e I.A. em escala de 3 com Survivina em escala de 4 ($p = 0,0564$). Porém todas as demais avaliações não obtiveram nenhuma correlação ou sequer tendência a correlação.

5.2.10) Sobrevida e Marcadores estudados.

Devido à grande perda de seguimento e de falta de informação em prontuários, somente o ki67 demonstrou correlação com a sobrevida dos pacientes. A curva de Kaplan-Meier demonstrou maior tempo de sobrevida em pacientes nos grupos com baixo índice de proliferação celular, em relação aos que exibiram elevado índice proliferativo (gráfico 2).

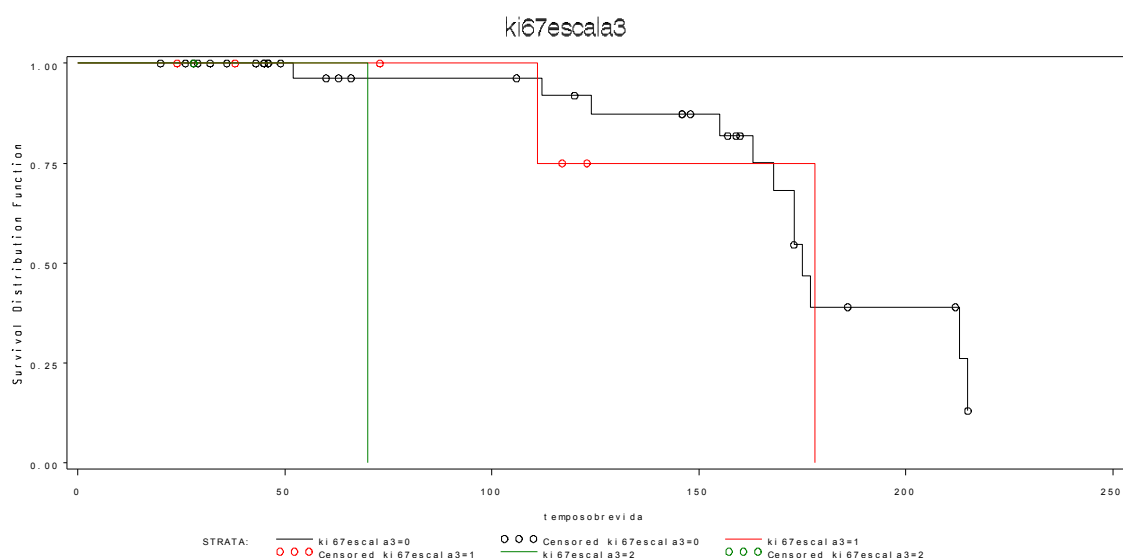


Gráfico 2: Curva de Kaplan-Meier correlacionando o tempo de sobrevida em meses com o índice de proliferação celular, medido através da imunomarcção para ki67.

5.2.11) Sobrevida e grau de diferenciação

Quando comparamos o tempo de sobrevida, em meses, com o grau de diferenciação das neoplasias utilizando tanto as Categorias Prognósticas quanto a classificação de Gleason, notamos que há maior sobrevida em pacientes com neoplasias bem diferenciadas, enquanto esta é menor nos carcinomas pouco diferenciados. Os gráficos 3 e 4 demonstram, através das curvas de Kaplan-Meier, esta correlação com as Categorias Prognósticas e classificação de Gleason, respectivamente.

