

**VALOR PREDITIVO DE MARCADORES DE TRANSIÇÃO
EPITELIAL-MESENQUIMATOSA, PTEN, ERG, KI67 E DE
ESTUDO GENÉTICO NA RECORRÊNCIA BIOQUÍMICA DE
CARCINOMA DA PRÓSTATA TRATADO COM CIRURGIA**

NUNO JOÃO SANTOS SINEIRO DE OLIVEIRA VAU

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina na Especialidade de
Genética, Oncologia e Toxicologia (Oncologia)**

na NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas

Setembro, 2018

**VALOR PREDITIVO DE MARCADORES DE TRANSIÇÃO
EPITELIAL-MESENQUIMATOSA, PTEN, ERG, KI67 E DE
ESTUDO GENÉTICO NA RECORRÊNCIA BIOQUÍMICA DE
CARCINOMA DA PRÓSTATA TRATADO COM CIRURGIA**

Nuno João Santos Sineiro de Oliveira Vau

Orientador: Professor Doutor António Lopez-Beltran

Co-orientador: Professor Doutor António Parreira

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina na Especialidade de
Genética, Oncologia e Toxicologia (Oncologia)**

Setembro, 2018

RESUMO

Valor Preditivo de Marcadores de Transição Epitelial-Mesenquimatosa, PTEN, ERG, Ki67 e de Estudo Genético na Recorrência Bioquímica de Carcinoma da Próstata tratado com cirurgia

Introdução: O carcinoma da próstata apresenta uma elevada incidência e prevalência. A maioria dos carcinomas da próstata localizados são curáveis, com as opções terapêuticas disponíveis. Contudo, a recorrência da doença está associada a morbidade, a mortalidade e a custos elevados. Como tal, é importante otimizar o tratamento da doença localizada. Uma das possibilidades para o fazer, passa por uma melhoria do nosso conhecimento, acerca dos factores preditivos. Um reconhecimento precoce de uma maior probabilidade de recorrência poderia levar a uma otimização da abordagem terapêutica dos tumores primários, nomeadamente através de estratégias que incluam intensificação terapêutica.

Material e Métodos: Numa amostra populacional constituída por doentes, com carcinoma da próstata localizado, e tratados com prostatectomia radical de intuito curativo, avaliámos o valor preditivo de factores clínicos, anatomopatológicos, imunohistoquímicos e genéticos. Utilizámos como “endpoint” a recorrência bioquímica (RBQ).

Resultados: Em 147 doentes, e após um seguimento, cuja mediana foi de 20 meses (4-55 meses), ocorreu RBQ em 15,6% dos casos. Na nossa amostra, o PSA pré-operatório ($p=0,02$); o tipo de cirurgia ($p=0,01$); o score de Gleason da biópsia ($p=0,004$) e da lesão índice ($P<0,001$); a classificação de Epstein da biópsia ($p=0,005$), da peça ($p=0,006$), e da lesão índice ($p<0,001$); o número de fragmentos de biópsia envolvidos por tumor ($p=0,05$), a extensão do envolvimento tumoral nos fragmentos de biópsia, em milímetros ($p=0,01$) e percentualmente ($p=0,02$); a existência de áreas de diferenciação intraductal ($p=0,003$); a presença de padrão de terciário ($p<0,001$); a dimensão linear da lesão índice ($p=0,005$); a existência de margem cirúrgica positiva ($p=0,05$); a existência de extensão extraprostática ($p=0,02$); a invasão vascular ($p=0,002$); a invasão das vesículas seminais ($p=0,01$); o número de gânglios isolados em doentes submetidos a linfadenectomia ($p=0,01$); o estágio patológico referente ao tumor primário ($p=0,02$) e a perda de expressão da caderina E ($p<0,001$), mostraram significância estatística relativamente à ocorrência de recorrência bioquímica. Por análise multivariável, apenas a existência de áreas de diferenciação intraductal ($p=0,01$), a classificação de Epstein da lesão índice ($p<0,001$), a invasão vascular ($p=0,02$) e o número de gânglios isolados em doentes submetidos a linfadenectomia ($p=0,05$), mantiveram a significância estatística, após ajuste para as outras variáveis. Os restantes biomarcadores associados à transição epitelial-mesenquimatosa (caderina N e vimentina), o PTEN, o Ki-67 e o ERG, na nossa amostra, e por análise univariável, não estão associados à ocorrência de RBQ. A expressão de SChLAP1, quer em tecido tumoral, quer em tecido não tumoral, também não está associado à ocorrência de RBQ.

Conclusões: O nosso trabalho confirma, na nossa população, o interesse preditivo de factores clínicos e anatomopatológicos normalmente associados a um comportamento biológico mais agressivo. Também sugere o interesse preditivo de

alguns factores anatomopatológicos menos estudados. Por fim aponta para a possibilidade, de associação entre o fenómeno de transição epitelial e a ocorrência de RBQ.

Palavras-chave: Carcinoma da próstata; prostatectomia radical; factor predictivo; classificação de Epstein; lesão Índice; carcinoma intraductal; invasão vascular; numero de gânglios linfáticos; caderina E.

ABSTRACT

Predictive value of epithelial-mesenchymal transition markers, PTEN, ERG, Ki67, and genetic analysis in biochemical recurrence of prostate cancer treated with surgery

Introduction: Prostate cancer is a contemporary health issue. It has a very high incidence and prevalence. The majority of patients with localized disease are cured with current standard therapeutic options. Nevertheless, disease recurrence is associated with morbidity, mortality and significant costs. It is, therefore, important to optimize therapeutic efficacy. One of the possibilities to achieve it, is through better understanding of predictive factors. Pinpointing in advance, the cases with worse prognosis, could allow a therapeutic adjustment, by adding adjuvant treatment.

Methods: In a clinical cohort study, we evaluated the predictive impact of several clinical, pathological and molecular factors in the development of biochemical recurrence (BCR), in patients with localized prostate cancer treated with radical prostatectomy.

Results: A total of 147 patients were included in our study. The median follow-up time was 20 months. BCR occurred in 15.6% of the patients. In univariate analysis, pre-operative PSA ($p=0.02$); the type of surgery ($p=0.01$); the Gleason score both in biopsy ($p=0.004$) and in the index lesion ($p<0.001$); the Epstein grading system in the biopsy ($p=0.005$), in the entire tumor ($p=0.006$), and in the index lesion ($p<0.001$); the number of positive cores in the biopsy ($p=0.05$), the maximum length of cancer in any one biopsy core ($p=0.01$) and the greatest percentage of cancer in any biopsy core ($p=0.02$); the presence of intraductal differentiation in the prostatic specimen ($p=0.003$); the presence of a minor high-grade pattern ($p<0.001$); the index lesion dimension ($p=0.005$); positive surgical margin ($p=0.05$); the existence of extra prostatic extension ($p=0.02$); vascular invasion ($p=0.002$); seminal vesicle invasion ($p=0.01$); the total number of lymph nodes retrieved in patients submitted to lymphadenectomy ($p=0.01$); T stage ($p=0.02$) and loss of E-Cadherine, were all predictive factors for BCR. In multivariate analysis, only the presence of intraductal differentiation ($p=0.01$), Epstein grading system in the index lesion ($p<0.001$), vascular invasion ($p=0.02$) and the total number of lymph nodes ($p=0.05$) remained independently predictive of BCR. The remaining epithelial-mesenchymal transition markers (N-Cadherine and Vimentine), PTEN, Ki-67 and ERG, were not predictive factors for BCR. Neither was SChLAP1 expression, both in tumoral and non-tumoral tissue.

Conclusions: Our study, in this population, confirms the predictive impact of many well-established predictive factors. It also implies, that other less known pathological factors might also have predictive importance. Finally, it suggest the existence of a link between epithelial-mesenchymal transition and BCR.

Keywords: Prostate cancer; radical prostatectomy; predictive factor; Epstein grading; index lesion; vascular invasion; intraductal carcinoma; lymph node number; E-cadherine.

Em memória da Venerável Madre Maria Isabel da SS.ma Trindade
(Fundadora da Congregação das Irmãs Concepcionistas ao Serviço dos Pobres)

Never to forget that the patient is a fellow creature in pain, not a mere vessel of
disease.

Moisés ben Maimónides (1135-1204), médico e filósofo judeu.

Nenhum cancro se cura, a menos que seja extirpado por inteiro; com efeito, por
pouco que reste, o mal cresce na raiz.

Henri de Mondeville (1260-1320), médico de Filipe o Belo.

PUBLICAÇÕES ASSOCIADAS

Grade Group and Other Pathologic Features as Predictors of Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy

*¹Nuno Vau, *²Vanessa Henriques, ³Ana Blanca, ¹Jorge Fonseca, ⁴Rodolfo Montironi, ⁵Liang Cheng, ⁶Maria R. Raspollini, ⁷Antonio López-Beltran

*Contributed equally

¹Prostate Unit, Champalimaud Clinical Center, Lisbon, Portugal

²Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, ORCID ID [0000-0002-2154-0853](https://orcid.org/0000-0002-2154-0853)

³Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba, Spain, Cordoba, Spain.

⁴Institute of Pathological Anatomy and Histopathology, School of Medicine, Polytechnic University of the Marche Region (Ancona), United Hospitals, Ancona, Italy

⁵Departments of Pathology and Laboratory Medicine and Urology, Indiana University, School of Medicine, Indianapolis, IN, USA

⁶Histopathology and Molecular Diagnostics, University Hospital Careggi, Florence, Italy

⁷Department of Surgery, Unit of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine, Cordoba, Spain and Champalimaud Clinical Center, Lisbon, Portugal. ORCID-ID orcid.org/0000-0003-3161-8164

Submetido para publicação na revista “Virchows Arch.”

Digital versus light microscopy assessment of surgical margin status after radical prostatectomy.

Volavšek M, Blanca A, Montironi R, Cheng L, Raspollini MR, Vau N, Fonseca J, Pierconti F, Lopez-Beltran A.

Virchows Arch. 2018 Mar;472(3):451-460. doi: 10.1007/s00428-018-2296-2.

ÍNDICE GERAL

1. Introdução.....	1
1.1. Introdução geral e sistematização do trabalho.....	1
1.2. Epidemiologia.....	2
1.3. Impacto económico dos tumores da próstata.....	5
1.4. Abordagem cirúrgica dos tumores da próstata localizados.....	8
1.4.1. Limitações da prostatectomia radical.....	9
1.4.2. Caracterização da falência da prostatectomia radical.....	10
1.4.2.1. Mortalidade específica por tumor da próstata.....	11
1.4.2.2. Recorrência bioquímica.....	12
1.4.2.3. Sobrevida livre de metastização.....	14
1.4.3. Abordagem terapêutica após falência da prostatectomia radical.....	15
1.4.3.1. Variabilidade da história natural após recorrência bioquímica.....	15
1.4.3.1.1. Dimensão numérica.....	16
1.4.3.1.2. Dimensão temporal.....	16
1.4.3.1.3. Dimensão espacial.....	17
1.4.3.2. Opções terapêuticas.....	19
1.4.3.2.1. Tratamento focal.....	20
1.4.3.2.2. Tratamento sistémico.....	23
1.5. Definições de recorrência bioquímica.....	25
1.5.1. Definições de recorrência bioquímica utilizadas nas recomendações clínicas internacionais.....	26
1.5.2. Definições alternativas.....	26
1.5.3. Recorrência bioquímica precoce.....	28
1.6. Factores preditivos de falência da prostatectomia radical.....	29
1.6.1. Factores anatómicos.....	29
1.6.2. Factores clínicos.....	30
1.6.2.1. Esquemas de estratificação de risco.....	30
1.6.2.2. PSA e parâmetros derivados de PSA.....	34
1.6.2.3. Outros.....	34
1.6.3. Factores histológicos.....	36

1.6.3.1. Diferenciação histológica - score de Gleason e classificação de Epstein.....	36
1.6.3.2. Subtipos histológicos.....	40
1.6.3.3. Extensão do envolvimento tumoral na biópsia.....	42
1.6.3.4. Lesão índice.....	45
1.6.3.5. Margens cirúrgicas.....	46
1.6.3.6. Invasão perineural.....	48
1.6.3.7. Invasão vascular.....	49
1.6.3.8. Volume tumoral.....	50
1.6.3.9. Estádio patológico (“TNM”).....	50
1.6.3.9.1. Extensão extraprostática (“pT3a”).....	51
1.6.3.9.2. Invasão das vesículas seminais (“pT3b”).....	53
1.6.3.9.3. Metastização ganglionar (“pN”).....	54
1.6.4. Factores moleculares determinados por imunohistoquímica.....	55
1.6.4.1. Caderina E.....	58
1.6.4.2. Caderina N.....	59
1.6.4.3. Vimentina.....	60
1.6.4.4. ERG.....	61
1.6.4.5. P53.....	62
1.6.4.6. Ki-67.....	63
1.6.4.7. PTEN.....	64
1.6.4.8. Marcadores de reparação de ADN (“PMS2”, “MSH6”, “MLH1” e “MSH2”).....	66
1.6.4.9. Marcadores de potencial estaminal.....	67
1.6.5. Factores genéticos.....	68
1.7. Transição epitelial-mesenquimatosa.....	71
1.7.1. Indutores.....	73
1.7.2. Facilitadores.....	75
1.7.3. Inibidores.....	76
1.7.4. Efeitores a nível genético.....	77
1.7.5. Efeitores fenotípicos.....	81
1.7.6. Características morfo-funcionais.....	85
1.7.7. Transição epitelial-mesenquimatosa e tumores da próstata.....	87

1.8. “Second Chromosome Locus Associated with Prostate-1” e outros “Long Non-coding RNA”	89
1.8.1. Mecanismos de ação dos “Long Non-coding RNA”	91
1.8.2. “Long Non-coding RNA” e doença oncológica.....	95
1.8.3. “Long Non-coding RNA” nos tumores da próstata.....	99
1.8.4 “Second Chromosome Locus Associated with Prostate-1” (SchLAP1).....	101
2. Objectivos.....	106
3. Materiais e métodos.....	107
3.1. Tipo de estudo.....	107
3.2. População em estudo e critérios de seleção.....	107
3.3. Colheita de dados.....	109
3.4. Metodologias utilizadas na avaliação de biomarcadores.....	111
3.5. Variáveis e respetivo plano de operacionalização.....	116
3.5.1. Variáveis independentes.....	117
3.5.1.1. Variável demográfica.....	118
3.5.1.2. Variáveis clínicas.....	118
3.5.1.3. Variáveis anatomopatológicas.....	119
3.5.1.4. Variáveis moleculares.....	122
3.5.2. Variável dependente.....	127
3.6. Metodologia estatística.....	127
3.7. Outros.....	128
4. Resultados.....	129
4.1. Análise descritiva.....	129
4.1.1. Caracterização da população e variável demográfica.....	129
4.1.2. Variáveis clínicas.....	129
4.1.3. Variáveis anatomopatológicas.....	131
4.1.4. Variáveis moleculares.....	136
4.1.5. Variável dependente - recorrência bioquímica.....	138
4.1.6. Análise descritiva comparativa de casos com e sem recorrência bioquímica.....	139
4.1.6.1. Variáveis demográfica e clínicas.....	139
4.1.6.2. Variáveis anatomopatológicas.....	140

4.1.6.3. Variáveis moleculares.....	142
4.2. Análise univariável.....	143
4.2.1. Variáveis demográfica e clínicas.....	143
4.2.2. Variáveis anatomopatológicas.....	144
4.2.3. Variáveis moleculares.....	157
4.3. Análise multivariável.....	159
5. Discussão.....	164
5.1. Variável dependente.....	164
5.2. Variáveis demográfica e clínicas.....	165
5.3. Variáveis anatomopatológicas.....	166
5.4. Variáveis moleculares.....	175
6. Conclusões, limitações e perspectivas futuras.....	181
7. Referências bibliográficas.....	185

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Abordagem terapêutica dos carcinomas da próstata.....	9
Figura 2. Padrões histológicos que constituem o Score de Gleason.....	37
Figura 3. Visão global do fenómeno de transição epitelial-mesenquimatosa.....	72
Figura 4. “Lnc-RNA” e regulação da transcrição.....	91
Figura 5. “Lnc-RNA” e regulação do processamento do ARNm.....	92
Figura 6. “Lnc-RNA” e regulação pós-transcricional.....	93
Figura 7. “Lnc-RNA” com função de “competing endogeneous RNA”	93
Figura 8. “Lnc-RNA” e regulação pós tradução.....	93
Figura 9. “Lnc-RNA” e a função de suporte de estruturas celulares complexas.....	94
Figura 10. “Lnc-RNA” como moléculas sinalizadoras.....	95
Figura 11. Integração no genoma de “Lnc-RNA”.....	95
Figura 12. “Lnc-RNA” e Transição epitelial-mesenquimatosa.....	97
Figura 13. Mecanismos de acção do SChLAP1.....	102
Figura 14. Seleção da população em estudo.....	109
Figura 15. Microfotografias referentes a algumas das variáveis moleculares.....	127
Figura 16. Estimativa da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier referente à ocorrência de RBQ e intervalos de confiança de 95%.....	139
Figura 17. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos doentes submetidos a PR vs. PR e LFT.....	144
Figura 18. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para as várias categorias do SG da biópsia.....	147
Figura 19. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para as várias categorias da CE da biópsia.....	147
Figura 20. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier com e sem invasão perineural na biópsia.....	148
Figura 21. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier com e sem presença de áreas de diferenciação intraductal.....	148
Figura 22. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, sem áreas de diferenciação intraductal e quando esta é menor ou igual a 20% e é maior que 20%.....	149

Figura 23. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, das várias categorias do Score de Gleason, na peça operatória.....	149
Figura 24. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, das várias categorias da classificação de Epstein, na peça operatória.....	150
Figura 25. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, com e sem existência de padrão terciário, na peça operatória.....	150
Figura 26. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, das várias categorias do SG, na lesão índice.....	151
Figura 27. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, das várias categorias da CE, na lesão índice.....	151
Figura 28. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, dos tumores unifocais versus multifocais.....	152
Figura 29. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com margem cirúrgica negativa versus positiva.....	153
Figura 30. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem extensão extra-prostática.....	153
Figura 31. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem invasão perineural.....	154
Figura 32. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem invasão vascular.....	154
Figura 33. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem invasão das vesículas seminais.....	155
Figura 34. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem existência de metastização ganglionar.....	156
Figura 35. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, entre os vários estádios patológicos referentes ao tumor primário.....	156
Figura 36. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, entre casos com expressão normal e aberrante de caderina E.....	158
Figura 37. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos marcadores não relacionados com RBQ.....	158

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Custo das várias opções terapêuticas utilizadas em carcinomas da próstata disseminados e resistentes a castração. Dados referentes aos EUA.....	7
Quadro 2. Medidas de sucesso oncológico associadas a tratamento cirúrgico de intuito curativo no tumor da próstata localizado.....	10
Quadro 3. Esquema “Cancer of the Prostate Risk Assessment” (CAPRA).....	32
Quadro 4. Impacto prognóstico de MCP.....	46
Quadro 5. Sistema de estadiamento TNM, clínico e patológico.....	52
Quadro 6. Marcadores de prognóstico determinados por IHC nos TP.....	57
Quadro 7. Factores de transcrição associados a TEM.....	78
Quadro 8. “Lnc-RNA” associados aos TP.....	99
Quadro 9. Estudos que avaliam SChLAP1 em tumores da próstata.....	105
Quadro 10. Lista dos biomarcadores estudados por IHC.....	114
Quadro 11. Lista das variáveis independentes.....	117
Quadro 12. Plano de operacionalização das variáveis moleculares.....	123
Quadro 13. Análise descritiva das variáveis clínicas.....	130
Quadro 14. Análise descritiva das variáveis anatomopatológicas.....	131
Quadro 15. Análise descritiva das variáveis moleculares.....	136
Quadro 16. Análise descritiva da variável dependente.....	138
Quadro 17. Resultados das variáveis demográfica e clínica em doentes com e sem RBQ.....	140
Quadro 18. Resultados das variáveis anatomopatológicas em doentes com e sem RBQ.....	140
Quadro 19. Resultados das variáveis moleculares em doentes com e sem RBQ.....	142
Quadro 20. Resultado de modelos de regressão de Cox referente às variáveis demográfica e clínicas.....	143
Quadro 21. Resultado de modelos de regressão de Cox referente às variáveis anatomopatológicas.....	145
Quadro 22. Resultado de modelos de regressão de Cox referente às variáveis moleculares.....	157
Quadro 23. Variáveis selecionadas para análise multivariável.....	159
Quadro 24. Resultados globais da análise multivariável.....	160

Quadro 25. Resultados da análise multivariável para modelo alternativo.....162

LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

ADAM9 – “A disintegrin and metalloprotease domain metallopeptidase domain 9”

AJCC - “American Joint Committee on Cancer”

Akt – “AKT serine/threonine kinase”

ALCAM – “activated leukocyte cell adhesion molecule”

ALDH - “Aldeido desidrogenase”

ALDH1A1 – “Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1”

ARNm - ARN mensageiro

AUA – “American Urological Association”

Bcl-2 – “B-cell lymphoma 2”

BDNF – “Brain-derived neurotrophic factor”

BMP – “Bone morphogenetic protein”

CAPRA - “Cancer of the Prostate Risk Assessment post-Surgical”

CB1R – “Central cannabinoid receptor”

CBFA- “C-module-binding factor”

CCAT2 – “Colon cancer associated transcript 2”

CD10 – “Common acute lymphoblastic leukemia antigen”

CD133 – “Prominin-1”

CD138 – “Syndecan 1”

CD147 – “Extracellular matrix metalloproteinase inducer”

CD166 - “Cluster of differentiation 166”

CD24 – “Heat stable antigen CD24”

CD44 – “Homing cell adhesion molecule”

CD74 – “HLA-DR-associated invariant chain”

CDH1 – Gene que codifica a caderina E

CDH2 – Gene que codifica a caderina N

CE – Classificação de Epstein

CEN - Células estaminais neoplásicas

COX-2 – Ciclo-oxigenase 2

CRGA – Cromogranina A

CSF-1 – “Colony stimulating factor 1”

DCS - Doença clinicamente significativa

DGS – Direção Geral de Saúde

DKK1 – “Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1”

DNM3OS – “DNM3 opposite strand/antisense RNA”

DP – Desvio padrão

EAU – “European Association of Urology”

EECGG - Extensão extracapsular ganglionar

EEP - Extensão extraprostática

EGAPP - “Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention”

EGF - Factor de crescimento epidérmico

EGFR – “Epidermal Growth Factor Receptor”

Elf5 – “E74-like factor 5”

ER – Recetor de estrogénios

ERG - “ETS-related Gene”

ESRP1 e 2 - “Epithelial-specific regulatory protein 1” e “2”

ETS - “E26 transformation-specific”

EUA – Estados Unidos da América

EZH2 – “Enhancer of zeste homolog 2”

FGFR – “Fibroblast growth factor receptors”

FOXA1 – “Forkhead box A1”

FOXA2 – “Forkhead box A2”

FOXC2 – “Forkhead box C2”

FOXD3 – “Forkhead box D3”

FOXF1 – “Forkhead box F1”

FOXO3A – “Forkheadbox O3A”

FOXQ1- “Forkhead box Q1”

FT – Factor de transcrição

FVIII – Factor VIII

FZD4 - “Frizzled-4”

GATA4 – “GATA binding protein 4”

GATA6 – “GATA binding protein 6”

GSK-3 β – “Glycogen synthase kinase 3 beta”

HDAC2 – “histone deacetylase 2”

HGF – “Hepatocyte Growth Factor”
HIF1 α – “Hypoxia Inducible Factor 1- α ”
HMG2 – “hydroxymethylglutaryl-CoA reductase”
HOTAIR – “HOX transcript antisense RNA”
HR – “Hazard Ratio”
HSP-27 – “Heat shock protein 27”
HT – Hormonoterapia
IC – Intervalo de confiança
IDH1 – “Isocitrate dehydrogenase 1”
IGF-1 – “Insulin like growth factor 1”
IHC - imunohistoquímica
ISUP - “International Society of Urological Pathology”
IVS - Invasão das vesículas seminais
KAP1 – “Tripartite motif-containing 28”
Ki-67 – “Marker of proliferation Ki-67”
KLF8 – “Krueppel-like factor 8”
LED - “Activator of enhancer domains”
LFT – Linfadenectomia
LI – Lesão índice
Lnc-RNA - “Long Non-coding RNA”
LVI – Invasão vascular
MALAT1 - “Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1”
MAPK – “Mitogen activated kinase”
MCP - Margem cirúrgica positiva
MEC - Matriz extracelular
MEG3 – “Maternally expressed gene 3”
METP – Mortalidade específica por tumor da próstata
miARN – Micro ARN
MLH1 – “MutL homolog 1 colon cancer nonpolyposis type 2”
MLL2 – “Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2”
MMR - Reparação de “Mismatch”
MP – Metaloproteinase

MSH2 – “MutS protein homolog 2”
MSH6 – “MutS homolog 6”
MSI – Instabilidade de micro-satélites
MUC-1 – “Mucin 1”
NANOG “Homeobox protein NANOG”
NCCN – “National Comprehensive Cancer Network”
NEAT1 – “Nuclear paraspeckle assembly transcript 1”
NESTIN - Filamento intermedio tipo VI
NFkB - “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
NGF – “Nerve growth factor”
NKX3.1 – “Homeobox protein Nkx-3.1”
NORAD – “Non-coding RNA activated by DNA damage”
NT3 - Neurotrophin-3
OCT4 - “Octamer-binding transcription factor 4”
p21 – “Cyclin-dependent kinase inhibitor 1”
p27 – “Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B”
PCAT-114 – Corresponde ao SChLAP1
PDGF – “Platelet derived growth factor”
PET – Tomografia de emissão de positrões.
PET-CT – Tecnologia híbrida que combina tomografia de emissão de positrões e tomografia computadorizada.
PGE2 -“Prostaglandina E2”
PI3K - “Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase”
PMS2 – “Mismatch repair endonuclease PMS2”
Pn – Invasão perineural
pN – Subcategoria do estágio patológico TNM referente à metastização ganglionar
PR – Prostatectomia radical
PRX1 – “Peroxisredoxin 1”
PSA – “Prostate-specific antigen”
PSMA – “Prostate Specific Membrane Antigen”
pT – Subcategoria do estágio patológico TNM referente ao tumor primário.
PTEN - “Phosphatase and tensin homologue deleted”

PTENP1 - Pseudogene do gene de supressão tumoral PTEN

PVT1 - "Pvt1 oncogene"

qRT-PCR - "Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction"

RA - Recetor de androgénios

RAF – "Proto-oncogene c-RAF"

Rb - Retinoblastoma

RBQ – Recorrência bioquímica

Rho GTPases – "Rho family of GTPases"

RM - ressonância magnética

RTE – Radioterapia externa

RTEa – Radioterapia externa adjuvante

RTEs – Radioterapia externa de "salvação"

SChLAP1 - "Second Chromosome Locus Associated with Prostate-1"

SEER - "Surveillance, Epidemiology and End Results"

SFRP1 – "Secreted frizzled-related protein 1"

SG - Score de Gleason

SLD - Sobrevivência livre de doença

SLM - Sobrevivência livre de metastização

SMAD – "SMA (small worm phenotype) and Drosophila MAD (Mothers Against Decapentaplegic) family of genes"

SNF5 – "SWI/SNF complex subunit SNF5"

SNP - "Single nucleotide polymorphisms"

SOX2 - "SRY (sex determining region Y)-box 2"

SOX9 - "SRY (sex determining region Y)-box 9"

SPINK1 – "Serine protease inhibitor Kazal-type 1"

SPOP – "Speckle-type POZ protein"

SWI/SNF - "Switch/Sucrose Nonfermenting complex"

TAC – Tomografia axial computadorizada

TD PSA - Tempo de duplicação de PSA

TEM – Transição epitelial-mesenquimatosa

TGF- β - "Transforming growth factor beta"

TMA - "Tissue microarrays"

TME - Transição mesenquimatosa-epitelial

TNF- α - "Tumor Necrosis Factor – Alpha"

TNM - Sistema de estadiamento "Tumor-Nodes-Metastasis" da AJCC

TP – Tumor(es) da próstata.

UE – União Europeia

USD – Dólar Norte-americano

VT – Volume tumoral

Wnt – "Wingless-related integration site"

ZNF703 – "Zinc finger protein 703"

AGRADECIMENTOS

Antes de mais a quem tudo devo, à minha família. À minha mulher e aos meus filhos pelo amor incondicional, pelo que suportaram e pelo que ajudaram. Aos meu pais por tudo o que sou. Sem eles seria muito diferente, para pior.

Aos meus doentes e aos familiares dos mesmos, a quem tanto devo e de quem tanto aprendi, pelo seu exemplo de vida e de amizade. Sobretudo aos muitos que tenho a sorte de contar por amigos. Vou-me esquecer de muitos, até porque de alguns já só retenho o sorriso. À Rosa e ao Nelson Serra, à Dra. Teresa Soares, ao Pedro Furtado, à família Leitão, à família Varela, à família Manso, à família Mélon, à família Nunes, à D. Teresa Gonçalves, ao Sr. Florival Revez, ao Sr. Almirante Cancela, à D. Teresa Souza, ao Professor Leonardus Mude, à D. Cândida Figueiredo, à D. Ana Janeiro, ao Dr. Aparício, à D. Rosa Galo, à Professora Margarida Armino, à D. Alexandra Scrimgeour, ao Eng. João Bela e tantos outros. Bem hajam!

Ao meu orientador, o senhor Professor Doutor Antonio Lopez-Beltran, amigo que personifica a temperança e a perseverança. Sempre conseguiu aportar uma solução, mesmo perante as maiores dificuldades. Sem a sua ajuda este trabalho nunca teria existido.

Aos meus amigos, duvido, se sem eles teria conseguido terminar esta empresa. Mesmo que o tivesse conseguido, teria sido de um modo mais penoso. Ao Dr. Jorge Rebola, pelas incontáveis trocas de impressões que tanto ajudaram a que este trabalho ganhasse a forma que tem e, sobretudo, pela força e pela esperança que em mim infundiu. À família Tintas pelo estímulo constante. À Professora Doutora Carla Barros pela amizade, pelo exemplo de vida e de entrega ao trabalho, e pelo apoio inexcedível. Ao Engenheiro Francisco Mascarenhas, ao Dr. Luís Rosa, ao Dr. Nuno Gil e ao Dr. Rui Lúcio por serem amigos.

À Professora Doutora Sofia Azeredo que com a sua ajuda inestimável, permitiu-me ultrapassar as minhas dificuldades em termos estatísticos, e constituiu-se como mais uma das peças fulcrais que permitiram a conclusão do presente trabalho.

À senhora Professora Maria Alexandra Fernandes e ao senhor Professor Doutor Pedro Viana Baptista da Universidade Nova de Lisboa, pela realização da análise molecular e sobretudo pelas perspectivas de futuro.

À senhora Professora Doutora Maria Raspollini, da Universidade de Florença, pela realização das matrizes tecidulares, peça essencial para a realização deste projeto. A todo o pessoal, do Serviço de Anatomia Patológica, em particular à Dra. Vanessa Henriques.

À Administração da Fundação Champalimaud, ao Dr. Jorge Fonseca, diretor da Unidade de Próstata, e ao Professor Doutor António Parreira, na condição de diretor clínico e de co-orientador, pelas condições criadas, que permitiram a conclusão deste trabalho. Aos restantes colegas de trabalho, de diversas categorias profissionais, pela sua ajuda e estímulo. Uma palavra muito especial para a Senhora Enfermeira Daniela Dias, e para as gestoras de doente da minha unidade, a Dra. Marlene Correia e a Dra. Paula Gonzaga. Por fim o meu agradecimento à Dra. Manuela Seixas, diretora da Unidade de Investigação Clínica da Fundação Champalimaud.

Ao Eric Bibb pela mensagem e pela música. Reencontrar-nos-emos em Marciac.

De Coiores.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução geral e sistematização do trabalho

Os tumores da próstata (TP) representam, na atualidade, um importante problema de saúde pública. Estas neoplasias têm uma elevadíssima incidência e prevalência. Apesar dos refinamentos obtidos, nos últimos anos, no tratamento da doença primária, existem muitos doentes em que a mesma recorre. Este facto traduz-se em morbidade e mortalidade elevadas. Há ainda que levar em linha de conta os custos significativos associados às diversas abordagens terapêuticas. Esta contextualização simplista, torna óbvia a necessidade de otimização da abordagem dos TP. São vários os níveis, a que poderão ocorrer melhorias. A nosso ver, um dos mais importantes, pela possibilidade curativa que corporiza, passa pelo aperfeiçoamento do tratamento da doença primária localizada. Para o efeito, é necessário um melhor conhecimento dos factores preditivos e prognósticos, que orientem a otimização da terapêutica local, nomeadamente a utilização de intensificação terapêutica. Os dados acerca, de muitos, destes factores preditivos e prognósticos são profícuos, mas quase nunca definitivos. Como tal, uma melhoria do conhecimento destes factores afigurasse-nos como muito importante, de modo a otimizarmos a terapêutica do tumor primário, a que de longe, apresenta a maior probabilidade de ser curativa.

Este trabalho encontra-se dividido em seis capítulos. Na introdução procura-se contextualizar, do ponto de vista teórico, a hipótese que conduziu à realização deste projeto de investigação. Começa-se por enquadrar a importância epidemiológica e o impacto económico associado aos TP. Em seguida, faz-se um breve resumo, acerca do estado da arte, do tratamento cirúrgico da doença primária e localizada. Depois caracteriza-se o “endpoint” utilizado neste estudo e resume-se a informação disponível acerca dos vários factores preditivos. Ainda dentro da introdução contextualiza-se a transição epitelial-mesenquimatosa e a sua relação com os TP. Por fim faz-se o mesmo em relação aos “Lnc-RNA”, com particular ênfase em relação ao SChLAP1. Após a introdução explica-se a hipótese subjacente à presente investigação e enumeram-se os objetivos. No capítulo intitulado materiais e métodos, resume-se a metodologia utilizada. O capítulo seguinte contém uma

descrição pormenorizada dos resultados obtidos. Estes são discutidos no capítulo seguinte, e contextualizando de acordo com os dados disponíveis na literatura. Por fim, resume-se quais as conclusões e as limitações do presente estudo e projeta-se o futuro que lhe dará continuidade. A presente tese é encerrada com uma lista das referências bibliográficas, consultadas para a realização da presente monografia.

1.2. Epidemiologia

A elevada magnitude da importância epidemiológica dos TP está perfeitamente estabelecida. As várias fontes de dados epidemiológicos, disponíveis à escala global, são concordantes quanto à sua elevada incidência, prevalência e mortalidade.

De acordo com os dados do “Globocan” (<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp>; acedido em 20 de Abr. de 18) o tumor da próstata foi, a nível global em 2012, a quarta neoplasia mais frequente quando se considera ambos os sexos e a segunda mais frequente quando se considera apenas o sexo masculino. Globalmente, nesse mesmo ano, estimou-se 1,1 milhões de novos casos, representando um sexto do total de novos casos de doença oncológica. Existe uma acentuada variabilidade geográfica, sendo maior a incidência em países mais desenvolvidos. Levando em consideração os dados referentes a 2015, a incidência foi de 1.6 milhões de casos e a mortalidade de 366 mil¹. Os valores de incidência mais elevados registaram-se na Oceânia e na América do Norte, e os menores na Ásia. Em termos de mortalidade o TP foi a quinta causa mais frequente de morte por doença oncológica, cerca de 6.6% da totalidade das mortes oncológicas no sexo masculino. No entanto, quando comparada com a incidência, a mortalidade verifica uma menor variabilidade geográfica, devendo-se este facto, provavelmente, a programas de rastreio operantes em países com maior de desenvolvimento e capacidade económica.

Dados referentes aos Estados Unidos da América (EUA) e obtidos a partir do programa “SEER” (“Surveillance, Epidemiology and End Results”; <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>; acedido em 20 de Abr. 18) apontam, em termos relativos, para valores ainda mais significativos. No ano de 2015, por cada 100 mil indivíduos, diagnosticaram-se 99 novos casos de TP. Estima-se, em 2018, uma incidência superior a 160 mil casos, representando 9,5% do total

de novos casos de doença oncológica. Considerando o mesmo período estimam-se quase 30 mil mortes, o que representa 4,8% da totalidade das mortes por causa oncológica. Em 2015, por cada 100 mil habitantes, a taxa de mortalidade devida ao TP foi de 18,9. O programa “SEER” fornece ainda dados de prevalência, reforçando, por conseguinte, a importância epidemiológica dos TP. Em 2015 estimou-se que existiriam, nos EUA, mais de 3 milhões e 100 mil indivíduos com carcinoma da próstata. Por outro lado, a sobrevivência estimada a 5 anos foi cerca de 98.2% no intervalo entre 2008 e 2014. Não obstante a magnitude, dados do SEER apontam para uma descida, da incidência e da mortalidade, nos últimos 10 anos.

Globalmente estes valores referentes aos EUA foram confirmados pela “American Cancer Society”. Esta associação compila e analisa os dados produzidos por vários programas norte-americanos. Em termos de incidência, avalia os dados do “SEER”, do “National Program of Cancer Registries” e dos “North American Association of Central Cancer Registries”. Em termos de mortalidade avalia os dados constantes do “National Center for Health Statistics”. Os valores de incidência previstos para 2018 são muito similares aos do “SEER”. Em termos de risco, aceita-se que um em cada 9 homens virá a desenvolver TP durante a vida. A incidência é maior em homens mais velhos e de ascendência africana. Os dados obtidos em termos de mortalidade e de prevalência são, também, similares aos do “SEER”².

Na União Europeia (UE) em 2014, e de acordo com o Eurostat (http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Cancer_statistics_-_specific_cancers; acessado em 20 de Abr. de 18), morreram 74 mil homens com TP (39.6 por cada 100 mil habitantes). Este valor correspondeu a 5,5% do total das mortes por doença oncológica. À semelhança do registado à escala global, existe na UE uma variabilidade geográfica apreciável. A mortalidade por TP foi menor na Bulgária e na Roménia (1,7%) e maior, em cerca de 3 vezes, na Suécia (5,6%). A Suécia apresentou a particularidade de ser o único país da UE em que a mortalidade por TP superou a mortalidade associada aos tumores do pulmão. Da mesma maneira, à semelhança dos EUA, também na UE o TP é mais frequente em doentes mais idosos.

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), através da “International Agency for Research on Cancer”, referentes à UE

(<http://eco.iarc.fr/eucan/CancerOne.aspx?Cancer=29&Gender=1>; acedido em 20 de Abr. de 18), confirmam, mais uma vez, a elevada incidência e mortalidade associada aos TP. A incidência estimada em 2012 foi superior a 358 mil casos (106,6/100000) e a mortalidade a 71 mil (22,4/100000). Estes dados reforçam a noção de variabilidade geográfica em termos de mortalidade e, sobretudo, de incidência, mais acentuadas nos países nórdicos. A prevalência, embora menor que nos EUA assume valores bastantes elevados. Em 2012, era superior a 1 milhão e duzentos mil indivíduos. Estimativas baseadas em dados da mesma agência e do mesmo ano, mas referentes a 40 países europeus³ acrescentam alguns dados interessantes. O TP representava a terceira neoplasia mais frequente, com uma incidência de 417 mil casos. Quando se considera países que não integram a UE, a variabilidade geográfica acentua-se ainda mais, atingindo diferença de 7 vezes quando se comparam países como a Noruega, com países como Malta ou a Albânia. No sexo masculino representava a terceira causa de morte, estimando-se que tenha sido responsável por 92 mil mortes, representando, por conseguinte, 9,5% das mortes de causa oncológica no sexo masculino. A variabilidade geográfica embora persista na mortalidade é menos evidente do que na incidência.

Em termos nacionais, os dados da Direção Geral de Saúde (DGS), embora mais antigos, corroboram os achados referentes a outros países desenvolvidos⁴. Dados provisórios referentes a 2009, apontam para uma incidência de TP de 108,8/100000. Ainda de acordo com dados da DGS, a incidência de TP não sofreu uma variação acentuada entre 2005 e 2009, o que vai contra o observado noutros países desenvolvidos, como os EUA. A taxa de mortalidade manteve-se relativamente estável ao longo do quinquénio 2008-2012, com valores entre os 22 a 23,5/100000. Também dentro do território nacional continental denota-se variabilidade geográfica no que concerne à mortalidade - menor no norte do que no restante território. Os dados da OMS relativamente às estimativas de 2012, para a UE, (<http://eco.iarc.fr/eucan/CancerOne.aspx?Cancer=29&Gender=1>; acedido em 20 de Abr. de 18) colocam Portugal numa situação intermédia. O nosso país apresenta uma incidência (85.6/100000) e uma mortalidade (18.4/100000) inferiores à média da UE (respetivamente 106,6 e 22,4/100000). Na década compreendida entre 2002 e 2012, a incidência aumentou e a mortalidade diminuiu⁵.