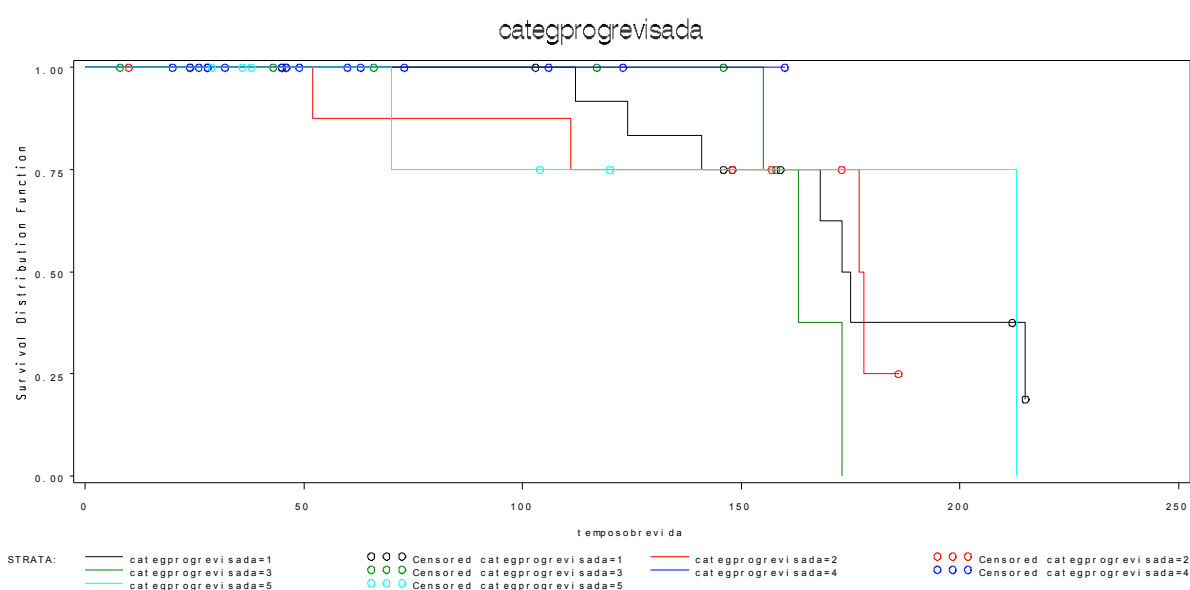


Gráfico 3: Curva de Kaplan-Meier correlacionando o tempo de sobrevida, em meses, com as Categorias Prognósticas.

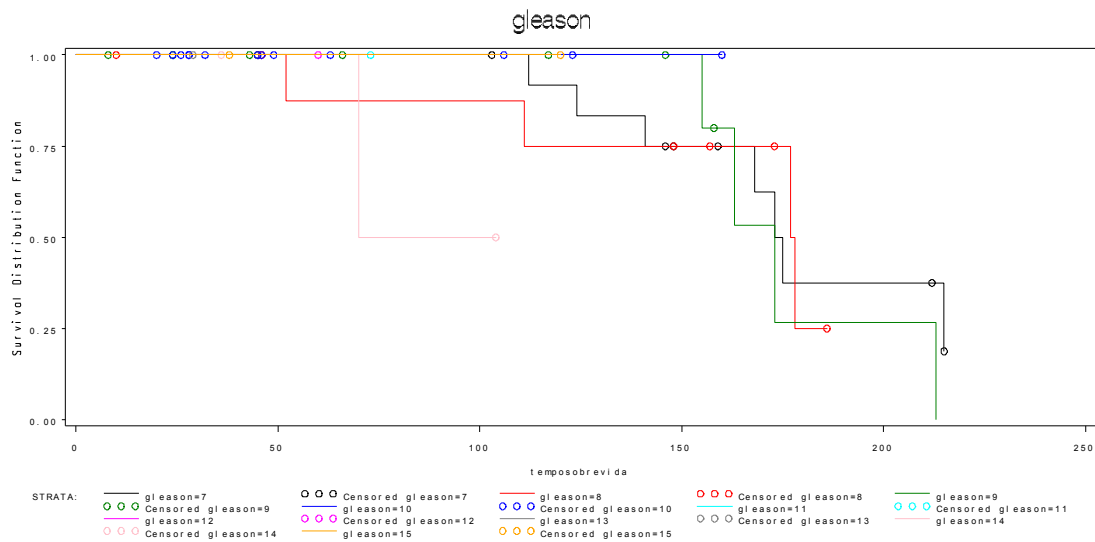


Gráfico 4: Curva de Kaplan-Meier correlacionando o tempo de sobrevivência, em meses, com a classificação de Gleason. Nota: Gleason 7, na legenda acima, refere-se à graduação 3+3; Gleason 8 refere-se à graduação 3+4; Gleason 9 refere-se à graduação 4+3; Gleason 10 refere-se à graduação 4+4; Gleason 11 refere-se à graduação 3+5; Gleason 12 refere-se à graduação 5+3; Gleason 13 refere-se à graduação 4+5; Gleason 14 refere-se à graduação 5+4 e Gleason 15 refere-se à graduação 5+5.