Apesar de alguma variabilidade nos dados disponíveis e de eventuais críticas quanto à qualidade dos mesmos, comprova-se a extrema importância dos TP à data de hoje. Trata-se de uma neoplasia muito frequente, para a qual se assistiu nos últimos anos a refinamentos crescentes em termos de diagnóstico e de tratamento. Esta melhor abordagem diagnóstica e terapêutica será provavelmente responsável pela diminuição da incidência e da mortalidade, a que se assiste nalguns países ocidentais como os EUA. No entanto a observação da evolução temporal da incidência a nível global sugere o contrário, sobretudo na Ásia e na Europa do Norte⁵. Contudo, mesmo que se venha a assistir a uma diminuição da incidência num futuro próximo, esta será muito provavelmente desacelerada pelo crescimento e mercado envelhecimento populacionais. Por outro lado, a mortalidade por TP parece estar a diminuir significativamente a nível global, com exceção de alguns países asiáticos e da Europa do Leste. O somatório da evolução da incidência e da mortalidade parecem contribuir adicionalmente para uma prevalência elevada, com custos condizentes para os sistemas de saúde. Em face dos dados expostos, consegue-se facilmente afirmar que o TP representa um grave problema de saúde pública no presente, com tendência para se agravar num futuro próximo.

1.3. Impacto económico dos tumores da próstata

Os TP representam uma fonte de encargos muito elevada para os sistemas de saúde. Não só pela sua frequência como também pelos valores pecuniários muitíssimo elevados implicados na sua abordagem diagnóstica e terapêutica bem como no seguimento dos doentes. Nos EUA os gastos com os TP foram de 11,8 mil milhões de dólares norte-americanos (USD) em 2011, 13 mil milhões de USD em 2013 e 14,8 em 2017⁶. Quando considerados os valores por cada doente individualmente, confirma-se a sua magnitude e crescimento progressivo. O custo médio vitalício calculado por doente com TP foi de 34,432 USD em 2004 e 48,963 em 2015⁷. Dados de outros países ocidentais, como o Canadá, confirmam os dados norte-americanos⁸. Na UE os valores implicados na abordagem dos doentes com TP são igualmente muito elevados. Em 2009 os gastos com TP representaram 7% (8,43 mil milhões de euros) da totalidade dos gastos com doenças oncológicas⁹. Dados nacionais confirmam este impacto em vários países europeus^{10,11}.

Na abordagem terapêutica dos TP reconhecem-se vários momentos ditados pela história natural da doença. Na doença localizada, forma de apresentação da doença na maioria dos casos, há a considerar o tratamento focal. Após surgimento de disseminação a distância, de uma forma geral, há que considerar duas fases: uma primeira em que existe sensibilidade a castração e uma segunda, mais tardia, em que ocorre resistência a castração. Quer a abordagem focal quer a sistémica implicam custos importantes que aumentaram significativamente nos últimos anos. Provavelmente, a área onde se registou maior acréscimo de despesa é no tratamento sistémico da doença disseminada resistente a castração. Na última década surgiram, neste contexto, vários fármacos associados a aumento da sobrevivência: Abiraterona^{12,13}; Cabazitaxel¹⁴; Docetaxel¹⁵; Enzalutamida^{16,17} e Radium-223¹⁸. Dada a história natural usualmente prolongada dos TP é frequente os doentes utilizarem vários, se não todos os fármacos disponíveis. Os valores Norte-Americanos associados à utilização destes medicamentos estão sumarizados no quadro 1. Pollard e colaboradores ao assumirem que a duração de tratamento em doentes com TP resistentes a castração é de 41,8 meses, chegaram a gasto, por doente, de mais de 417 mil dólares norte-americanos. Assumindo um ganho de sobrevivência de 20,1 meses associado à terapêutica, cada mês custa mais de 20 mil USD por doente¹⁹.

Quando se considera o impacto económico dos TP é indubitável levar em linha de conta os custos associados a complicações esqueléticas da metastização óssea. O TP metastizado apresenta um tropismo particular pelo osso. Cerca de 90% destes doentes apresentam metástases ósseas²⁰. Roghmann e colaboradores avaliaram 443929 doentes com metástases ósseas entre 1998 e 2010. Mais de 15% tiveram pelo menos uma complicação esquelética. Estas representaram um custo superior a 1,5 mil milhões de USD²¹. A avaliação de uma população japonesa de doentes com TP metastizado e resistente a castração, confirmou que a existência de complicações esqueléticas aumenta de modo significativo, quase duplica, o impacto económico²².

Quadro 1. Custo das várias opções terapêuticas utilizadas em carcinomas da próstata disseminados e resistentes a castração. Dados referentes aos EUA. Adaptado de Pollard et al¹⁹.

Fármaco	Preço por unidade(USD)	Duração do tratamento	Custo total	Ganho de sobrevivência (meses)
Abiraterona	5390	8	43120	3,9
Cabazitaxel	7773	4,5	46638	2,4
Docetaxel	1515	7	14398	2,4
Enzalutamida	7450	8,3	61835	3,7
Radium-223	11500	6	69528	3,6
Denosumab	1587	41,8	66349	-

Qualquer que seja a abordagem terapêutica considerada há que levar em linha de conta, para além do seu custo intrínseco, o valor das complicações que a mesma poderá acarretar. Exemplos paradigmáticos desta situação, são as complicações urinárias e sexuais secundárias ao tratamento focal. A avaliação de uma coorte holandesa confirmou o elevado impacto económico da incontinência urinária²³.

Por fim dever-se-á considerar o ritmo acelerado a que surgem as inovações em todo o espectro de abordagem da doença. Em termos de diagnóstico é inegável a importância crescente da ressonância magnética no diagnóstico e no rastreio. Outra metodologia, igualmente cara e de interesse inquestionável, é a tomografia de emissão de positrões (PET). A PET assume um papel crescente no estadiamento inicial da doença, e já está estabelecida enquanto ferramenta de avaliação da extensão, aquando da ocorrência de recorrência bioquímica, bem como na avaliação das respostas às várias linhas de tratamento sistémico, utilizadas no tratamento da doença disseminada. Do mesmo modo, outra metodologia cara que provavelmente se tornará indispensável num futuro próximo é a avaliação genética. Esta terá importância na abordagem inicial da doença, nomeadamente no apoio à tomada de decisão de tratar ou não em doenças de baixo risco. Terá ainda interesse enquanto factor preditivo na decisão da sequenciação da terapêutica em contexto de doença disseminada. Não menos importante é a orientação da abordagem de casos familiares de TP. Considerada em conjunto, a inovação arrisca-se a tornar errónea, por manifesto defeito, todas as projeções até agora realizadas em termos de custos. Um exemplo ilustrativo desta possibilidade, passa pelo facto de em 2017 os gastos com TP⁶ praticamente igualarem a previsão de gastos, efetuada no início da

presente década, para 2020²⁴. Um outro aspeto a considerar na determinação do impacto económico são os custos indirectos. A literatura disponível, reflete maioritariamente os custos directos. Convém, no entanto, considerar os custos indirectos nomeadamente a perda de produtividade laboral associada ao absentismo e à morte.

Da avaliação dos dados disponíveis referentes ao impacto económico dos TP ressaltam vários aspetos, sendo o mais evidente, o elevadíssimo custo associado à sua abordagem. Esta realidade é reproduzível nos dados disponíveis para vários países ocidentais. Outro aspeto, não menos importante, passa pelo aumento progressivo dos gastos que se registou nos últimos anos. Em grande medida, tributários do aumento das opções disponíveis para o tratamento de formas avançadas da doença. Aliás uma clara disparidade entre gastos com doença localizada e doença avançada já estava estabelecida, mesmo antes do recente advento das novas terapêuticas²⁵. Também do ponto de vista económico, é fácil compreender o interesse em otimizar o tratamento da doença primária.

1.4. Abordagem cirúrgica dos tumores da próstata localizados

O tratamento dos TP sofreu uma evolução significativa nos últimos anos. São hoje múltiplas as opções possíveis, quer focais quer sistémicas, na abordagem dos doentes com TP, como se pode observar na figura 1. Não obstante a evolução e a multiplicidade de opções disponíveis, o intuito curativo continua a estar reservado, na esmagadora maioria dos casos, para o tratamento focal da doença primária não disseminada. Neste contexto a cirurgia e a radioterapia externa representam as opções basilares. Ambos os métodos foram alvos de refinamentos técnicos recentes, que aumentaram a sua eficácia e segurança. Apesar destas melhorias, continua a existir uma fracção de doentes em que estes métodos não são curativos, conduzindo a morbilidade, mortalidade e custos elevados.

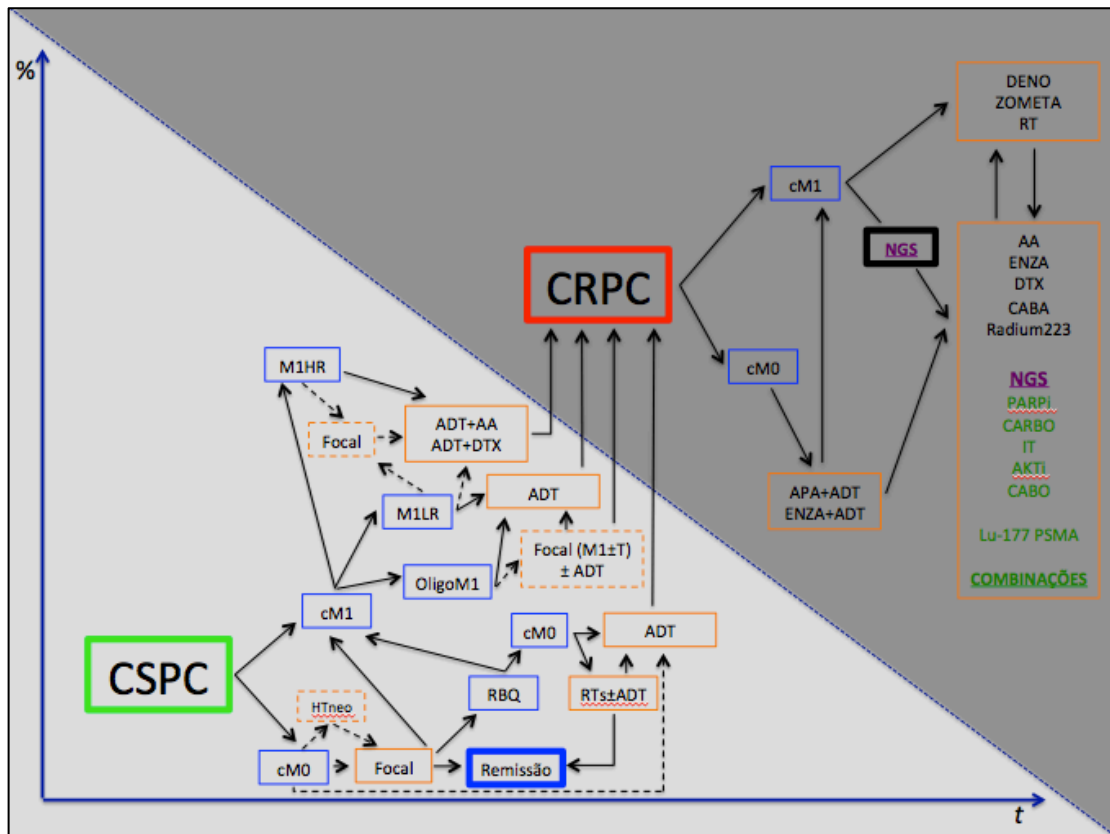


Figura 1. Abordagem terapêutica dos carcinomas da próstata.

Dada a natureza da amostra utilizada neste projeto de doutoramento, os dados que se seguem dizem sobretudo respeito a doentes tratados com cirurgia radical. Fica de fora, a evidência teórica referente a outras formas de tratamento local dos TP, como a radioterapia externa (RTE) e outros métodos focais.

1.4.1. Limitações da prostatectomia radical

Em termos cirúrgicos a prostatectomia radical (PR), por via aberta, está progressivamente a ser substituída por técnicas minimamente invasivas como a prostatectomia radical por via laparoscópica e a prostatectomia radical por via laparoscópica assistida por robot. Em termos de qualidade de vida urinária e sexual parece haver algum ganho com as metodologias menos invasivas. Este ganho poderá também estender-se às complicações cirúrgicas, nomeadamente à dor no pós-

operatório imediato. O ganho parece ser sobretudo notório na diminuição dos dias de internamento e das necessidades transfusionais²⁶. No entanto em termos de eficácia oncológica o ganho associado às novas metodologias não está inequivocamente estabelecido. A PR assume-se hoje em dia como uma técnica cirúrgica extremamente refinada com taxas de sucesso muito elevadas e taxas de complicações muito baixas.

1.4.2. Caracterização da falência da prostatectomia radical

A PR representa uma disrupção na história natural dos TP localizados que na maioria dos casos se traduz em cura. No entanto existe uma percentagem de doentes em que a doença recorre, após a PR. Esta falência está amplamente plasmada na literatura. São múltiplos os estudos que caracterizam a evolução da doença após realização de PR. Embora possam utilizar parâmetros distintos, grosso modo, coincidem nos achados, como se pode observar no quadro 2.

Quadro 2. Medidas de sucesso oncológico associadas a tratamento cirúrgico de intuito curativo no tumor da próstata localizado.

n	Seguimento (anos)	RBQ ¹ (%)	METP ² (%)	M1* (%)	Rastreio	Referência
695	18	-	17,7	26,1	Prévio	Bill-Axelsson ²⁷
1746	15	25	11	-	Prévio	Bianco ²⁸
2404	15	34	10	18	Prévio	Han ²⁹
1997	15	15	-	18	Prévio	Pound ³⁰
1000	10	25	2,4	15,8	Prévio	Hull ³¹
3478	10	32	3	-	Prévio	Roehl ³²
12677	15	-	12	-	Após	Stephenson ³³
12389	15	-	7	-	Após	Eggerer ³⁴

¹Nalguns destes estudos a RBQ é apelidada de sobrevivência livre de doença, a qual incluía ausência de elevação do PSA.

²Mortalidade específica por tumor da próstata

*Desenvolvimento de metastização.

Um dos estudos que provavelmente melhor espelha a elevada eficácia da PR é o “Scandinavian Prostate Cancer Group Study Number 4”. Entre 1989 e 1999, 695 doentes com TP localizados, foram distribuídos de forma aleatória entre vigilância e PR. Após mais 23 anos de seguimento demonstrou-se, de modo inequívoco, que a mortalidade associada a TP era significativamente menor no grupo tratado. A redução do risco de morte por TP foi de 44%²⁷.

Existem vários “endpoints” que tentam quantificar e caracterizar a eficácia da PR. A sobrevivência, dada a história natural da doença, implica um hiato temporal muito longo, o qual é adicionalmente confundido pela mortalidade de causa não oncológica. “Endpoints” clínicos intermédios, apesar de muito utilizados, não estão na maior parte dos casos validados. Uma resposta a esta dificuldade poderá vir a ser dada pelo grupo de trabalho “international Intermediate Clinical Endpoints in Cancer of the Prostate” (ICECaP)³⁵.

1.4.2.1. Mortalidade específica por tumor da próstata

A mortalidade específica por TP, enquanto “endpoint”, apresenta várias vantagens. É um “endpoint” preciso. Ultrapassa a limitação associada ao facto de uma parte dos doentes com elevação do PSA (recorrência bioquímica) não virem a desenvolver doença clinicamente significativa. Há ainda que considerar a história natural habitualmente longa dos TP. Como tal, os doentes podem vir a morrer de uma outra causa, sem relação com TP. A atestá-lo está o facto de, a 15 anos, a mortalidade secundária a TP poder ser quantitativamente similar à mortalidade de outra causa²⁸. Este facto poderá ser simultaneamente uma vantagem e uma desvantagem, o que dependerá do correto reconhecimento da causa de morte, nem sempre fácil, sobretudo em indivíduos com múltiplas comorbilidades. Este “endpoint” apresenta outras desvantagens. Algumas bem estabelecidas, como o caso do impacto de um eventual “crossover”, de cuidados paliativos e de variabilidade no tratamento após progressão. Por fim, há que considerar a desvantagem de intervenções com pouco impacto na mortalidade, implicarem ensaios com um elevado número de doentes³⁶. Numa série com mais de 1700 doentes com doença clinicamente localizada, a sobrevivência específica para carcinoma da próstata foi aos 5, 10 e 15 anos respetivamente de 99%, 95% e 89%. Nos doentes, em que ocorreu progressão aos

15 anos, a probabilidade de morte por TP foi similar à probabilidade de morte de outra causa²⁸. Em 2404 doentes com TP localizados e tratados com PR por via aberta, a sobrevivência específica para doença oncológica foi de 90%²⁹. Na série publicada por Roehl e colaboradores, os resultados obtidos para sobrevivência específica para doença oncológica a 10 anos foram de 97%³². Na série de Hull também com dados referentes a 10 anos a sobrevivência específica para doença oncológica foi igualmente elevadíssima, superior a 97%³¹.

Os dados acima descritos foram obtidos maioritariamente antes da massificação do rastreio com PSA. O rastreio de TP com recurso a PSA é um tema controverso, cuja discussão ultrapassa o âmbito desta tese. No entanto, o seu impacto nos resultados da PR não se traduz em diferenças significativas, quando se compara a era pré rastreio com a era pós rastreio. Stephenson e colaboradores publicaram os dados referentes a uma coorte composta por 12677 tratados com PR, entre 1987 e 2005. A 15 anos, a sobrevivência específica para carcinoma da próstata foi de 88% e a sobrevivência global foi 62%. Estes dados confirmaram a noção de eficácia associada à PR³³. Com base na informação de mais de doze mil doentes tratados com PR, quantificou-se em 7% a mortalidade específica para TP a 15 anos³⁴.

Quando se consideram estes dados em conjunto, reforça-se a noção de grande eficácia terapêutica associada à PR. No entanto a elevadíssima incidência dos TP, acaba por emprestar um grande impacto à pequena percentagem de doentes em que a PR é ineficaz.

1.4.2.2. Recorrência bioquímica

O PSA (“Prostate-specific antigen”) é uma protéase regulada pelos androgénios e que pertence à família das protéases das caliceínas tecidulares. É produzida principalmente pelo epitélio ductal e acinar da próstata. É secretada para lúmen, onde catalisa a clivagem da semenogelina I e II, e deste modo evita a coagulação do sémen. O PSA também ocorre, embora em níveis muito menores, nas glândulas peri-uretrais, nas glândulas perianais, nas glândulas sudoríparas, na mama, na tiroide e na placenta. Estes órgãos normalmente não contribuem para um nível mensurável de PSA em circulação, quando se utilizam os métodos laboratoriais correntes. Como tal os níveis de PSA após PR, deverão ser indetectáveis³⁷. Após a PR, o PSA deverá

tornar-se indetectável ao fim de 4 semanas.

Quase sempre uma subida do PSA, representa a primeira manifestação de falência de um tratamento local com intuito curativo. Por outro lado, é relativamente fácil e económico obter determinações seriadas de PSA ao longo do seguimento. Como tal, compreende-se com facilidade que a elevação do PSA represente um factor de falência da PR muito utilizado. A elevação do PSA após tratamento focal de intuito curativo é apelidada de recorrência bioquímica (RBQ). Ver definições adiante.

A sobrevivência livre de doença (SLD) é definida como o intervalo de tempo que decorre entre o tratamento da doença primária e o surgimento de manifestações atribuíveis à doença oncológica. SLD e a RBQ podem representar “surrogate endpoints”. Na maioria dos contextos esta “surrogacy” não está validada estatisticamente. Os TP representam um dos contextos em que esta demonstração será mais difícil. Uma história natural longa e variável, leva a que muitos doentes com RBQ nunca cheguem a desenvolver doença clinicamente significativa ou morram de outra causa. Ainda assim estes “endpoints” apresentam vantagens muito apelativas. Dada a sua maior frequência implica a utilização de amostras mais pequenas. Por outro lado, a sua maior precocidade implica um seguimento menos prolongado e não são afetados pelo impacto dos “crossover” e dos tratamentos subsequentes³⁶.

No caso dos tumores da próstata a SLD pode incluir ou não a vertente bioquímica. Na maioria dos casos o reconhecimento da progressão da doença inclui a RBQ. Como tal este “endpoint” confunde-se com frequência com a recorrência bioquímica. A RBQ apresenta a limitação já referida e que advém de uma evolução muito variável. Muitos doentes com RBQ podem não vir a desenvolver doença clinicamente significativa. Na série reportada por Bianco e colaboradores²⁸ a sobrevivência livre de doença foi definida como a ausência de elevação de PSA. Aos 15 anos, em 75% dos doentes não havia evidência de progressão bioquímica da doença. Num outro estudo com mais de 2400 doentes, também com doença localizada, a sobrevivência livre de doença, aos 15 anos, foi de 66%²⁹. As séries publicadas por Hull e por Roehl reportaram, ambas, dados de sobrevivência específica para TP muito elevadas, no entanto revelaram valores de sobrevivência livre de progressão em linha com as restantes séries, respetivamente 75 e 65%^{31,32}. Num artigo de revisão exaustivo, com

a maioria dos dados prévios à massificação do rastreio com PSA, a frequência da RBQ, variou entre 15 a 30 por cada 100 doentes, e de entre estes, 2 a 6 morreram devido a progressão do TP³⁸.

Existem vários outros “endpoints” cuja a utilização ocorre sobretudo em formas mais avançadas de TP, como é o caso dos “endpoints” associados a progressão. Estes pressupõem a existência de doença, clinicamente demonstrável, que se poderá agravar.

1.4.2.3. Sobrevivência livre de metastização

No caso dos TP, a SLD que exclui a dimensão bioquímica e a sobrevivência livre de metastização (SLM) são “endpoints” menos robustos, pois dependem, em grande medida, de métodos de imagem pouco precisos, ainda que estes tenham sofrido uma evolução recente significativa. Como tal estes valores provavelmente espelham de modo impreciso a eficácia da PR. Ainda assim o desenvolvimento de metástases espelha com maior precisão, do que os “endpoints” bioquímicos, a existência de doença clinicamente significativa. A SLM, ao contrário da mortalidade e à semelhança da RBQ e da SLD, tem a desvantagem que advém da variabilidade do tratamento subsequente. Ainda assim este “endpoint” apresenta a vantagem de ultrapassar a heterogeneidade em termos de comportamento biológico e temporal, associada à evolução da RBQ.

Na série reportada por Han e colaboradores a sobrevivência livre de metastização aos 15 anos foi de 82%²⁹. Valor similar foi obtido numa outra série com 1997 doentes tratados com PR entre 1982 e 1997³⁰. Numa análise sistemática muito recente, que incluiu 28 estudos e quase 29000 doentes tentou determinar-se a capacidade da sobrevivência livre de doença e da sobrevivência livre de metastização, como “endpoints” substitutos da sobrevivência global. A SLM, mas não a SLD, é um factor preditor robusto para sobrevivência global³⁹.

Considerados conjuntamente, os dados que avaliam a eficácia oncológica da PR são relativamente homogéneos (quadro 2). Ressalta facilmente a elevada eficácia desta técnica cirurgia. Infelizmente não total, já que em 10 a 30% dos doentes prostatectomizados ocorre progressão da doença. Embora a PR represente uma base sólida, há espaço e necessidade para melhoria.

1.4.3. Abordagem terapêutica após falência da prostatectomia radical

Após a PR, a maioria dos casos em que ocorre progressão, esta começa por ser apenas bioquímica. Ou seja, ocorre uma elevação do valor do PSA, sem tradução sintomática, radiológica ou morfo-funcional. Infelizmente uma parte significativa destes doentes acabam por desenvolver doença clinicamente significativa (DCS), com morbilidade, custos e mortalidade inerentes. Não é consensual a definição de DCS. Na nossa opinião basta uma definição simples e de fácil apreensão. DCS é toda a doença em que é necessário tratamento, quer antineoplásico quer para controlo sintomático ou que conduz a morte causada pelo TP.

No entanto a história natural após a evidencia de falência bioquímica é um fenómeno heterógeno a vários níveis. Esta heterogeneidade condiciona dificuldades acrescidas na abordagem destes doentes. A dificuldade em identificar precocemente os doentes com doença clinicamente significativa, leva a dificuldades na definição da melhor estratégia de seguimento e de abordagem terapêutica. Em termos de seguimento, o impacto de falência bioquímica é grande. Para os sistemas de saúde implica uma maior utilização de recursos. Para os doentes e família representam uma fonte não despiciente de incerteza e medo. Em termos da abordagem terapêutica o panorama é igualmente desanimador. A dificuldade em estabelecer com segurança a gravidade e a localização da doença, tornam as abordagens menos precisas, logo com potencial desperdício e ineficácia.

Um outro factor que acrescenta complexidade a este contexto, passa pela elevada frequência de morte de causa não oncológica. Nestes doentes o risco de morte não oncológica parece ser similar ao risco de morte de causa oncológica³⁸.

1.4.3.1. Variabilidade da história natural após recorrência bioquímica

A nossa eficácia limitada na abordagem da falência bioquímica é tributária, pelo menos em parte, da variabilidade que a caracteriza. Esta por sua vez é, em grande parte, se não totalmente, explicada pelas características biológicas da doença. A variabilidade da RBQ pode ser entendida em várias dimensões: a numérica, a temporal e a espacial.

1.4.3.1.1. Dimensão numérica

Em termos numéricos, os dados disponíveis relativos à frequência de RBQ são relativamente concordantes, ver quadro 2. No entanto, a disparidade parece ser maior no que concerne à evolução de RBQ para DCS e ao tempo que a mesma demora. A série reportada por Freedland incluiu 379 doentes com RBQ após PR. A média do seguimento após cirurgia foi de mais de dez anos. A METP foi de 17%. O tempo de duplicação do PSA, o score de Gleason e o tempo entre a cirurgia e a ocorrência de RBQ (≤ 3 vs. > 3 anos; HR 2,55) foram todos factores de risco significativo para a mortalidade específica por carcinoma da próstata. Trinta e cinco por cento dos doentes com RBQ desenvolveram doença metastática⁴⁰. Um trabalho prévio do mesmo grupo, chegou a resultados similares. Analisou os dados relativos a 304 doentes com RBQ e sem tratamento hormonal, após PR. Trinta e quatro por cento destes desenvolveram doença metastática. Também nesta coorte de doentes, o tempo de duplicação do PSA, o tempo até surgimento de RBQ e o score de Gleason foram factores predictivos para o desenvolvimento de metastização³⁰. Uma outra série, reportou os dados referentes a 346 doentes com RBQ após PR. Não realizaram nenhum tratamento até ao desenvolvimento de metastização. O tempo médio desde a cirurgia até à RBQ foi de 3,1 anos. A sobrevivência a 10 anos foi de 79% e a sobrevivência livre de metastização a 10 anos foi de 46%. Em análise univariável, o score de Gleason, o estágio patológico, o tempo até falência bioquímica e o tempo de duplicação do PSA foram factores predictivos para sobrevivência global e sobrevivência livre de metastização. Em análise multivariável, apenas o tempo de duplicação do PSA manteve a sua capacidade predictiva⁴¹.

Os valores são relativamente similares em ambas as populações e confirmam a noção de que a história natural do TP após RBQ é longa mas variável. Os dados de ambos os grupos apresentam a particularidade de avaliarem grande parte da história natural pós RBQ sem tratamento concomitante. Realidade dificilmente reproduzível à data de hoje.

1.4.3.1.2. Dimensão temporal

Na série de Freedland a mediana de sobrevivência após a RBQ, ainda não tinha sido atingida com mais de 16 anos de seguimento. A média e a mediana de tempo entre

PR e RBQ foi respetivamente 3,5 e 2 anos⁴⁰. Num trabalho anterior, do mesmo grupo, a mediana do tempo entre PR e RBQ e a mediana do tempo entre RBQ e o surgimento de metástases foi respetivamente de 3,5 e 8 anos. A mediana de tempo entre o aparecimento de metástases e a morte foi de 5 anos³⁰. Na série de Antanorakis a mediana de sobrevivência global após a RBQ foi superior a 23 anos. A mediana de sobrevivência livre de metastização após RBQ foi de 9,6 anos⁴¹.

Trata-se de uma doença com uma história natural habitualmente muito prolongada. Por outro lado, sobressai a noção de que uma recorrência bioquímica mais precoce poderá ser um factor prognóstico importante. Nas 3 séries descritas imediatamente acima, o surgimento de uma recorrência bioquímica precoce foi um factor de mau prognóstico inequívoco.

1.4.3.1.3. Dimensão espacial

Um factor primordial, em termos da orientação da abordagem terapêutica passa pelo conhecimento da localização da doença. A subida do PSA pode representar uma recorrência local ao nível da loca e/ou uma disseminação a distância. No primeiro caso justifica-se tratamento focal enquanto que no segundo fará mais sentido tratamento sistémico. É, pois, essencial um correto estadiamento. No entanto a nossa capacidade para definir com precisão a extensão da doença foi, até há pouco, muito limitada. Exames complementares de diagnóstico, como o toque rectal, a ultrassonografia, a cintigrafia óssea e a biópsia, tinham pouca sensibilidade e apenas sinalizavam evidencia de doença numa fase mais avançada³⁸. Dados antigos sugeriram que a RBQ se deve, em grande medida, a micro-metastização sistémica. A recorrência local explicaria a RBQ, em apenas 6 a 19% dos casos. No entanto dados mais recentes, sobretudo anteriores à massificação do rastreio com PSA sugerem uma subvalorização da recorrência local³⁸. Num ensaio aleatorizado, após seguimento de 8 anos, o risco de recorrência local confirmado por biópsia foi de 20%⁴². Num outro estudo com quase 100 doentes com RBQ após PR, biópsia do leito prostático foi positiva em 42% dos casos⁴³. Outros dados parecem sugerir o pouco interesse da biópsia quando realizada sem elementos de ordem semiológica ou imagiológica que consubstanciem a suspeita de recorrência local. Naya e colaboradores demonstraram uma positividade de apenas 29% em 100 doentes

consecutivos não selecionados⁴⁴. Mesmo utilizando conjuntamente o toque rectal, a ultrassonografia e a biópsia, os resultados continuavam a ser insatisfatórios. Scattoni e colaboradores avaliaram o valor preditivo do toque rectal, da ultrassonografia e da biópsia da loca prostática guiada por ultrassonografia, em doentes com RBQ. Em doentes com biopsias positivas a sensibilidade e a especificidade da ultrassonografia e do toque rectal foi respetivamente de 75% e 50% e de 66% e 85%⁴⁵. Apesar da dificuldade metodológica em definir inequivocamente a frequência da recorrência local, existe um dado indireto que reforça a importância da recorrência local. Tratam-se dos dados referentes à utilização de radioterapia externa de salvação, ver adiante “1.4.3.2. Opções terapêuticas”.

Um marco importante, dentro desta problemática, foi dado pela adopção da imagem por ressonância magnética (RM). Um dos primeiros trabalhos que avaliou o desempenho da RM neste contexto, apontou para valores de recorrência local muito mais elevados, em torno dos 80%. No entanto este estudo não realizou confirmação histológica dos casos suspeitos⁴⁶. Ao longo do tempo o desempenho da RM tem melhorado significativamente graças à introdução de vários refinamentos técnicos, como a utilização de protocolos multiparamétricos (combinação de sequencias anatómicas e funcionais) ou a orientação topográfica na realização de biopsias⁴⁷. Uma análise sistemática recente, agregou vários estudos caracterizados pela utilização de confirmação histológica e ou com seguimento após tratamento. A sensibilidade e a especificidade, da RM multiparamétrica, em quase 400 doentes, foi respetivamente de 77 a 100% e de 85 a 87%⁴⁸. Uma outra melhoria técnica recente é a RM de corpo inteiro. Trata-se de uma técnica atrativa mas ainda não estabelecida. No detecção de disseminação óssea a sensibilidade parece ser elevada, mas a especificidade é menor. Por outro lado, o estudo do “compartimento visceral e ganglionar” implica a utilização de outros protocolos. Consequentemente trata-se de um exame demorado e complexo. Os poucos dados disponíveis não parecem sugerir que a RM de corpo inteiro seja superior à PET^{49,50}.

Um outro avanço significativo registou-se com o advento e a generalização da utilização da tomografia de emissão de positrões, sobretudo a tecnologia híbrida que associa a TAC à PET (PET-CT). A combinação das duas técnicas é particularmente atrativa pois são complementares. A PET tem uma especificidade elevada, mas uma

baixa resolução espacial. Por outro lado, a TAC tem uma menor especificidade mas uma maior resolução espacial. Nos últimos anos, vários radioligandos têm sido desenvolvidos e testados em TP. Alguns deles estão limitados pela captação inespecífica na próstata nomeadamente por tecido não neoplásico. Existem múltiplos estudos e análises sistemáticas que os avaliaram em contexto de recorrência bioquímica. Infelizmente muitos destes trabalhos apresentam limitações metodológicas. Não obstante estas limitações, parece ser evidente que os radioligandos associados ao PSMA (“Prostate Specific Membrane Antigen”), destacam-se como sendo os mais sensíveis na avaliação de doentes com RBQ. Outros agentes como o ^{11}C -Acetato, a ^{11}C -Colina, a ^{18}F -Colina e o ^{18}F -FACBC, apresentam uma menor sensibilidade do que o PSMA. Vários estudos com PET-PSMA, reportam uma elevada detecção de doença, superior a 80%, num contexto de RBQ. No entanto muitos destes estudos não utilizaram uma validação robusta dos seus achados⁵¹. Não obstante as múltiplas virtudes a PET/CT também apresenta desvantagens. Aumenta a dose de radiação a que o doente é sujeito. Por outro lado a capacidade de resolução espacial da TAC a nível pélvico é relativamente baixa, nomeadamente ao nível do ápex prostático e da sua relação com a uretra e com o recto⁵².

Uma maneira atrativa de ultrapassar estas limitações, passará pelo desenvolvimento e otimização da tecnologia híbrida que associará PET e RM. Constrangimentos técnicos e sobretudo económicos associados a esta tecnologia, deverão ser mitigados pela sua expectável crescente difusão.

1.4.3.2. Opções terapêuticas

Em face do acima exposto em termos da variabilidade da história natural associada à RBQ e da limitação dos métodos de avaliação de extensão da doença recorrente, é fácil entender que as opções terapêuticas disponíveis também apresentam limitações. O advento da PET e da RM e o seu refinamento, permitiram a identificação cada vez mais frequente de um menor volume de doença. Deste modo muitos doentes anteriormente rotulados como não tendo evidência de doença passariam, à data atual, a serem assumidos como tendo doença metastática.

Consideramos que a revisão teórica da abordagem terapêutica da doença metastática, mesmo a de baixo volume, ultrapassa o âmbito deste trabalho. Como tal os dados que se seguem dizem apenas respeito ao tratamento de doentes sem evidencia de disseminação. Há no entanto que ressaltar o facto de grande parte dos dados, que em seguida se apresentam, terem sido obtidos antes da generalização do uso da PET e da RM.

1.4.3.2.1. Tratamento focal

Existem vários tipos de tratamentos focais, como a Radioterapia externa, a Braquiterapia, a Crioterapia e o HIFU (“high-intensity focused ultrasound”). A RTE, em contexto de RBQ, apresenta a particularidade de ser o único destes métodos que pode ser utilizado sem que haja evidencia morfológica de recorrência e é de longe o mais utilizado. Consequentemente, os dados apresentados em seguida dizem respeito à radioterapia externa. Não obstante os outros métodos podem ter algumas vantagens, possivelmente uma menor toxicidade. Contudo, faltam dados prospetivos que estabeleçam, com maior precisão, as vantagens associadas à utilização destes métodos.

Em relação à RTE realizada após PR, interessa distinguir duas formas diferentes de a realizar: a RTE adjuvante (RTEa) e a RTE de salvação (RTEs). A RTEa é realizada em situações associadas a factores de mau prognóstico, como a existência de margens cirúrgicas positivas, a invasão das vesículas seminais ou a extensão extra-prostática⁵³. Normalmente é realizada pouco tempo depois da PR e não implica a necessidade de evidência bioquímica de doença. A RTEs pressupõe a noção de recorrência limitada da doença após um período de aparente remissão. Este último é variável e como tal também o é a altura em que se realiza a RTEs.

Vários trabalhos mostraram controlo bioquímico da doença associado a RTEs. Este benefício poderá ocorrer em até cerca de metade dos doentes tratados após RBQ⁵⁴. Numa das maiores séries reportadas, com cerca de 500 doentes, a utilização de RTEs traduziu-se numa probabilidade de ausência de progressão bioquímica a 4 anos de 45%. O score de Gleason, o valor de PSA prévio à realização da RTEs, o estado das margens cirúrgicas, a invasão das vesículas seminais e o tempo de duplicação do PSA foram factores preditivos da duração da resposta à RTEs⁵⁵. Exemplos mais recentes

apontam para uma magnitude de benefício similar. Uma população de 285 doentes com RBQ após PR foi tratada com radioterapia externa de salvação. Após uma mediana de seguimento de 5 anos, a sobrevivência livre de progressão bioquímica a 7 anos foi de 37%. Não foi utilizada nem a mesma técnica de RTE nem as mesmas doses para tratar toda a coorte. A utilização de doses superiores ou iguais a 70 Gy não influenciou a resposta bioquímica na população geral, mas parece tender a ter algum impacto positivo no controlo de doença local com tradução morfológica aquando da realização da RTEs⁵⁶. Uma outra série reportou os dados referentes a 472 doentes, também com RBQ após PR. O seguimento médio foi de quase 5 anos. A sobrevivência livre de recorrência bioquímica a 5 anos foi de 73%. O estágio patológico, o score de Gleason, a existência de margem cirúrgica positiva e o PSA prévio à RTEs, foram todos factores preditivos independentes de menor benefício associado à RTEs⁵⁷. Embora com alguma variabilidade os dados disponíveis apontam para uma eficácia relativamente elevada da RTEs. Um das estratégias possíveis, para majorar esta eficácia, passa pelo uso concomitante de hormonoterapia (HT). Os dados referentes à utilização combinada de RTEs e de HT são limitados. Mas por outro lado, é inequívoco o seu interesse, no tratamento do TP em órgão intacto. O potencial interesse desta estratégia foi reavivado recentemente, com a publicação de um ensaio de fase 3, com mais de 700 doentes. Importa ressaltar que se tratavam de doentes com persistência bioquímica e não doentes com RBQ estabelecida após negatização inicial do PSA. Os doentes foram aleatorizados para realização de RTEs associada a Bicalutamida 150 mg por dia versus placebo, durante 2 anos. Após um seguimento prolongado (mediana de 13 anos) a utilização de Bicalutamida, traduziu-se numa diminuição significativa da mortalidade, da mortalidade associada a carcinoma da próstata e do aparecimento de doença metastática⁵⁸. Dados de três ensaios em curso (“RTOG 0534”, “RADICALS-HD” e “GETUG-16”) deverão, definitivamente, estabelecer qual o interesse da utilização concomitante de hormonoterapia associada a RTEs.