6) DISCUSSÃO

Ao comparar o índice de proliferação celular, através do imuno-marcador ki67, com os graus de Gleason revisados, observou-se que neoplasias mais agressivas e, portanto, com maior Gleason, exibem elevado índice proliferativo. O mesmo pôde ser concluído utilizando-se as categorias prognósticas propostas pela ISUP, onde maiores índices proliferativos foram evidenciados nas categorias mais elevadas. Os achados são concordantes com a literatura, onde estudos mostram que maior índice de proliferação celular está relacionado a maior Gleason, além de maior mortalidade e presença de metástases à distância^{45,46,47}.

Notamos, também, relação entre o ki67 e o tempo de sobrevida dos pacientes, onde os casos com maior porcentagem de núcleos positivos para o imuno-marcador mostraram menor tempo de sobrevida em meses. Neoplasias com maior ki67 são, portanto, mais agressivas, piorando a taxa de sobrevivência dos pacientes. Estes achados são concordantes com a literatura, que demonstra piores fatores prognósticos em pacientes com maior ki67⁴⁴⁻⁴⁷.

Neoplasias classificadas como mais agressivas, utilizando-se a graduação de Gleason, demonstraram maior intensidade de positividade para p53. Soma-se ainda o fato de haver tendência de correlação entre o índice de proliferação celular e o grau de positividade para p53. Se utilizadas as categorias prognósticas para classificação, esta correlação não ocorre. Notamos, também, que a maioria dos casos exibe algum grau de positividade para a proteína p53. Com a função de impedir a proliferação celular ao detectar danos ao DNA, esta proteína tem capacidade de deflagrar o processo apoptótico através da permeabilização da parede mitocondrial e liberação do citocromo c, iniciando a via intrínseca da apoptose. Em neoplasias mais agressivas e, consequentemente, com maior quantidade de danos sucessivos ao DNA, há acúmulo de p53 como tentativa de reparo. Por este motivo, em neoplasias com Gleason mais elevados, observamos maior intensidade de imunomarcagem para esta proteína⁹⁻¹⁰. Bansal, Gupta e Saxena obtiveram resultado semelhante ao realizar estudo imuno-histoquímico para proteína p53 e observar reações fracamente positivas em neoplasias com Gleason baixo, além de reações fortemente positivas em neoplasias com Gleason elevado⁵⁴.

Por outro lado, ao contrário do esperado, e dos achados na literatura, as imunomarcações para XIAP foram consistentemente negativas^{11,24,56,58}. Este achado pode, talvez, explicar a presença de apoptose em grande parte dos casos analisados,

mesmo que em pequena quantidade. A XIAP foi amplamente estudada em diversas neoplasias, sendo que sua expressão aumentada foi evidenciada em carcinomas prostáticos^{13-15,20,23,24}. Esperávamos, portanto, encontrar reações positivas em grande parte dos casos, principalmente nas neoplasias mais agressivas. Obtivemos, no entanto, predomínio de casos negativos. Em carcinomas prostáticos metastáticos, observa-se aumento da expressão de XIAP nas células que se desprendem da neoplasia primária⁵⁵. Em nossa casuística, dois pacientes apresentaram metástase óssea, porém o XIAP mostrou-se negativo em suas biópsias.

Outro inibidor da apoptose que mostrou-se persistentemente negativo foi a Survivina, contrariando achados da literatura^{29,58}. Krajewska demonstrou, através de estudo imuno-histoquímico e imunoblotting, elevação dos níveis de cIAP-1, cIAP-2, XIAP e Survivina em carcinomas prostáticos tanto em homens quanto em ratos, mesmo em neoplasias intra-epiteliais prostáticas, sugerindo que a desregulação dos IAPs seria um evento precoce na sua patogênese⁵⁶.

Notamos ainda grande parte dos casos com positividade, independentemente da intensidade, para SMAC/DIABLO. Por se tratar de um inibidor das IAPs, esperávamos poucos casos positivos, o que indicaria que os inibidores da apoptose estariam livres para exercer sua ação, impedindo a morte das células neoplásicas por este processo. Em neoplasias menos agressivas, a ação da SMAC/DIABLO permitiria que mais células entrassem em apoptose, retardando, desta maneira, o crescimento tumoral⁵¹. Apesar disso, houve relação entre as categorias prognósticas e a positividade para este marcador, onde as categorias de pior prognóstico exibiram maior frequência de casos positivos.