A eficácia da RTEs não é igual em todos os doentes. Tal como noutras intervenções terapêuticas existem factores preditivos que permitem antecipar um eventual sucesso. Em seguida descrevem-se alguns destes factores preditivos, associados à realização de RTEs:

- O benefício da RTE de salvação parece aumentar quando esta é realizada com valores mais baixos de PSA. Uma análise sistemática que incluiu 10 estudos mostrou que o benefício em termos de sobrevivência livre de recorrência bioquímica foi superior em doentes com PSA inferior ou igual a 0,5 ng/mL. Estes dados sugerem benefício associado a realização precoce da RTEs⁵⁹. Existem outros dados que sugerem benefício com realização ainda mais precoce, com valores de PSA inferiores a 0,2 ng/mL⁶⁰.
- Descida precoce do PSA. Uma descida de PSA objectivável na quinta semana de tratamento com RTEs, parece relacionar-se com diminuição da progressão bioquímica posterior⁶¹.
- Nadir acentuado da resposta bioquímica. Dados de mais de 300 doentes sugerem que um nadir de PSA inferior a 0,1 ng/mL, relaciona-se com diminuição das recorrências e com melhor sobrevivência global⁶⁰. Um outro trabalho também relacionou magnitude da resposta bioquímica com maior benefício associado à RTEs⁶².
- Tempo de duplicação de PSA (TD PSA) inferior a 3 meses após RT. Nos dados reportados por Goenka e colaboradores, um TD PSA inferior a 3 meses, foi o único factor preditivo independente para o desenvolvimento de metastização⁵⁶.
- Tradução morfológica ao nível da loca de prostatectomia. Dados antigos sugerem que a eficácia da RTEs poderá ser menor quando existe tradução morfológica, da RBQ, ao nível da loca de prostatectomia^{63,64}. No entanto fica por apurar se esta noção continua a ser válida à data de hoje, com o uso de técnicas de radioterapia mais evoluídas. Estes doentes, do ponto de vista teórico, são candidatos para hormonoterapia neoadjuvante e concomitante. A diminuição do tamanho e radiosensibilização associadas à HT, poderiam contrariar o pior prognóstico aparente destes doentes.
- Outros factores clínico-patológicos identificados mais precocemente na história natural da doença também poderão ter impacto na resposta à RTEs. Tal como descrito anteriormente, no trabalho de Briganti e colaboradores, o estágio patológico, o score de Gleason, a existência de margem cirúrgica

positiva e o PSA prévio são factores preditivos com impacto negativo⁵⁷. O impacto destes factores já tinha sido sugerido por trabalhos prévios⁵⁵.

Embora os dados sejam maioritariamente retrospectivos e apresentem alguma heterogeneidade, parece plausível aceitar que a utilização de RTEs pode conduzir a respostas muito prolongadas e eventualmente definitivas. Esta realidade é consubstanciada pelas recomendações emanadas por várias “guidelines” internacionais. A utilização de RTE de salvação é sugerida pela European Association of Urology e pela European Society for Radiotherapy and Oncology⁶⁵, pela American Society of Clinical Oncology⁶⁶, pela American Urological Association e pela American Society for Radiation Oncology⁶⁷.

1.4.3.2.2. Tratamento sistémico

O tratamento sistémico realizado sob a forma de hormonoterapia, pode ser, em determinados casos de RBQ, a principal opção terapêutica. A HT é utilizada, sobretudo, após a falência da RTEs. Poderá também ser utilizada como primeira linha de tratamento quando a RTEs está contraindicada ou é recusada pelo doente. Em relação à RTEs, a HT apresenta a grande desvantagem de não ser uma estratégia curativa. A hormonoterapia que resulta na deprivação de androgénios pode ser realizada por métodos cirúrgicos ou farmacológicos. Os farmacológicos implicam a utilização de várias classes de fármacos: agonistas da GNRH; antagonistas da GNRH e anti-androgénios.

Não existem dados que suportem o uso da HT em doentes com RBQ, sem evidência morfológica de doença. Uma possível vantagem associada a uma utilização precoce durante a história natural do TP, é inferida de um estudo, em que a HT foi utilizada como tratamento adjuvante. Avaliaram-se doentes tratados cirurgicamente (PR e linfadenectomia) e com evidência de metastização ganglionar. Os doentes foram aleatorizados entre início imediato, de HT, ou após aparecimento de doença metastática. O recrutamento ficou aquém do estipulado. Dados de 98 doentes seguidos durante 12 anos, sugerem que a utilização imediata aumenta significativamente a sobrevivência específica para TP e a sobrevivência livre de progressão⁶⁸. Embora com importantes limitações metodológicas este estudo sugere que a implementação de HT previa à evidencia morfológica de progressão, poderá

ser benéfica⁶⁹.

Para além da utilização ou não de HT, também a altura em que a mesma deve ser iniciada é um aspeto debatível. Alguns doentes preferem adiar o início da HT de modo a evitarem a sua toxicidade. Outros, vítimas da “ditadura” do PSA, preferem começar imediatamente o tratamento. Os dados disponíveis não permitem definir qual a melhor altura para iniciar a HT. O estudo referido imediatamente acima sugere interesse associado a uma utilização mais precoce. Um outro ensaio recente, de fase 3, incluiu doentes com RBQ (n=261) e doentes sem indicação para tratamento da doença primária com intuito curativo (n=32). Os doentes foram aleatorizados entre início imediato ou deferido de HT. A mediana do seguimento foi de 5 anos. A sobrevivência global a 5 anos foi de 86,4% com o tratamento diferido e de 91,2% com o tratamento imediato (HR=0,55). A toxicidade foi similar em ambos os grupos⁷⁰. Alguns dos doentes incluídos apresentavam doença metastática. Quando estes doentes foram excluídos da análise, o benefício em termos de sobrevivência perdeu-se.

Na prática quotidiana é frequente adiar o início da HT até o tempo de duplicação do PSA ser inferior a 3 a 6 meses. A importância do tempo de duplicação do PSA (TD PSA) foi sugerida numa série anteriormente referenciada. Antonarakis e colaboradores mostraram que o TD PSA, em análise multivariável, foi o factor preditivo independente mais robusto para identificação de desenvolvimento de metastização. Um TD PSA < 3 meses associou-se a sobrevivência livre de metastização de apenas 5%. Nos doentes com tempo de duplicação de PSA superior a 15 meses, esse valor passou para 91%⁷¹. Um outro trabalho da mesma instituição reforça o valor prognóstico do tempo de duplicação do PSA. Numa análise de 146 doentes, provenientes de 4 ensaios de fase II com agentes não hormonais, voltou-se a mostrar que o tempo de duplicação do PSA é um factor preditivo independente para o desenvolvimento de metastização⁷². À falta de melhor, os dados disponíveis emprestam ao tempo de duplicação de PSA, a consistência suficiente para orientar o momento em que se deve iniciar a HT. Uma vez iniciada a HT, uma outra questão prende-se com a utilização contínua versus utilização intermitente. Uma utilização intermitente, tem a vantagem de limitar a toxicidade, mas poderá ter algum impacto negativo sobre a eficácia. Em relação a esta questão, em contexto de RBQ, existe

evidência científica que nos permite orientar a abordagem terapêutica. Num ensaio de fase 3, foram avaliados cerca de 1400 doentes com progressão bioquímica após realização de RT definitiva ou RT de salvação. Os doentes foram aleatorizados entre HT contínua ou intermitente. A mediana de seguimento foi de cerca de 7 anos. A terapêutica intermitente associou-se a uma melhor qualidade de vida, sem impacto negativo significativo sobre a sobrevivência global. Esta foi de 8,8 anos com a terapêutica intermitente e de 9.1 anos com a contínua (HR=1,02)⁷³.

A recomendação, por parte de sociedades internacionais, do uso da HT é muito menos explícita do que em relação à RTE de salvação. A “European Association of Urology” sugere que a HT deverá ser reservada para doentes em que exista uma esperança de vida elevada e um maior risco de progressão. Define-os através de um tempo de duplicação de PSA curto (< 6-12 meses) e de um score de Gleason inicial elevado (> 7). Nos outros casos, o uso da HT deverá ser cuidadosamente ponderada⁶⁵. A RBQ embora tenha uma frequência variável, ocorre apenas numa minoria dos doentes. A maioria destes casos estão assintomáticos e não tem evidência morfológica de doença. Não obstante há que considerar o impacto psicológico da recorrência, o qual leva muitas vezes o doente a apressar a adoção de uma estratégia terapêutica ativa. Infelizmente as estratégias terapêuticas primam pela pouca eficácia. A RTE de salvação conseguirá resgatar no máximo cerca de metade dos doentes. Enquanto que o tratamento sistémico, controla a doença apenas na perspectiva de médio prazo. O panorama da abordagem terapêutica da RBQ, reforça a nossa convicção de que o esforço máximo de otimização deverá ser feito, temporalmente, em torno do tratamento da doença primária. A via mais óbvia de otimização passa pela intensificação terapêutica. No entanto esta tem custos elevados em termos de toxicidade e económicos. Como tal é essencial melhorar o nosso conhecimento de factores preditivos e prognósticos, que nos permitam identificar com segurança os doentes com doença mais agressiva.

1.5. Definições de recorrência bioquímica

Tal como acontece em muitas áreas do saber médico, a variabilidade biológica associada à insuficiência do nosso conhecimento conduzem, amiúde, a uma complexidade excessiva. Em 2007, um grupo de trabalho criado pela “American

Urological Association” avaliou as várias definições de RBQ. Apenas considerando os doentes tratados com PR, encontraram 145 artigos que continham 53 definições diferentes. A mais frequente, em 35 dos artigos, definia RBQ com um valor de PSA > 0,2 ng/mL. Se também levássemos em linha de conta os doentes tratados com RTE, o número de definições subia para 161⁷⁴. Não obstante trata-se de “endpoint” muito utilizado para quantificar o sucesso associado à PR. Como tal, é essencial que exista alguma homogeneidade que permita comparar diferentes estudos e resultados.

1.5.1. Definições de recorrência bioquímica utilizadas nas recomendações clínicas internacionais

O trabalho da “American Urological Association”, imediatamente acima referido, foi frutífero, pois o grupo de trabalho recomendou a definição de RBQ através de um valor de PSA > 0,2 ng/mL, confirmado por um segundo valor de PSA também maior do que 0,2 ng/mL⁷⁴. Uma definição semelhante é utilizada pela “European Association of Urology”. De acordo com esta associação, a RBQ é definida por dois valores consecutivos, em crescendo, de PSA > 0,2⁶⁵. No entanto, mesmo considerando apenas as recomendações clínicas internacionais, o cenário não é homogêneo. A recomendação da “National Comprehensive Cancer Network” referente a tumores da próstata, define RBQ como a não descida de PSA para níveis indetetáveis ou a subida do mesmo em duas ou mais determinações subsequentes, sem especificar um limiar numérico⁷⁵.

1.5.2. Definições alternativas

Dos múltiplos estudos que procuraram definir a RBQ, existem vários que merecem referência individualizada. A utilização de limiares diferentes, nomeadamente mais baixos, para definir RBQ, têm o atrativo teórico de poder otimizar uma eventual terapêutica de salvação. Por outro lado, acarreta o constrangimento de poder conduzir ao encarniçamento terapêutico, pois poder-se-á tratar doentes que não o necessitem. O do grupo de Stephenson, merece referência pela quantidade de doentes incluída no estudo, mais de 3000. A mediana de seguimento desta população foi de 49 meses. Das várias definições de RBQ estudadas, em número de 10, a que utilizou um limiar de PSA de 0,4 ng/mL, associado a aumento posterior, foi

a que melhor conseguiu prever o surgimento de metastização⁷⁶. Estes doentes foram tratados entre 1985 e 2004. Parte deles foi seguido com base em metodologia de quantificação de PSA datada (limite inferior de deteção entre 0,05 e 0,3 ng/mL). Este dado leva os autores a sugerirem que 0.2 poderá ser um limiar mais adequado. Tanto mais que este limiar esteve associado a uma progressão bioquímica adicional em mais de 90% dos doentes. Contudo, o seguimento dos doentes não foi homogéneo, sendo que alguns deles foram tratados com HT durante o período do estudo.

Existem várias possibilidades para a otimização da definição da RBQ. Uma delas, crescentemente evidente na literatura passa pela adoção de limiares mais baixos. Uma outra via, conceptualmente mais promissora, passa pela utilização de limiares variáveis, ajustados à gravidade inicial da doença. Metodologicamente implicaria estudos com muitos mais doentes e por outro lado dependeria da consistência dos atuais factores de prognóstico, o que não é inquestionável. No entanto os dados disponíveis sugerem a validade desta estratégia. O grupo de Mir avaliou, em mais de 2300 doentes, catorze definições. Agrupou-as em 3 conjuntos. O grupo A com uma determinação única e limiar inferior ou igual a 0.1. O grupo B com o mesmo limiar mas implicando necessidade de aumento adicional. O grupo C com limiar maior ou igual a 0,2, com ou sem aumento progressivo. Estratificou os doentes em dois grupos: com factores histopatológicos de mau prognóstico (pT3B, pN1–3 ou score de Gleason entre 8 e 10) e de bom prognóstico (pT2, score de Gleason de 6 ou pT2, score de Gleason de 3+4 e margem cirúrgica negativa). Após atingir a definição de RBQ, utilizou como “endpoints” uma progressão (adicional) de PSA e uma “progressão de tratamento” (definida como utilização de tratamento local, tratamento sistémico, progressão clínica ou morte associada a TP). A estratificação por factores histopatológicos, no grupo A, conduziu a diferenças notórias. Em doentes com factores de bom prognóstico ocorreu progressão de PSA em 10 a 28% e progressão de tratamento entre 1 e 6%. Nos com factores de mau prognóstico a progressão de PSA ocorreu em 71 a 88% e progressão de tratamento ocorreu 36 a 66%. Estas diferenças foram menos evidentes nos grupos B e C⁷⁷. Esta informação poderá ser muito útil na identificação de doentes de alto-risco, nos quais seria possível antecipar a RTEs. Um outro estudo de grande dimensão, também, sugere o

interesse do conceito de limiar variável ajustado a informação prognóstica. Mais de 3600 doentes foram estratificados, em 3 grupos de risco, com recurso ao score CAPRA (“Cancer of the Prostate Risk Assessment post-Surgical”). Utilizaram-se 4 definições de RBQ (limiares de 0,05, 0,2 e 0,4 e limiar definido pelo grupo de risco). Avaliou-se a progressão bioquímica adicional após RBQ. Esta variou de acordo com o grupo de risco e com a definição de RBQ. No grupo de baixo risco foi entre 7 e 37%. No grupo de risco intermédio foi de 22 a 58% e de 60 a 86% no grupo de alto risco. Levando em linha de conta as definições de RBQ, a progressão bioquímica adicional foi de 49% para o limiar de 0,05, de 62% para o limiar de 0,2, 65% para o limiar de 0,5 e 68% para a ajustada ao grupo de risco ⁷⁸.

1.5.3. Recorrência bioquímica precoce

O intervalo de tempo entre a cirurgia e o surgimento da RBQ parece ter importância prognóstica, embora esta noção não seja universalmente aceite. Um menor tempo entre a cirurgia e a RBQ (RBQ “precoce”), parece acarretar um pior prognóstico, quando comparado com RBQ mais tardias. Contudo, mesmo os trabalhos que suportam esta noção, não são coincidentes quanto ao intervalo de tempo que define um pior prognóstico. Como tal, a noção de RBQ precoce parece ter suporte, mas está longe de estar definida e estabelecida. Num trabalho referenciado anteriormente, o grupo de Pound mostrou que a uma RBQ que ocorre nos primeiros dois anos após PR, está associada a um aumento de 20% da progressão metastática a 5 anos, quando comparada com RBQ mais tardias³⁰. O grupo de Freedland chegou a resultado similar, mas com um intervalo de tempo diferente. Uma RBQ que ocorreu nos primeiros três anos após PR aumentou em 3,5 vezes o risco de mortalidade específica por TP⁴⁰. Para Walz e colaboradores a ocorrência precoce de RBQ, após a PR, representa um evento muito desfavorável na história natural dos TP tratados. Está associada com progressão metastática precoce e com a mortalidade específica por TP⁷⁹. Existem vários outros trabalhos que reforçam o impacto prognóstico de RBQ mais precoce⁸⁰⁻⁸³.

1.6. Factores preditivos de falência da prostatectomia radical

Em seguida realiza-se uma revisão dos vários factores, que podem influenciar o risco de desenvolvimento de RBQ. Ressalta a grande quantidade de factores preditivos que poderão, com maior ou menor precisão, estimar a possibilidade de desenvolvimento de RBQ. Para além do impacto variável, também a consistência dos dados que o suportam é variável. A literatura é abundante, mas nem sempre concordante. Estas razões constituem-se como argumentos adicionais, que reforçam a necessidade de otimização.

1.6.1. Factores anatómicos

Embora a anatomia da próstata, por si só, não possa ser assumida como factor de risco para o desenvolvimento de RBQ, esta apresenta determinadas particularidades que poderão ajudar a explicar o fenómeno da RBQ. O nosso conhecimento da anatomia da próstata é em grande medida tributária dos trabalhos de McNeal ⁸⁴. A próstata foi reconhecida como um órgão anatomicamente heterogéneo e composto por quatro zonas anatómicas:

- Zona periférica.
- Zona central.
- Região pré-prostática.
- Estroma fibromuscular anterior.

Estas zonas são condensadas por uma camada de tecido fibromuscular que constitui a cápsula da próstata. Esta é constituída por uma camada interna de fibras musculares e uma membrana externa de colagénio. Contudo, as quantidades destes constituintes varia consoante a área da próstata. Na face interna da cápsula, as fibras musculares interligam-se às fibras musculares lisas do tecido peri-glandular. Por seu lado, a face externa interliga-se e funde-se com o tecido conjuntivo peri-prostático. Como tal, a cápsula prostática não pode ser entendida como uma estrutura bem definida e de características constantes. Para além disso a região mais anterior da glândula nem sempre exhibe uma verdadeira cápsula reconhecível histologicamente. Adicionalmente a cápsula pode estar entrelaçada com fibras musculares esqueléticas que emanam do diafragma urogenital e dos elevadores do

ânus. Por fim há ainda que ao nível da face anterior, a cápsula é atravessada por vasos sanguíneos. Na face posterior a espessura da cápsula é maior⁸⁵. Esta complexidade leva alguns autores a defenderem que a próstata não tem uma verdadeira cápsula⁸⁶. Este facto traduz-se numa dificuldade acrescida em termos cirúrgicos, e que do ponto de vista teórico poderia facilitar a extensão direta dos TP. As células com capacidade de migração poderiam tirar partido das múltiplas soluções de continuidade e, deste modo, explicar a persistência local da doença, mesmo quando as margens cirúrgicas são negativas.

1.6.2. Factores clínicos

Existem vários factores clínicos com implicações prognósticas. Os mais bem estabelecidos são o PSA pré-operatório e o estágio clínico. Estes podem ser informativos e fornecerem uma ideia relativamente clara da agressividade da doença. Contudo, nenhum deles é suficientemente robusto para ser utilizado isoladamente, enquanto modificador da abordagem terapêutica. Uma estratégia que permite ultrapassar esta limitação dos factores individuais, passa pela utilização combinada de vários deles, em ferramentas como os esquemas de estratificação de risco.

1.6.2.1. Esquemas de estratificação de risco

Os esquemas de estratificação de risco procuram definir o risco de recorrência da doença, em vários momentos da história natural dos TP. Como tal, são do ponto de vista teórico, ferramentas muito importantes para a definição da abordagem terapêutica mais adequada. A prova disso está a quantidade de esquemas disponíveis na literatura. Numa análise, já algo datada, foram documentados 109 modelos de estratificação, embora apenas 68 tivessem sido validados⁸⁷. Em condições ótimas estas ferramentas permitiriam adequar a intensidade do tratamento à gravidade da doença, à esperança de vida do doente e às suas preferências. Deste modo, maximizar-se-iam as hipóteses de cura, enquanto se diminuiriam as abordagens terapêuticas excessivas, preservando a qualidade de vida. Isto num modelo de doença, o carcinoma da próstata localizado, que prima pela heterogeneidade. Partin e colaboradores desenvolveram um dos primeiros esquemas de estratificação de

risco amplamente plebiscitado. Entre 1982 e 1996 recolheram os dados relativos ao PSA pré-operatório, estádio clínico (TNM) e score de Gleason da biópsia. Com esta informação criaram um modelo preditivo do estádio patológico após PR. Mais tarde atualizaram estes dados com base em ajustes nas categorias do PSA e do score de Gleason. Recolheram os dados referentes a mais de 5000 doentes, tratados com PR após 1994. A atualização traduziu-se numa melhor capacidade de predição da doença clinicamente localizada⁸⁸. A precisão desta ferramenta foi validada em diversos estudos, mesmo em populações mais contemporâneas⁸⁹. No entanto esta ferramenta prediz o estádio patológico, o qual não possui uma capacidade prognóstica perfeita. Existem muitos doentes que partilham factores anatomopatológicos adversos após PR, mas não têm todos, de modo uniforme, mau prognóstico.

Importava ir mais longe através da adoção de “endpoints”, com maior capacidade prognóstica. Os trabalhos de D’Amico nesta área do conhecimento foram basilares. Os estudos deste grupo criaram três grupos de risco, baseados no estádio T clínico, no score de Gleason e no PSA pré-operatório. Para além de avaliar a RBQ, este trabalho foi mais abrangente, pois incluiu doentes tratados com cirurgia, radioterapia e braquiterapia⁹⁰. O facto de a AUA⁹¹ e a NCCN⁷⁵ terem adotado esquemas de estratificação de risco muito similares ao proposto por este autor, atestam a importância deste modelo. Contudo, este modelo foi refinado, com a entrada em linha de conta da extensão da doença ao nível da biópsia e com um reajuste das categorias extremas (doença de muito baixo risco e de muito alto risco). No entanto a classificação de D’Amico também apresenta limitações. Não distingue entre as subcategorias que constituem o score de Gleason 7 (“3+4” e “4+3”), sobreestima a importância do estádio T, não leva em linha de conta a extensão do envolvimento da biópsia nem de vários outros factores⁹². Talvez a maior limitação passe pela heterogeneidade da população incluída em cada um dos grupos de risco. Num estudo com mais de 4000 doentes classificados como risco intermédio pelo esquema da NCCN, avaliou-se a sobrevivência livre de RBQ. Esta foi significativamente diferente consoante os diferentes parâmetros usados para inclusão no grupo de risco intermédio. Com base no estádio clínico, a sobrevivência livre de RBQ a 10 anos foi 88,8%, enquanto que as associadas ao PSA e ao score de

Gleason, foram respetivamente 79,5 e 73,6%. Esta heterogeneidade também foi patente nos doentes classificados como sendo de alto risco⁹³.

Um outro esquema de estratificação de risco que importa referir é o score de CAPRA (quadro 3).

Quadro 3. Esquema “Cancer of the Prostate Risk Assessment” (CAPRA).

Variável	Nível	Pontos	Variável	Nível	Pontos
PSA	2,0 - 6	0	Estádio T	T1/T2	0
	6,1 - 10	1		T3a	1
	10,1 - 20	2	% bx pos¹	<34%	0
	20,1 - 30	3		≥ 34%	1
	>30	4	Idade	<50	0
		≥50		1	
Gleason	1-3/1-3	0			
	1-3/4-5	1			
	4-5/1-5	3			

¹ Percentagem de biópsia positiva

Este foi esquema foi desenvolvido de modo a combinar a precisão de uma análise multivariável com a simplicidade de um score, que dispensa cálculos complicados ou a necessidade de um computador informático. Foi validado por múltiplos estudos e em vários contextos: doentes tratados com cirurgia, com radioterapia e com hormonoterapia em primeira linha. Uma análise sistemática acerca do desempenho do score CAPRA, incluiu 13 estudos de CAPRA, 4 estudos de CAPRA-S (especificamente para o contexto pós-cirúrgico) e 5 estudos de CAPRA-J (Hormonoterapia em primeira linha). Confirmaram o bom desempenho, em contexto académico e clínico não académico, no que concerne à RBQ. No CAPRA-S demonstrou-se, também, um desempenho favorável em relação a “endpoints” de mais longo prazo. Também o CAPRA-J teve um desempenho muito bom⁹⁴. Vários estudos mostraram que o CAPRA parece ser superior aos esquemas da NCCN e AUA⁹².

Existem muitos outros modelos de risco, derivados de análises multivariáveis. Muitos deles foram apresentados sob a forma de nomogramas. Oferecem, frequentemente, uma estratificação superior à do esquema de D’Amico. No entanto a sua utilização pode ser fastidiosa e difícil de explicar ao doente. Por outro lado, a

base matemática subjacente aos nomogramas, na maior parte das vezes não é publicada, dificultando a sua validação e utilização em investigação. Nem sempre os estudos de validação obtêm resultados sobreponíveis⁹². Existem numerosos nomogramas que entram em linha de conta com vários factores clínicos e patológicos. Também o objetivo que procuram predizer é variado. Em seguida enumeram-se alguns exemplos:

- Nomogramas preditivos de RBQ. São numerosos, no entanto existem determinados aspetos que diferenciam alguns destes nomogramas. Por exemplo, Suardi desenhou o nomograma com maior alcance temporal: Quinze anos⁹⁵. Kattan desenhou um outro que entra em linha de conta com a experiência do cirurgião⁹⁶.
- Nomograma preditivo de RBQ precoce. Walz e colaboradores desenvolveram um nomograma preditivo de RBQ precoce. Esta foi definida como aquela que ocorre nos primeiros dois anos. O PSA pré-operatório, o score de Gleason, a extensão extracapsular, a invasão das vesículas seminais, o estado da margem cirúrgica e o estágio N, associaram-se a RBQ precoce em análise multivariável⁷⁹.
- Nomogramas preditivos de progressão metastática após desenvolvimento de RBQ.
- Nomogramas preditivos de mortalidade específica por tumor da próstata após desenvolvimento de RBQ.
- Nomogramas preditivos de resposta a RTE de salvação.

Não é claro qual a melhor ferramenta para utilizar no quotidiano, não obstante, e talvez por isso mesmo, o grande número de opções disponíveis. Os esquemas derivados dos trabalhos de D'Amico parecem estar ultrapassados. Os nomogramas, mesmo os que foram corretamente validados, são muito pouco utilizados na prática clínica e investigacional. O score CAPRA parece ser a melhor ferramenta disponível e é contra ela que os testes genéticos emergentes estão a ser avaliados. Apesar dos dados disponíveis e da evolução que sofreram, os esquemas de estratificação de risco são subutilizados na prática diária. Talvez porque no entendimento da maior parte dos clínicos, não são suficientemente fiáveis para ditarem uma modificação da abordagem terapêutica.

1.6.2.2. PSA e parâmetros derivados de PSA

O PSA é utilizado como dado com importância clínica ao longo de toda a história natural da doença. Desde o rastreio até à avaliação de resposta em doenças resistentes a castração, passando pela monitorização da eficácia do tratamento primário. Não obstante existem muitas controvérsias acerca do verdadeiro interesse do PSA, enquanto factor preditivo. Este facto levou à realização de múltiplos trabalhos que avaliaram vários parâmetros baseados no PSA, como por exemplo a percentagem de PSA livre, tempo de duplicação de PSA, velocidade de PSA e densidade de PSA. Quando estes dados são considerados em conjunto, parecem indicar que nenhum destes parâmetros tem consistência suficiente para ser utilizado isoladamente. No entanto são utilizados com muita frequência em esquemas de estratificação de risco. Em relação à RBQ, o valor de PSA é simultaneamente o seu definidor e um factor de risco para o seu desenvolvimento. Antenor e colaboradores avaliaram mais de 2800 doentes com estádio clínico T1c e tratados com PR. O valor pré-operatório de PSA, considerado como variável categórica, discriminou a probabilidade de doença confinada ao órgão, score de Gleason da peça e sobrevivência livre de progressão bioquímica a 10 anos⁹⁷. O tempo de duplicação de PSA, provavelmente o mais estudado dos parâmetros derivados do PSA, não avalia o risco de RBQ. Antes define o risco de a doença se tornar clinicamente significativa após a ocorrência da RBQ³⁸. Este facto foi confirmado por vários estudos. A relativa consistência dos dados associados a este parâmetro, faz com que o mesmo seja utilizado, amiúde, na decisão de quando iniciar tratamento, em doentes com RBQ e sem evidência morfo-funcional de doença. Em relação a este parâmetro, persiste a dúvida de qual o limiar de duplicação que deverá ser aceite como efetivamente preditivo de pior prognóstico (3 ou 6 meses).

1.6.2.3. Outros

Existem vários outros factores, cuja presença poderá estar associada ao aumento do risco de RBQ. A idade não parece ser um factor de risco para RBQ⁹⁸⁻¹⁰⁰. No entanto é parte integrante do score CAPRA e tem importância na definição de qual a melhor abordagem terapêutica para a doença localizada.

O tipo da abordagem cirúrgica através da qual é efetuada a prostatectomia também parece não ser um factor de risco. Como discutido acima, a PR foi alvo de vários refinamentos técnicos que parecem ter tido mais impacto em termos de complicações cirúrgicas do que em termos de eficácia oncológica. Apesar da grande quantidade de dados não aleatorizados, alguns dispares, a via minimamente invasiva ainda não conseguiu superiorizar-se inequivocamente à via aberta, exceto na diminuição da duração da hospitalização e na necessidade de suporte transfusional^{101,102}. Uma análise sistemática, muito vasta, baseada em 4 centenas de artigos (mais de 286 mil doentes) confirmou a equivalência em termos de frequência de margens cirúrgicas positivas, e mais uma vez sugeriu uma menor taxa de complicações associadas à via minimamente invasiva¹⁰³. Quando se considera uma técnica cirúrgica há que levar em linha de conta a experiência do cirurgião. A curva de aprendizagem associada às técnicas minimamente invasivas poderá ter algum impacto na frequência de margens cirúrgicas positivas. Um dos trabalhos do grupo de Sooriakumaran mostrou a relação entre a experiência do cirurgião e a frequência de margens cirúrgicas positivas¹⁰⁴. O impacto do volume cirúrgico está demonstrado na maior parte das doenças oncológicas. No caso dos TP esta realidade parece ser independente da técnica cirúrgica utilizada para realizar a prostatectomia. Está demonstrada uma relação inversa entre a experiência do cirurgião e a probabilidade de ocorrência de RBQ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

O tempo entre a biópsia e a cirurgia poderá ser, conceptualmente, um factor de risco para RBQ. A biópsia resulta numa solução de continuidade entre o tecido tumoral e o peri-prostático. Células neoplásicas com capacidade de migração poderiam tirar partido destes “canais” para acederem ao tecido peri-prostático. Deste modo não seriam removidas cirurgicamente e poderiam explicar a recorrência da doença. Apesar de ser teoricamente atrativo, a literatura disponível não é concordante. Um trabalho relativamente recente sugere a possibilidade deste intervalo poder ter algum impacto em termos prognósticos, sobretudo em doentes de alto risco. Mas mesmo nestes a cirurgia poderá ser adiada até cerca de um ano¹⁰⁸. Por outro lado, há trabalhos que sugerem o contrário. Vickers e colaboradores não encontraram nenhuma relação entre o aumento deste intervalo e a sobrevivência livre de RBQ. No entanto os autores chamam a atenção para o facto de terem obtido

intervalos de confiança muito grandes¹⁰⁹. Um resultado semelhante foi obtido pelo grupo de Boorjian¹¹⁰. Apesar da dúvida quanto ao impacto prognóstico, esta não parece existir quanto à exequibilidade da cirurgia. Um intervalo muito curto entre a biópsia e a PR, inferior a 6 semanas, não parece ter impacto em termos cirúrgicos^{111,112}.

A síndrome metabólica é uma condição clínica muito frequente, sobretudo nos países ocidentais. Caracteriza-se por obesidade visceral, hipertensão arterial, hiperglicémia e dislipidémia. Está associada a complicações cardiovasculares e metabólicas. No que concerne aos TP poderá explicar, pelo menos em parte, as diferenças de incidência a nível global. Poderá também contribuir para um comportamento biológico mais agressivo. Para tentar esclarecer este ponto, Gacci e colaboradores realizaram uma análise sistemática e uma metaanálise. Avaliaram 24 estudos (132582 doentes). Um pouco mais de 17% dos doentes, sofriam de síndrome metabólica. Esta parece ter algum impacto no aumento da incidência. A associação com pior prognóstico foi mais evidente. A presença de síndrome metabólica está associada a maior frequência de factores anatomopatológicos de mau prognóstico e a aumento da RBQ¹¹³.

1.6.3. Factores histológicos

Os factores histológicos com possível impacto preditivo e prognóstico são muito mais numerosos do que os clínicos e os dados que os validam mais completos e mais robustos. Não obstante esta realidade, muito poucos de entre eles conseguem, por si só, ter suficiente poder discriminatório para alterar a abordagem terapêutica. À semelhança do que se passa com os factores clínicos, são por vezes integrados em esquemas de estratificação de risco.

1.6.3.1. Diferenciação histológica - score de Gleason e classificação de Epstein

Nos adenocarcinomas da próstata o grau de diferenciação tem muita importância preditiva e prognóstica, facto reconhecido desde meados do século passado.

A classificação histológica dos TP confunde-se com o score de Gleason (SG). Este foi descrito na década de 60 do século passado e assume-se até aos dias de hoje como uma ferramenta basilar. O SG baseia-se em 5 padrões distintos (figura 2).

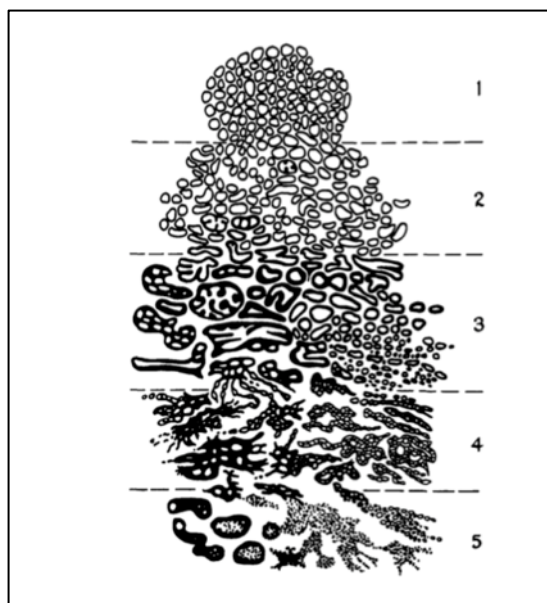


Figura 2. Padrões histológicos que constituem o score de Gleason. Adaptado de Gleason¹¹⁴.

Cada padrão é descrito por uma escala de 1 a 5. O valor 1 representa o mais bem diferenciado e o 5, o menos bem diferenciado. Dada a heterogeneidade dos TP, coexistem no mesmo tumor vários padrões. O SG resulta do somatório dos dois padrões mais frequentes. Como tal do ponto de vista teórico pode variar entre 2 (1+1) e 10 (5+5)¹¹⁴. Desde cedo se percebeu a capacidade discriminativa, em termos de prognóstico, do SG. Os dados que o suportam são múltiplos e têm aumentado ao longo dos anos. O SG pode ser preditivo dos achados patológicos, da RBQ, da recorrência local ou a distância, em doentes não tratados bem como em doentes que foram tratados com PR, com radioterapia e com outras terapêuticas¹¹⁵. A elevada robustez do SG tem tornado difícil a sua melhoria. Ao longo dos anos a “International Society of Urological Pathology” (ISUP) tem organizado reuniões em que procuram melhorar e adaptar o SG à evolução da prática médica. Em 2005 as mudanças introduzidas foram ao nível da arquitetura glandular do padrão 3 e aumentaram a abrangência do padrão 4, que passou a incluir o padrão cribiforme. Em 2010 ocorreram acertos adicionais quanto aos critérios de diagnóstico do padrão 3. Em 2014 recomendou-se, entre outras, a quantificação do padrão 4, nas biopsias e nas peças com SG de 7, e clarificou-se o padrão de alto grau¹¹⁶. Não obstante a

qualidade basal e as melhorias progressivas, o SG continua a apresentar diversas limitações¹¹⁷:

- Os padrões 1 e 2 deixaram de ser utilizados.
- Atualmente o score mais baixo é o 6.
- Várias morfologias específicas que historicamente eram consideradas como parte integrante do padrão 3, são atualmente classificadas como padrão 4.
- Atualmente os TP com SG de 6 têm melhor prognóstico do que o descrito em dados mais antigos.
- Existe uma grande quantidade de dados publicados que alertam para o facto de o SG 7, incluir doentes com prognósticos muito díspares. Os doentes com SG "3+4" tem melhor prognóstico do que os com SG "4+3".
- De entre os doentes com TP de alto grau, também é evidente que os doentes com SG de 8 têm melhor prognóstico do que os com SG de 9 e 10.
- Adicionalmente demonstrou-se não haver uma diferença significativa entre o prognóstico dos doentes com SG de 9 e os com SG de 10. A distinção entre ambas parece ser desnecessária.

Em face destas limitações foi recentemente proposto um novo esquema de grupos de grau, a Classificação de Epstein¹¹⁸. Esta classificação ultrapassa algumas das limitações do SG, reflete com precisão o prognóstico e é de fácil entendimento pelos doentes, sobretudo os com TP melhor diferenciados. As categorias que constituem esta classificação são as seguintes:

- Grupo prognóstico I, corresponde ao SG menor ou igual a 6.
- Grupo prognóstico II, corresponde ao SG 3 + 4.
- Grupo prognóstico III corresponde ao SG 4 + 3.
- Grupo prognóstico IV corresponde ao SG 4+4.
- Grupo prognóstico V corresponde ao SG 9 e 10.

As vantagens desta classificação foram apresentadas pelo autor na conferência da ISUP em 2014. Houve uma aceitação muito boa por parte dos delegados e esta classificação veio a ser incluída na classificação dos TP da Organização Mundial de Saúde publicada em 2016. A classificação de Epstein (CE) foi validada numa população de mais de 20 mil doentes, tratados com RT e com PR. Usaram como medida a RBQ. Os grupos prognósticos da CE mostraram ter uma elevada

capacidade de discriminação, superior à do SG¹¹⁹. Outros trabalhos mostraram que a CE também é preditiva para mortalidade específica por TP e desenvolvimento de metastização^{120,121}.

No entanto existem dados que sugerem que em termos de recorrência clínica, a CE poderá não aportar nada em relação ao SG¹²². Por outro lado há autores que sugerem que a CE não é uma nova classificação, antes uma reorganização dos dados já existentes¹²³. Não obstante apresenta vantagens importantes:

- Permite a distinção entre o SG “3+4” e o SG “4+3”.
- Facilita a interpretação por parte do doente, nomeadamente nos TP melhor diferenciados. É mais fácil aceitar uma vigilância ativa quando se tem 1 em 5, do que quando se tem 6 em 10. Este facto poderá diminuir o risco de sobre-tratamento.

Existem outros aspetos referentes ao SG que merecem referência particular. São eles a percentagem de padrão 4 nos SG “3+4” e a identificação de um padrão de alto grau. A diferença de prognóstico entre SG “3+4” e um SG “4+3” está estabelecida. Um SG “3+4” pode apresentar uma percentagem de padrão 4 que varia entre 5 e 49%, o que poderá conduzir a uma heterogeneidade de prognóstico. Perante estes dados é fácil entender que a percentagem de padrão 4 poderá ter influência prognóstica. Este facto levou vários grupos a quantificar o padrão 4 e a tentar entender qual o seu significado prognóstico. Levar em linha de conta este parâmetro, parece aumentar a capacidade preditiva em termos de RBQ. Reese e colaboradores estudaram uma variação do SG que levou em linha de conta a frequência dos vários padrões. Quando aplicado a peças de prostatectomia esta variante conduziu a uma melhoria da capacidade preditiva para RBQ¹²⁴. Esta noção foi confirmada por outros trabalhos^{125,126}. O reconhecimento da sua importância, levou a ISUP em 2014, a sugerir que a quantidade de padrão 4 em SG de 7 deverá ser reportada¹¹⁶. Do ponto de vista clínico este dado poderá ajudar a identificar alguns dos doentes com SG de 7, como candidatos para vigilância ativa (com percentagem mínima de padrão 4) e por outro lado poderá apontar para uma necessidade de intensificação terapêutica em doentes com uma percentagem muito elevada¹¹⁷.

Em relação ao padrão terciário, os consensos da ISUP de 2005 sugeriram que um padrão terciário só deveria ser reportado na peça operatória não na biópsia. Na

biópsia deverá somar-se o padrão mais frequente com o de maior grau. Na peça a extensão de um padrão terciário poderá variar entre 1 e 20%. Só deverá ser reportado como tal, se for inferior a 5%. Se for superior a 5% deverá ser considerado como a segunda parcela do SG¹²⁷. Durante a reunião dos consensos da ISUP de 2014 apresentaram-se os resultados de uma análise de 8 estudos que avaliaram a importância da existência de um padrão terciário. Sete destes 8 artigos, confirmaram que um padrão terciário está associado a um pior prognóstico. Por outro lado, tentou-se clarificar a nomenclatura associada a este conceito. O termo padrão terciário presta-se a alguma confusão. Não deverá referir-se apenas ao terceiro padrão mais frequente, mas deverá ser limitado em termos de extensão. Como tal nos consensos de 2014, este termo foi substituído por padrão *minor* de alto grau (“minor high-grade pattern”). Embora não tenha sido votado aceita-se como limiar, menos que 5%. Esta terminologia deverá ser utilizada no cenário em que, na peça se identificam 3 padrões, tais como “3+4” ou “4+3” com uma percentagem inferior a 5% de padrão 5¹¹⁶. Com a utilização deste limiar inferior a 5%, demonstrou-se que a existência de um padrão 5 associado a um SG “3+4” aumenta o risco de RBQ quando comparado com um SG “3+4” sem padrão 5. O mesmo verificou-se para o SG “4+3”¹¹⁷. Um estudo recente e com mais de 4000 doentes com SG de 7, embora retrospectivo, confirmou a importância prognóstica da existência de um padrão de alto grau¹²⁸.