Ao analisar os resultados das reações para Survivina, SMAC/DIABLO e XIAP esperávamos o oposto do obtido. Como o mecanismo de ação da survivina se dá, principalmente, pela ubiquitinação de SMAC/DIABLO marcando-a para degradação e liberando, desta forma, a XIAP para exercer sua função, prevíamos poucos casos positivos para SMAC/DIABLO e muitos positivos para Survivina e XIAP^{23,29,32,33}.

Não houve relação entre o índice apoptótico e o grau de diferenciação das neoplasias estudadas, independentemente do método utilizado para classificação. Há estudo semelhante na literatura, onde o índice apoptótico obtido através da contagem de corpos apoptóticos por software especializado também não se correlacionou com a graduação histológica pelo sistema de Gleason⁵⁴. Observamos, no entanto, grande quantidade de casos positivos para caspase 3 clivada, mostrando portanto que a

apoptose é um importante mecanismo de defesa contra proliferação de células neoplásicas no organismo.

Os dados de sobrevida, devido à escassez de informações recentes nos prontuários analisados, não exibiram correlação com os marcadores imuno-histoquímicos estudados.

Ao comparar os resultados obtidos utilizando a graduação das neoplasias pelo sistema de Gleason e pelas Categorias Prognósticas, observamos que ambas demonstraram correlações imuno-histoquímica semelhantes. Desta forma, notamos a potencial vantagem de se utilizar esta classificação, de mais fácil aplicação na rotina dos patologistas, assim como de melhor entendimento entre a comunidade médica geral e para os próprios pacientes.

7) CONCLUSÕES

Não houve correlação entre o índice apoptótico ou inibidores de apoptose e o grau de diferenciação do adenocarcinoma prostático, independentemente do método utilizado para sua graduação histológica (Gleason ou Categorias Prognósticas).

Observamos correlação entre a porcentagem de células com núcleos positivos para o marcador imuno-histoquímico ki67 e o tempo de sobrevida dos pacientes, sendo este menor nos casos com maior porcentagem de positividade, e maior nos casos com porcentagem baixa.

A intensidade de expressão da proteína p53 revelou-se fortemente correlacionada com o grau histológico de Gleason, estando mais fortemente positiva nos casos menos diferenciados.

O índice de proliferação celular, avaliado através da imunomarcção para Ki67, também esteve correlacionado com a diferenciação das neoplasias, sendo este maior em casos pouco diferenciados. Este achado é verdadeiro utilizando-se tanto a graduação histológica através das Categorias Prognósticas quanto a escala de Gleason.

A falta de seguimento dos pacientes, ou de relatos em seus prontuários após tratamento cirúrgico para carcinoma de próstata, impediu a correlação dos dados com a sua sobrevida dos mesmos. É necessário estimular o acompanhamento a longo prazo destes pacientes no Hospital das Clínicas da UNESP de Botucatu, para que futuras pesquisas possam desfrutar destas informações em seus resultados.

As categorias prognósticas propostas pelo ISUP mostram-se relacionadas com o grau de diferenciação das neoplasias avaliado, indiretamente, através de marcadores imuno-histoquímicos. Desta forma, sua utilização é promissora, sendo um sistema de fácil aplicação e entendimento.

8) BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *Cancer J Clin*. 2009; 59(4):225-49.
2. Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Rio de Janeiro: INCA. 2014. Estimativa 2014- Incidência de câncer no Brasil. [cited 2015Jan 05]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2015 Jan 1;65(1):5–29.
4. Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Rio de Janeiro: INCA. 2014. Registro de Base Populacional completo. [cited 2015 Jan 05]. Available from: http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/docs/Comentarios/Parte466_registro_de_base_populacional_completo.pdf
5. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-776.
6. De Oliveira Lima F, De Oliveira Costa H, Barrezueta LF, Fujiyama Oshima CT, Silva JA Jr, Gomes TS, Pinheiro N Jr, Neto RA, Franco M. Immunoexpression of inhibitors of apoptosis proteins and their antagonist SMAC/DIABLO in colorectal carcinoma: correlation with apoptotic index, cellular proliferation and prognosis. *Oncol Rep*. 2009 Aug;22(2):295-303. PubMed PMID: 19578769.
7. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):32-43.
8. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2005 Nov;5(11):876–85.
9. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-6. Review. PubMed PMID: 11048727.
10. Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in Cell Biology*. 2010 Jan;20(1):14–24.

11. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *OncoTargets and therapy*. 2013;6:1285–304.
12. Witt A, Seeger JM, Coutelle O, Zigrino P, Broxtermann P, Andree M, et al. IAP antagonization promotes inflammatory destruction of vascular endothelium. *EMBO reports*. 2015 Mar 30;16(6):719–27.
13. Mo L. Novel role of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in bladder cancer cell invasion and prediction of disease progression [Internet]. ASCO Annual Meeting; 2014 [cited 2015 Jan 3]. Available from: <http://meetinglibrary.asco.org/content/127686-144>
14. Foster F, Owens T, Tanianis-Hughes J, Clarke R, Brennan K, Bundred N, et al. Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2009;11(3):R41.
15. Nakano Y, et al. Molecular targeting of Bcl-2 overcomes prostate cancer cell adaptation to XIAP gene downregulation in Prostate Cancer and Prostatic Diseases 2009;12, 34–40; doi:10.1038/pcan.2008.27; published online 13 May 2008.
16. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *OncoTargets and therapy*. 2013;6:1285–304.
17. Callus BA, Vaux DL. Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):73-8.
18. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999 Feb 1;13(3):239-52.
19. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):32-43.
20. Kim EH, Kim HS, Kim SU, Noh EJ, Lee JS, Choi KS. Sodium butyrate sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis through inhibition of Cdc2 and the subsequent downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene*. 2005 Oct 20;24(46):6877-89.

21. Vogler M, Durr K, Jovanovic M, Debatin KM, Fulda S. Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells. *Oncogene*. 2007 Jan 11;26(2):248-57.
22. Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ. Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ*. 2006 Feb;13(2):179-88.
23. Lunardi A, Ala U, Epping MT, Salmena L, Clohessy JG, Webster KA, et al. A co-clinical approach identifies mechanisms and potential therapies for androgen deprivation resistance in prostate cancer. *Nature genetics*. 2013 Jul;45(7):747–55.
24. Amantana A, London CA, Iversen PL, Devi GR. X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2004 Jun;3(6):699-707. PubMed PMID: 15210856.
25. Danquah M, Duke C III, Patil R, Miller D, Mahato R. Combination Therapy of Antiandrogen and XIAP Inhibitor for Treating Advanced Prostate Cancer. *Pharm Res*. 2012 Aug 1;29(8):2079–91.
26. Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, Pinilla C, Hoffman RM, Reed JC, et al. Increased Expression of Apoptosis Inhibitor Protein XIAP Contributes to Anoikis Resistance of Circulating Human Prostate Cancer Metastasis Precursor Cells. *Cancer Research*. 2005 Mar 15;65(6):2378–86.
27. Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8568-80.
28. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999 Feb 1;13(3):239-52.
29. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003 Nov 24;22(53):8581-9.
30. Barnes N, Haywood P, Flint P, Knox WF, Bundred NJ. Survivin expression in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. *Br J Cancer*. 2006 Jan 30;94(2):253-8.

31. Bacinski M. Morte Celular In: J F CeR, editor. *Oncologia Molecular*. ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 135-49.
32. Stucki JW, Simon HU. Mathematical modeling of the regulation of caspase-3 activation and degradation. *J Theor Biol*. 2005 May 7;234(1):123-31.
33. Verhagen AM, Kratina TK, Hawkins CJ, Silke J, Ekert PG, Vaux DL. Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ*. 2007 Feb;14(2):348-57.
34. Bommareddy A, Lockus L, Seward J, Eggelston W, Prelewicz S, Antal A, et al. Akt/survivin pathway inhibition synergizes the apoptotic cell death induced by A-santalol in prostate cancer cells. *Cancer Research*. 2014 Oct 1;74(19 Supplement):2152–2152.
35. Kaur M, Agarwal C, Singh RP, Guan X, Dwivedi C, Agarwal R. Skin cancer chemopreventive agent, {alpha}-santalol, induces apoptotic death of human epidermoid carcinoma A431 cells via caspase activation together with dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Carcinogenesis*. 2005 Feb;26(2):369-80. Epub 2004 Nov 4. PubMed PMID: 15528219.
36. McNeish IA, Lopes R, Bell SJ, McKay TR, Fernandez M, Lockley M, et al. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Exp Cell Res*. 2005 Jan 1;302(1):69-82.
37. Wang M, Huang T, Zeng F, Jiang G, Wang L, Zheng L, et al. Effect of Smac on TRAIL-induced apoptosis of prostate cancer cell line PC-3 and the molecular mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]*. 2012 Apr 1;32(2):233–6.
38. Bai L, Smith DC, Wang S. Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacol Ther*. 2014 Oct;144(1):82-95. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.05.007. Epub 2014 May 16. Review. PubMed PMID: 24841289; PubMed Central PMCID: PMC4247261.
39. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, v. 351, p. 453-456, 1991.
40. Arruda JT, Bordin BM, Miranda LCB, Maia DLM, Moura KKVO. Proteína p53 e o câncer: controvérsias e esperanças. *Estudos* 2008 Jan;35:123–41.