1.6.3.2. Subtipos histológicos

A maioria dos TP, mais de 95%, são acinares. Existem vários outros subtipos descritos: intraductal, neuroendócrino, mucinoso, ductal, em anel de sinete, sarcomatoide, adenoacinoso e outros. Estas variantes são muito pouco frequentes e podem ocorrer em associação com os adenocarcinomas acinares. Não obstante a sua raridade, os dados sugerem que muitos destes subtipos estão associados a implicações prognósticas. Como tal a sua identificação poderá ter impacto na definição da abordagem terapêutica.

O subtipo intraductal foi identificado pelos trabalhos de Kovi e de McNeal. Ambos associaram este subtipo a maior agressividade e consideraram-no como relativamente frequente^{129,130}. A sua frequência, definida numa série contemporânea parece ser

mais baixa. Em mais de 1100 biopsias a incidência de carcinoma intraductal foi de 2.8%¹³¹. Em peças de PR parece ser mais frequente, ocorrendo entre 20 a 40% dos casos¹³². Os dados referentes à importância prognóstica, em relação aos da frequência, parecem ser mais homogêneos e reprodutíveis em vários contextos. Num estudo que avaliou doentes com biopsias com carcinoma intraductal, demonstrou-se na peça operatória a existência de factores de pior prognóstico¹³³. Também em doentes tratados com radioterapia externa, a presença de carcinoma intraductal é um factor prognóstico independente para RBQ precoce e para o desenvolvimento de metástases¹³⁴. Normalmente os carcinomas intraductais associam-se a factores anatomopatológicos de maior agressividade. Num estudo retrospectivo com 73 doentes, procurou estabelecer-se qual o significado da existência de carcinoma intraductal quando associadas a SG de 6 (“3+3”). Embora os números sejam pequenos e os tratamentos diferentes, a maioria dos casos eram tumores agressivos¹³⁵. Numa outra série, um pouco maior, 206 doentes com TP de alto risco foram tratados com cirurgia. A presença de componente intraductal foi documentada em 104 casos e associou-se, de modo independente, a pior sobrevivência livre de progressão e a pior sobrevivência específica para doença neoplásica¹³⁶. Uma informação fulcral para entendermos o pior prognóstico associado aos carcinomas intraductais, foi publicada recentemente. Mil trezentos e vinte cinco doentes com TP localizado foram tratados cirurgicamente. Confirmou-se de modo inequívoco, a importância prognóstica da existência de carcinoma intraductal. Este subtipo histológico, em termos moleculares, associou-se a marcadores genéticos de instabilidade e de hipóxia e ainda a sobreexpressão de SchLAP1¹³⁷. Também em contexto de doença metastática e resistência a castração, a identificação de carcinoma intraductal foi um factor independente de pior prognóstico. Poderá ser também factor preditivo, já que a presença de carcinoma intraductal parece ditar melhor resposta à Abiraterona e pior resposta ao Docetaxel¹³⁸.

O nosso conhecimento relativo aos tumores neuroendócrinos da próstata, tem aumentado em várias fases da história natural da doença. Em fases mais tardias, após longos períodos de supressão de androgénios pode ocorrer uma transdiferenciação neuroendócrina das células de adenocarcinoma. Este fenómeno,

designado por “treatment-emergent small-cell neuroendocrine prostate cancer” apesar de ainda mal caracterizado, parece ser relativamente frequente e associar-se a um pior prognóstico¹³⁹. Já reconhecida anteriormente, era a noção de que este fenómeno pode estar associado a quadro clínico díspar¹⁴⁰. No outro extremo da história clínica, a ocorrência de diferenciação neuroendócrina também é um fenómeno conhecido, embora com importância prognóstica menos estabelecida. Recentemente foi sugerida uma nova classificação para esta diferenciação¹⁴¹:

- Adenocarcinoma usual da próstata com diferenciação neuroendócrina. A ocorrência de células com diferenciação NE é relativamente frequente. Não é claro o seu significado prognóstico.
- Adenocarcinoma com diferenciação neuroendócrina das células de Paneth. Também de significado incerto.
- Tumor carcinoide. Trata-se de uma entidade muito rara. Dever-se-á excluir a existência de “Multiple Endocrine Neoplasia”.
- Carcinoma de pequenas células. Variante de reconhecida agressividade e com orientação terapêutica particular.
- Carcinoma neuroendócrino de grandes células. Variante rara e agressiva. A maioria dos poucos casos descritos associam-se a terapêutica prévia.
- Lesão mista de carcinoma neuroendócrino (Grandes e pequenas células) – Adenocarcinoma acinar. Trata-se de um tumor agressivo e de alto grau. Frequentemente associado a privação androgénia prolongada.

O carcinoma mucinoso parece ter um prognóstico similar ao do adenocarcinoma acinar¹¹⁷.

1.6.3.3. Extensão do envolvimento tumoral na biópsia.

A extensão do envolvimento tumoral na biópsia tem importância prognóstica, relacionando-se “endpoints” anatomopatológicos da peça operatória e clínicos. Pode ainda ter algum impacto enquanto factor preditivo¹⁴². A relevância deste parâmetro é confirmada pela inclusão desta informação em alguns dos esquemas de estratificação de risco mais utilizados, como por exemplo o da AUA⁹¹, o do NCCN⁷⁵ e o score CAPRA⁹⁴.

A extensão do envolvimento tumoral na biópsia pode ser avaliada através de vários parâmetros. A literatura aponta para que nem todos eles tenham a mesma importância prognóstica. Quando se considera a avaliação da extensão do envolvimento neoplásico na biópsia, um dos aspetos que se deve considerar é a possível existência de heterogeneidade metodológica, nomeadamente na avaliação da extensão linear. Numa ótima revisão sistemática efetuada pelo grupo de Harnden¹⁴³, os parâmetros de avaliação de extensão do envolvimento tumoral na biópsia foram os seguintes:

- Medição expressa em milímetros. Em 2 de 3 estudos esta medida foi preditiva de RBQ.
- Extensão cumulativa (somatório da extensão tumoral em todos os fragmentos). Dois estudos apresentaram resultados díspares. Num deles uma extensão cumulativa maior que 9 mm foi preditiva de RBQ. O outro não associou a extensão cumulativa a RBQ.
- Extensão máxima em qualquer um dos fragmentos. Os resultados associados a este parâmetro também mostram disparidade. Embora o estudo que foi positivo, apresente algumas limitações estatísticas.
- Razão entre o número de fragmentos positivos e a extensão tumoral, quantificada em milímetros. Dois estudos sugerem relação, deste parâmetro, com a probabilidade de RBQ. Um terceiro não o confirma.
- Extensão tumoral expressa como percentagem. A informação que avalia este parâmetro é mais extensa. Dos dez estudos encontrados pelos autores em todos eles este parâmetro foi preditivo de RBQ. Um dos estudos, que utilizou como “endpoint” o desenvolvimento de metástases, também foi positivo.
- Percentagem total de tecido neoplásico. Em vários estudos foi factor preditivo para RBQ.
- Razão entre a percentagem de fragmentos positivos e a percentagem total de tecido neoplásico. Um estudo sugere a capacidade preditiva deste parâmetro.
- A maior percentagem de tecido neoplásico. Um estudo confirmou que este parâmetro é factor preditivo de RBQ. Uma extensão deste estudo mostrou que este parâmetro também foi preditivo para a recorrência clínica.

- Razão entre o número de fragmentos positivos e a maior percentagem de tecido neoplásico. Aparentemente sem interesse preditivo.
- Valor médio da extensão tumoral. Num estudo este parâmetro não acrescentou informação à fornecida pela percentagem de fragmentos positivos. Apenas esta última foi preditiva de RBQ.

Os autores chamam a atenção para várias limitações dos estudos incluídos nesta análise sistemática. Numa análise global, mostraram que dados percentuais tendem a ser mais consistentes do que dados obtidos em milímetros. Por outro lado, sugerem que a percentagem da extensão tumoral linear parece ser melhor factor preditivo de RBQ do que o número ou percentagem de fragmentos positivos. Os dados disponíveis apontam, de modo indelével, para a importância da avaliação da extensão do envolvimento tumoral na biópsia. No entanto não é claro, qual o melhor parâmetro para o quantificar. No dia a dia seria impraticável avaliá-los a todos. E atendendo aos dados disponíveis, também seria desnecessário. A EAU sugere que, em todas as biopsias positivas, seja quantificada a extensão de tumor, em milímetros ou percentualmente⁶⁵. À semelhança do que se passa com outros factores preditivos, uma possibilidade para ultrapassar as suas insuficiências, passaria pela utilização conjunta com outros factores.

Uma perspectiva interessante passaria pela associação entre o número de fragmentos obtidos na biópsia e o risco de RBQ. Teoricamente um maior número de fragmentos acarretaria um maior número de soluções de continuidade na cápsula da próstata e deste modo, poderia facilitar a migração de células tumorais para o tecido periprostático. Tanto quanto julgamos saber não existem dados que diretamente suportem ou neguem esta possibilidade. Um estudo norte-americano comparou doentes biopsados numa, em duas ou em 3 ou mais ocasiões. Respetivamente 2,251 (82%), 365 (13%) e 123 (5%). O aumento do número de biopsias não se traduziu num aumento do risco de RBQ¹⁴⁴. Por outro lado, um outro trabalho, também com uma amostra considerável (1357 doentes) mostrou que TP detetados na primeira biópsia apresentavam factores patológicos mais adversos do que os TP diagnosticados em na segunda ou ulterior biópsia. No entanto doentes com TP documentados após repetição de biópsia tinham uma taxa de RBQ similar aos doentes diagnosticados após a primeira biópsia, não obstante terem características

histológicas menos agressivas¹⁴⁵.

1.6.3.4. Lesão índice

O TP é frequentemente uma doença multifocal e com heterogeneidade especial. Este facto foi inicialmente reconhecido a nível histológico¹⁴⁶ e posteriormente confirmado do ponto de vista genético¹⁴⁷. Estas características têm condicionado dificuldades na definição de critérios para um correto estabelecimento do grau histológico e do estadiamento, pois implica a assunção de qual, ou quais, dos vários focos são determinantes para a progressão da doença^{148,149}. O conceito de lesão índice (LI), ou seja o maior dos nódulos tumorais num dado TP, foi utilizado inicialmente, em 1988, por McNeal¹⁵⁰. A experiência empírica sugere que a LI não só é a maior como apresenta o SG mais elevado e frequentemente é a determinante do estágio. Este facto foi demonstrado pelos trabalhos do grupo de Karavitakis¹⁵¹. Não obstante estes resultados, o conceito de LI e a sua importância têm sido colocados em causa por vários trabalhos. Alguns estudos demonstraram que o maior nódulo tumoral nem sempre apresenta o SG mais elevado nem evidência de extensão extraprostática. Esta discordância poderá ocorrer em até um terço dos casos¹⁵²⁻¹⁵⁵. No entanto a maioria dos participantes da reunião da ISUP, em 2009, defendeu uma combinação de grau e tamanho, como critério para a definição de LI. No entanto não se chegou a consenso e aceitou-se que a LI seria um conceito dependente do contexto¹⁵⁶. A LI também poderá ser um factor preditivo de RBQ¹⁵⁷.

Também na amostra populacional que serve de base a este projeto de doutoramento, foi possível colocar em evidência, o interesse preditivo da LI, o que se verá adiante e que nos levou a escrever um artigo (Vau N. et al. Grade group and other pathologic features as predictors of biochemical recurrence after radical prostatectomy. Submetido para publicação).

Em termos clínicos o conceito de LI é muito atrativo. Se aceitarmos que a LI pode ditar o comportamento biológico e a letalidade de todo o TP, então a destruição seletiva desta lesão poderia tratar a doença ao mesmo tempo que limitaria a toxicidade e os custos associados ao tratamento primário¹⁵⁸.

1.6.3.5. Margens cirúrgicas

Margem cirúrgica positiva (MCP) é definida pela existência de neoplasia na superfície da margem cirúrgica que é identificada por corante, Ou seja identifica-se corante ao nível das células tumorais. Reconhecem-se dois tipos de MCP: extraprostática (incapacidade de excisão completa de tumor com extensão extraprostática) ou intraprostática (plano de excisão cirúrgica atravessa o tumor intraprostático)¹¹⁵. Uma MCP ocorre entre 5 e 43% dos casos. Em termos metodológicos a identificação de MCP parece ser equivalente quando se utiliza a microscopia ótica convencional e a microscopia digital ¹⁵⁹. A referência a este trabalho prende-se com o facto de ter sido um dos coautores. Como parte integrante do treino de utilização da microscopia digital, realizei a leitura de alguns casos, com a supervisão do Sr. Professor Doutor Antonio Lopez-Beltran.

De um ponto de vista oncológico a existência de uma MCP sugere inadequação em termos de cirurgia oncológica. Esta noção é consubstanciada por muitos dados que apontam para uma clara relação entre MCP e RBQ¹⁶⁰. Um dos maiores estudos foi reportado pelo grupo de Boorjian. Avaliaram 11729 doentes tratados com PR. A frequência MCP foi de 31,1%. A 10 anos a sobrevivência livre de RBQ foi de 56% em doentes com MCP e de 77% em doentes com margens negativas. A MCP foi um factor preditivo independente em análise multivariável ¹⁶¹. Vários outros estudos confirmam a relação entre MCP e RBQ¹⁶²⁻¹⁶⁶ (quadro 4).

Quadro 4. Impacto prognóstico da MCP.

Referência	n	Frequência MCP(%)	“Endpoint”*
Boorjian ¹⁶¹	11729	31,1	Sobrevivência livre RBQ 10 anos ¹
Chalfin ¹⁶²	4569	10,4	METP ² 20 anos ¹
Mauermann ¹⁶³	1712	34,5	Sobrevivência livre RBQ 10 anos
Pfitzenmaier ¹⁶⁴	406	17,2	Sobrevivência livre de RBQ ¹ Desenvolvimento de metástases ¹
Wright ¹⁶⁵	65633	21,2	METP ^{1,2}
Alkhateeb ¹⁶⁶	1268	20,8	Sobrevivência livre de RBQ

*A relação da MCP com todos estes “endpoints” atingiu significância estatística.

¹Por análise multivariável.

²Mortalidade específica por tumor da próstata.

No entanto existem particularidades que importa considerar. No estudo de Chalfin a MCP teve em termos estatístico, menos robustez em termos preditivos, do que o SG

e o estágio patológico¹⁶². O estudo de Mauermann sugeriu a importância negativa da multifocalidade da MCP e excluiu relação com a mortalidade específica por TP¹⁶³. No trabalho de Pfitzenmaier a MCP, para além da RBQ também se correlacionou com o desenvolvimento de metástases¹⁶⁴. Na extensa análise de Wright também se correlacionou com mortalidade específica por TP¹⁶⁵. Não obstante parecer ser uma relação lógica, existem dados que questionam a importância da MCP:

- Nalguns trabalhos a MCP, mesmo em análises multivariáveis, atingiu um valor preditivo baixo. Até que ponto a importância preditiva da MCP não está dependente de outros factores de mau prognóstico¹⁶⁷.
- Outros trabalhos embora confirmem a relação com RBQ, excluem a relação com progressão clínica¹⁶⁸.
- O significado de uma MCP pode não ser o mesmo para todos os grupos de risco. O trabalho de Alkhateeb sugere que MCP é um factor preditivo de RBQ em doentes de risco elevado e intermedio mas não em doentes de baixo risco¹⁶⁶.
- As características da margem podem ter impacto na sua importância prognóstica¹⁶⁰.
- A natureza da MCP. Dificuldade em distinguir entre insuficiência técnica e maior agressividade biológica.

As MCP nascem iguais, mas podem ser muito diferentes. Vários estudos procuram estabelecer qual a importância de várias propriedades das MCP, nomeadamente o local em que ocorre, a unifocalidade versus multifocalidade e a extensão. Alguns trabalhos confirmam o impacto das diferentes características, outros não¹⁶⁰. Em termos de unifocalidade versus multifocalidade seria de esperar que a multifocalidade estivesse associada a um pior prognóstico. Os vários estudos disponíveis não são concordantes. Também em termos da extensão da margem os dados não são homogéneos. No entanto parecem ser mais concordantes no que concerne a um pior prognóstico associado a margens superiores a 3 mm. Por fim a localização da MCP. Trata-se de um tópico controverso. A dificuldade começa na divergência de métodos para reportar a localização. Regra geral admitem-se 4 localizações: Ápex; posterolateral e posterior; base e colo vesical e anterior. O tipo

de cirurgia parece influir na localização da MCP. Mas por outro lado a localização da MCP não parece ter impacto no risco de RBQ¹⁶⁹. Uma outra característica da MCP que poderá ter importância é o SG ao nível da margem¹⁷⁰.

A existência de MCP após PR está claramente conotada com resultado oncológico deficitário. Embora esteja firmemente associada a RBQ, a seu impacto prognóstico a longo prazo, nomeadamente no que concerne a progressão clínica e mortalidade específica por TP, é menos evidente. Provavelmente este impacto estará limitado apenas a doentes de maior risco e dependerá também de outros factores de risco bem como da esperança de vida do doente. Não parece depender das particularidades da MCP. Como tal a sua valorização enquanto factor risco deverá ser cautelosa^{160,169}.

1.6.3.6. Invasão perineural

A invasão perineural (Pn) é definida pelo crescimento e invasão das células tumorais ao longo dos nervos prostáticos os quais são tributários do plexo pélvico¹⁷¹. Trata-se de um fenómeno muito frequente. Num trabalho foi reportado em 90% das peças operatórias¹⁷². O reconhecimento de Pn na biópsia não está associada, de modo tangível, a importância prognóstica¹⁷³. A influência prognóstica do reconhecimento da Pn na peça também é discutível enquanto factor preditivo. Há trabalhos que o sugerem e há outros que o contariam. Refinamentos da avaliação da Pn, como a sua quantificação e avaliação do diâmetro das fibras envolvidas, não foram clarificadores. Apesar de existir evidência de que Pn na biópsia também não é um factor prognóstico inequívoco, é provavelmente aqui que o seu reconhecimento poderá ser mais importante. Nomeadamente no apoio à abordagem terapêutica. Por outro lado há evidência recente que sugere que Pn documentada na biópsia poderá ser preditiva de extensão extraprostática e de recorrência local¹⁷⁴. Num trabalho muito recente foram comparados dois grupos de doentes. Um submetido a vigilância ativa (615 doentes) e outro submetido a PR (849 doentes). A existência de Pn foi demonstrada em respetivamente 7 e 44%. Em ambas as populações a existência de Pn foi preditiva de desenvolvimento de carcinoma da próstata letal. Em termos moleculares a Pn associou-se a um aumento da angiogénese tumoral, mas não à proliferação celular nem à apoptose¹⁷⁵.

Quando considerados em conjunto os dados disponíveis indicam que a Pn não é um factor preditivo forte e independente. No entanto o conceito de Pn é deveras interessante. Os nervos prostáticos poderiam funcionar como vias através das quais as células tumorais com capacidade de migração, poderiam ter acesso ao tecido periprostático. Este conceito tornar-se-ia ainda mais atrativo se levássemos em linha de conta que as fibras nervosas poderiam facilitar a migração e a invasão das células tumorais, por mecanismos que vão para além do simples suporte estrutural a simples difusão. Novos modelos sugerem que existe um “diálogo” entre as fibras nervosas e as células tumorais. Células do estroma, como os fibroblastos também poderão participar nesta interação. Várias neurotrofinas (NGF, BDNF e NT-3), o EGFR e o CD74 podem estar implicados, enquanto facilitadores, na fisiopatologia da Pn^{176,177}. Existem vários estudos que associam estas moléculas à transição epitelial-mesenquimatosa¹⁷⁸⁻¹⁸².