41. Thomas DJ, Robinson M, King P, Hasan T, Charlton R, Martin J, et al. p53 Expression and Clinical Outcome in Prostate Cancer. *British Journal of Urology*. 1993 Nov 1;72(5):778–81.
42. Scherr DS, Vaughan Jr ED, Wei J, Chung M, Felsen D, Allbright R, et al. Bcl-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *The Journal of Urology*. 1999 Jul;162(1):12–7.
- 43 Dabbs DJ. *Diagnostic immunohistochemistry*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002
44. Silva-Filho AL, Bruno BN, Silva LB, Tralman P, Castro e Silva JG, Triginelli SA. Associação entre a expressão das proteínas p53 e Ki-67 e os achados clínico-patológicos em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005; 27(5): 243-7
- 45 Pollack A, DeSilvio M, Khor LY, Li R, Al-Saleem TI, Hammond ME, Venkatesan V, Lawton CA, Roach M 3rd, Shipley WU, Hanks GE, Sandler HM. Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 1;22(11):2133-40. PubMed PMID: 15169799.
46. Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Schmid HP, Gasser TC, Jordan P, Mihatsch MJ. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Pathol*. 1996 Apr;178(4):437-41. PubMed PMID: 8691323.
47. Bubendorf L, Tapia C, Gasser TC, Casella R, Grunder B, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G. Ki67 labeling index in core needle biopsies independently predicts tumor-specific survival in prostate cancer. *Hum Pathol*. 1998 Sep;29(9):949-54. PubMed PMID: 9744310.
48. Kallioniemi et al. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, v. 10, n. 7, p. 657-62, 2001.
49. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest*, v. 55, n. 2, p. 244-8, 1986.

50. Battifora H.; Mehta P. The checkerboard tissue block. An improved multitissue control block. *LabInvest*, v. 63, n. 5, p. 722-4, 1990.
51. Milanes-Yearsley et al. Tissue microarray: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol*, v. 15, n. 12, p. 1366-73, 2002.
52. Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press: Lyon 2004
53. Humphrey P, Epstein J, Amin M, Delahunt B, Egevad L, Srigley J. The 2014 Grading Consensus Organizing Committee [e-mail]. 06 de janeiro, 2015.
54. Bansal, A., Gupta, A., & Saxena, S. (2015). Correlation of p53 immunoexpression with DNA ploidy and apoptotic index in subsets of prostate cancer: A marker reiterated in progression and recurrence of prostate cancer. *South Asian Journal of Cancer*, 4(2), 88–90. doi:10.4103/2278-330X.155693
55. Wang M, Huang T, Zeng F, Jiang G, Wang L, Zheng L, et al. Effect of Smac on TRAIL-induced apoptosis of prostate cancer cell line PC-3 and the molecular mechanism. *J HuazhongUnivSciTechnol [Med Sci]*. 2012 Apr 1;32(2):233–6.
56. Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Huang X, Turner B, Bubendorf L, et al. Elevated Expression of Inhibitor of Apoptosis Proteins in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2003 Oct 15;9(13):4914–25.
57. Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, Pinilla C, Hoffman RM, Reed JC, et al. Increased Expression of Apoptosis Inhibitor Protein XIAP Contributes to Anoikis Resistance of Circulating Human Prostate Cancer Metastasis Precursor Cells. *Cancer Research*. 2005 Mar 15;65(6):2378–86.
58. Watson RW, Fitzpatrick JM. Targeting apoptosis in prostate cancer: focus on caspases and inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int*. 2005 Dec;96 Suppl 2:30-4. Review. PubMed PMID: 16359436.