1.6.3.7. Invasão vascular

A invasão linfo-vascular (LVI) é definida pela presença inequívoca de células tumorais dentro do compartimento vascular ou linfático ou pela presença de pequenos êmbolos tumorais dentro de pequenos vasos intraprostáticos¹¹⁵. A sua frequência varia consoante os trabalhos. Situa-se entre os 5 e 53%¹⁸³, embora dados mais recentes apontem para valores muito mais baixos. Em termos prognósticos a LVI está associada a RBQ, ao desenvolvimento de metástases e à diminuição da sobrevivência. Nalguns estudos esta capacidade preditiva foi independente de outros factores de mau prognóstico. Por outro lado a LVI também está associada a outros factores anatomopatológicos de pior prognóstico^{115,174,184,185}.

A LVI poderá, ainda, ter importância enquanto factor preditivo para RTEs, após PR, visto que a existência de LVI diminui a sua eficácia¹⁸³. Existem vários outros trabalhos que atestam a importância preditiva da LVI¹⁶⁰. Numa meta-análise recente, que incluiu 25 estudos e mais de 9500 doentes, a LVI associou-se a RBQ e à presença de outros factores anatomopatológicos de mau prognóstico¹⁸⁶. Os dados relativos à importância prognóstica da LVI são relativamente homogéneos. No entanto vários autores parecem diferir quanto à magnitude do impacto da LVI em relação a outros factores de mau prognóstico já estabelecidos. Tome-se o exemplo do que foi

demonstrado no trabalho de Yee¹⁸⁷. Quanto à sua importância, quando identificada em biópsia, os dados são escassos e inconclusivos^{173,174}.

1.6.3.8. Volume tumoral

Existem vários tumores, tais como a mama, a tireoide e o rim, em que o tamanho tumoral é um dos principais factores na definição do estágio. No entanto, nos TP, o tamanho e o volume tumoral (VT) não assumem a mesma importância. Aliás a sua própria quantificação é um exercício complexo e que motiva discussão¹⁴⁸. Um estudo que exemplifica a importância da metodologia associada à determinação do VT é o de Thompson. Em 1747 peças o VT foi medido por planimetria no órgão inteiro e por estimativa percentual na amostra seccionada. O VT medido pelo primeiro método, mas não pelo segundo, foi um factor preditivo independente de RBQ¹⁸⁸. Em termos de importância prognóstica aceita-se que o VT está associado a outros factores anatomopatológicos com importância prognóstica. No entanto a sua capacidade para ser um factor preditivo independente de RBQ é discutível. Existem autores que o aceitam¹⁸⁹⁻¹⁹¹ e outros que o declinam^{192,193}. Num trabalho recente foram avaliados 262 doentes com TP de alto risco tratados com PR. O VT foi um factor preditivo independente de “falência” clínica. Por outro lado este trabalho identificou um limiar, 6,29 ml, a partir do qual é mais provável ocorrer a falência clínica¹⁹⁴. Pode concluir-se que os dados disponíveis indicam que um VT elevado pode constituir um factor de alto risco após PR, no entanto a sua importância real não está bem estabelecida.

1.6.3.9. Estádio patológico (“TNM”)

São vários os objetivos de um sistema de estadiamento tumoral. O primordial passa por poder agrupar os doentes com prognósticos similares. Deste modo consegue-se otimizar tratamentos, recomendações terapêuticas, comparações entre populações e a investigação clínica.

O sistema TNM (“Tumor-Nodes-Metastasis”) da “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) tem sido uma ferramenta basilar no estadiamento, com significado prognóstico, na maioria das neoplasias incluindo nos TP. Este sistema foi recentemente atualizado, com a publicação da 8ª edição¹⁹⁵. A sétima edição já tinha

aportado alterações de monta, como a reclassificação da invasão do colo da bexiga (T4 para T3a) e a adoção do SG e do PSA na definição dos estádios. Tal como noutros tumores e também nos TP, a oitava edição trouxe novidades. Todas as doenças, anatomopatologicamente confinadas ao órgão passaram a ser designadas por T2, deixando de se classificar a extensão ou a lateralidade. Por outro lado, para além da SG passou a ser necessário reportar a CE¹⁹⁶.

No sistema TNM aplicado aos TP há que distinguir o estadiamento clínico do estadiamento anatomopatológico (quadro 5).

Na prática diária este sistema é sobretudo utilizado para o estadiamento anatomopatológico. É menos utilizado para o estadiamento clínico, onde é amiúde substituído por esquemas de estratificação de risco. No sistema TNM anatomopatológico existem factores, que pela sua importância prognóstica, definem categorias diferentes. Em seguida faz-se um breve resumo das características de algumas delas.

1.6.3.9.1. Extensão extraprostática (“pT3a”)

A extensão extraprostática (EEP) é definida pela presença de tecido neoplásico fora dos limites do órgão. No entanto os limites da próstata nem sempre são fáceis de individualizar, sobretudo na face anterior, ao nível do ápex, e no colo vesical. Por outro lado, alterações secundárias a biopsias prévias ou à invasão tumoral também podem dificultar a avaliação da EEP. Por fim há ainda que considerar a variabilidade entre observadores¹⁹⁶. No sistema TNM é uma das características que pode definir a categoria T3a (quadro 4). A EEP, para além de ser estabelecida também deverá ser quantificada. A quantificação pode ser por métodos qualitativos¹⁹⁷ ou quantitativos¹⁹⁸. Um estudo realizado em 2007, estabeleceu a superioridade de um dos métodos quantitativos, “distância radial do tumor extraprostático medido por micrómetro ocular”, sobre os restantes e sobre os qualitativos. Em análise univariável e multivariável, este método foi o único factor preditivo independente para RBQ¹⁹⁸.

Quadro 5 – Sistema de estadiamento TNM, clínico e patológico da AJCC. Adaptado de Lee⁷⁵.

Clínico T (cT)		Patológico T (pT)	
T	Tumor primário	T	Tumor primário
Tx	Tumor primário não identificado	T2	Confinado ao órgão
T0	Sem evidência de tumor primário	T3	Extensão extraprostática
T1	Tumor primário clinicamente não evidente, não palpável	T3a	Extensão extraprostática (uni ou bilateral) ou invasão microscópica do colo vesical
T1a	Tumor por achado histológico incidental em ≤ 5% do tecido obtido por ressecção endoscópica	T3b	Tumor com invasão da(s) vesícula(s) seminal(is)
T1b	Tumor por achado histológico em ≥ 5% do tecido obtido por ressecção endoscopia	T4	Tumor fixo ou com invasão de estruturas adjacentes (como esfíncter externo, recto, colo da bexiga, músculo elevatório do nus e/ou parede pélvica)
T1c	Tumor <u>unilateral ou bilateral</u> , identificado por biópsia com agulha.	*Nota: não existe classificação patológica T1. **Nota: Margens cirúrgicas positivas devem ser indicadas pela designação R1, indicando doença microscópica residual.	
T2	Tumor palpável e confinado à próstata	N Gânglios linfáticos regionais	
T2a	Tumor unilateral em menos de metade de um dos lobos	Nx	Gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados
T2b	Tumor unilateral em mais de metade de um dos lobos	N0	Gânglios regionais negativos
T2c	Tumor bilateral que envolve ambos os lobos	N1	Metástases nos gânglios regionais
T3	Tumor extra-prostático, não fixo e sem invasão de estruturas adjacentes	M Metástases à distância	
T3a	Extensão extra-prostática, uni ou bilateral	M0	Sem metástases a distância
T3b	Tumor com invasão as vesículas seminais	M1	Metástases a distância
T4	Tumor fixo ou com invasão de estruturas adjacentes (como esfíncter externo, recto, colo da bexiga, músculo elevatório do nus e/ou parede pélvica)	M1a	Sem gânglio(s) linfático(s) regional(is)
		M1b	Osso(s)
		M1c	Outra(s) localização(ões) com ou sem doença óssea
		*Nota: Quando existe mais do que um local de metástases, usa-se a classificação mais avançada. M1c não é avançado.	

A EEP é um factor preditivo de RBQ bem estabelecido. No entanto nem sempre é clara a separação entre EEP e MCP, quer em termos histológicos quer em termos estatísticos, enquanto factores prognósticos¹⁶⁰. Não obstante parece que a EEP tem capacidade prognóstica independente da MCP¹⁹⁹. Quanto à dimensão da EEP também parece ser um factor preditivo de RBQ. No entanto o seu impacto em

termos de sobrevivência está menos estabelecido. Como tal o sistema TNM não considera a dimensão da EEP. Jeong e colaboradores avaliaram os dados de mais de 15000 doentes. De acordo com critérios qualitativos identificaram 1869 casos com EEP focal e 2347 com EEP não focal. A EEP não focal, em relação à focal, foi preditiva de RBQ mas não foi preditiva de sobrevivência específica para TP nem de sobrevivência global²⁰⁰. Um outro grupo chegou à conclusão similar de que a dimensão da EEP tem capacidade preditiva para RBQ²⁰¹. Avaliação adicional determinará se esta divisão da EEP virá a ser incluída em edições futuras do TNM. A EEP é um factor prognóstico adverso em TP e o seu reconhecimento é necessário para estabelecer corretamente a abordagem terapêutica após a PR nomeadamente no que concerne a realização de RT adjuvante.

1.6.3.9.2. Invasão das vesículas seminais (“pT3b”)

A invasão das vesículas seminais (IVS) é definida pela invasão da parede muscular das vesículas seminais. A invasão do tecido conjuntivo periparietal tem um menor impacto prognóstico. Por outro lado, o envolvimento linfo-vascular dentro da vesícula seminal também não é interpretado como IVS. A IVS pode ocorrer por vários mecanismos:

- Via intraluminal. Invasão através do complexo do ducto ejaculatório.
- Via extraluminal. Invasão através dos tecidos periprostáticos associado a EEP
- Invasão linfo-vascular. Invasão caracterizada por depósitos tumorais isolados dentro da vesícula seminal, sem contiguidade com tumor primário.

O impacto prognóstico destes diversos mecanismos parece ser diferente. A extensão a partir dos tecidos periprostáticos parece ser a mais pejorativa^{174,202}. No sistema TNM é a característica que define a categoria T3b (quadro 4). Dados mais antigos sugerem que a quase totalidade (95%) dos doentes com IVS tiveram RBQ. Este facto levou os autores a concluírem pela necessidade de melhor imagiologia de modo a evitar cirurgia não curativa²⁰³. Hoje em dia a IVS não é um factor tão ominoso. Ainda assim é aceite consensualmente como estando associada a mau prognóstico, sendo múltiplos os estudos que o confirmam¹⁹⁹. No entanto, e tal como acontece com a EEP, a sua correta valorização enquanto factor prognóstico, é dificultada pelo facto de a maioria dos estudos disponíveis não a avaliarem de modo um isolado. Além

disso a presença de IVS tende a estar associada a esses factores de mau prognóstico¹⁶⁰. Algumas das características associadas à IVS, como a sua extensão e bilateralidade, não parecem ter impacto no prognóstico²⁰⁴. À semelhança do que acontece com a EEP, também a existência de IVS é um factor importante na definição da orientação terapêutica, mais uma vez como elemento orientador na decisão de realização de RTE adjuvante.

1.6.3.9.3. Metastização ganglionar (“pN”)

A existência de metastização ganglionar pélvica define a categoria N1 do sistema TNM (quadro 4). A sua frequência parece situar-se um pouco acima dos 10% nos doentes tratados com cirurgia²⁰⁵ e parece estar a aumentar. Dados recentes retirados do SEER, entre 2004 e 2014, mostram um aumento da incidência de metástases ganglionares de 54,1 para 79,5 casos por milhão²⁰⁶. Em termos prognósticos a sua importância é incontroversa¹⁹⁹. Vários estudos, desde há muito, associam a metastização ganglionar a um pior prognóstico. A título exemplificativo referem-se os trabalhos dos grupos de Gervasi²⁰⁷, de Catalana²⁰⁸ e de Hull³¹. Mais recentemente, um estudo populacional confirmou o impacto significativo sobre risco de mortalidade específica por TP (HR=4,5)²⁰⁶. Importa considerar que provavelmente o mau prognóstico associado à metastização ganglionar não é uniforme em todos os doentes²⁰⁹.

Em relação ao envolvimento ganglionar, e para além da sua existência ou não, há que considerar vários outros aspetos: o número de gânglios isolados durante a linfadenectomia; o número de gânglios positivos e a existência, ou não, de extensão extracapsular. Em relação ao número de gânglios metastáticos, este parece ser factor preditivo de RBQ e de sobrevivência específica por TP. Num estudo com quase 400 doentes com envolvimento ganglionar, a presença de metástases em 3 ou mais gânglios foi um factor preditivo independente para RBQ²⁰⁹. Outros estudos reforçam esta noção^{210,211}. Um estudo mais recente e de maior dimensão associa o aumento do número de gânglios positivos (maior ou igual a 4 versus menor que 4) não só à RBQ como também à sobrevivência específica por TP²¹².

Um outro factor que parece ter impacto preditivo é a existência de extensão extracapsular ganglionar (EECGG). Esta é definida pela invasão do tecido adiposo peri-

ganglionar por células neoplásicas, após extensão através da cápsula do gânglio linfático. A EECGG é factor de prognóstico negativo em várias neoplasias. A sua importância nos TP é menos clara. Uma meta-análise incluiu seis estudos e mais de 1100 doentes com metastização ganglionar, dos quais 658 tinham EECGG. A presença de EECGG associou-se a um aumento significativo do risco de RBQ e de metastização²¹³. Em relação ao número total de gânglios isolados os dados são escassos e divergentes. Em outros tumores, como os do cólon, sabe-se que este é um dado com importância prognóstica²¹⁴. Num estudo de grande dimensão, com mais de 1600 doentes, os autores concluíram que o número de gânglios nos doentes que faleceram foi significativamente inferior ao número de gânglios isolados nos doentes que sobreviveram. Por outro lado doentes em que se isolaram 10 ou menos gânglios tiveram uma sobrevivência específica para TP significativamente menor²¹⁵. Por outro lado o trabalho de Mandel mostrou que apenas o número de gânglios positivos mas não o número total de gânglios isolados tinha impacto prognóstico²¹⁶.

1.6.4. Factores moleculares determinados por imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IHC) é um método, bem conhecido e amplamente utilizado, para caracterização da expressão proteica. Nomeadamente para a pesquisa de marcadores com importância diagnóstica e prognóstica. Do ponto de vista teórico seria um meio atrativo para identificar muitos processos fisiopatológicos, cuja investigação recente relacionou com a progressão dos TP. Como já mencionado anteriormente, existe uma necessidade premente de conhecer factores, que nos permitam projetar qual vai ser o comportamento dos TP. Importa clarificar a diferença aparente entre factores prognósticos e factores preditivos. Os primeiros são indicativos da história natural da doença e os segundos estimam a resposta a uma determinada terapêutica. Quando consideramos a prática clínica associada aos TP nem sempre é fácil distinguir entre factores preditivos e factores prognósticos. A história natural do TP é, habitualmente, modulada por múltiplas intervenções, o que dificulta a dicotomia entre preditivo e prognóstico. Tomemos por exemplo a PR e enquanto parâmetro de falência a RBQ. Quando esta última ocorre terá sido porque a doença era muito agressiva (prognóstico) ou porque possuía uma característica (preditiva) que facilitava o insucesso cirúrgico? Esta dúvida está mitigada em

factores bem estabelecidos como o SG ou estágio TNM patológico. Contudo, agudiza-se em factores cuja importância está menos bem estabelecida. É o caso dos factores avaliados por IHC. Nos TP existe uma quantidade descomunal de marcadores, aos quais se procura atribuir importância preditiva e/ou prognóstica. Em Agosto de 2018, uma pesquisa da base PubMed com a entrada “prostate cancer prognostic marker” recuperou 4198 resultados. Não obstante o peso dos números, nenhum destes factores, avaliados por IHC, se conseguiu impor na prática clínica quotidiana.

Num trabalho digno de registo, Huber e colegas realizaram uma análise sistemática dos estudos disponíveis referentes a marcadores prognósticos determinados por IHC em TP²¹⁷. Com base em vários critérios (tamanho da amostra, metodologia utilizada na técnica de IHC e avaliação estatística) seleccionaram 28 marcadores que em seguida, procuraram validar numa população própria. As características dos estudos iniciais estão resumidas na quadro 6. Criaram uma coorte de 238 doentes tratados com prostatectomia. Os dados histológicos foram revistos e construiu-se um TMA no qual se realizou a IHC. Os dados clínicos também foram recolhidos. A mediana de seguimento foi de 60 meses. A RBQ foi definida como PSA > 0,1 ng/mL e ocorreu em 46.6% dos doentes. A correlação dos marcadores com factores clínicos e anatomopatológicos (estádio T patológico, SG e PSA pré-operatório), na maioria dos casos, não atingiu significância. Na análise univariável, 11 marcadores atingiram significância (RA nuclear / estroma, CB1R, CRGA, caderina E, EZH2, Ki-67, NFκ-B, p21, p27 e PSMA). Em análise multivariável este número desceu para quatro (AKT1, RA estroma, EZH2 e PSMA). Num outro modelo de análise multivariável, limitada aos SG 6 e 7, AKT1, RA estroma e PSMA mantiveram a significância e adicionalmente CB1R, CD10, caderina E e caderina N também a atingiram. Apesar do cuidado na sua escolha, a maioria dos marcadores não viu a sua importância confirmada. De acordo com os autores o cenário ideal para validação de marcadores passaria por avaliação prospetiva, a partir de biopsias e num contexto de vigilância ativa.

Quadro 6 – marcadores de prognóstico determinados por IHC nos TP. Adaptado de Huber²¹⁷.

Marcador	Nº de doentes	Tratamento	“Outcome”
ADAM9	198	PR	RBQ
AKT1	63	PR	RBQ
AKT1	840	PR	RBQ, morte
ALCAM	91	PR	RBQ
ALCAM	2390	PR	RBQ
AR-núcleo	551	PR	RBQ
AR-estroma	53	PR	RBQ
BCL2	94	PR	RBQ
BCL2	228	VA	Morte
CB1R	372	VA	Morte
CD10	2724	PR	RBQ
CD24	102	PR	RBQ
CD138	551	PR	RBQ/progressão radiológica
CRGA	528	PR	RBQ
CRISP3	945	PR	RBQ
caderina E	104	PR	RBQ/progressão clínica
ER-alfa	106	PR	Morte
ER-beta	159	PR	RBQ
EZH2	226	PR	RBQ
HDAC2	145	PR	RBQ
HSP-27	553	VA	Morte
Ki-67	108	PR	RBQ/progressão clínica
MUC1	225	PR	RBQ/progressão clínica
caderina N	104	PR	RBQ/progressão clínica
NFkB	86	PR	RBQ
P21	60	VA/PR	Morte
P27	161	PR	RBQ
P53	705	VA	Morte
P53	2514	PR	RBQ
PSMA	93	PR	RBQ
SPINK1	817	PR	RBQ
Vimentina	287	PR	RBQ

PR = prostatectomia radical; VA = vigilância ativa; RBQ = recorrência bioquímica;

Uma outra análise sistemática chegou a resultados similares. O grupo de Zhao avaliou 93 biomarcadores prognósticos obtidos a partir de 92 estudos. Realizaram uma metaanálise que permitiu confirmar o interesse prognóstico de alguns (Ki-67, Bcl-2, CD147, COX-2, ALDH1A1 e FVIII), mas não da maioria. Mais uma vez os autores alertam para a necessidade de melhorias metodológicas²¹⁸.

Estes dois estudos, ambos com metodologia cuidada, apontam para várias limitações associadas à avaliação de biomarcadores, relacionados com TP, por IHC. Em seguida enumeram-se as mais significativas¹⁷⁴:

- Vieses de seleção.

- História natural muito prolongada.
- Metodologia semi-quantitativa.
- Difícil normalização devido a diferenças metodológicas marcadas.
- Variabilidade, intra e inter-laboratorial, associada à IHC.
- Natureza retrospectiva de muitos dos dados disponíveis.

Em face destes dados, é fácil compreender que marcadores avaliados por IHC, não representem uma ferramenta que nos permita, na prática quotidiana, prever com segurança a história natural. Existem estratégias que poderão mitigar estas limitações, como por exemplo:

- Combinação de vários marcadores com função biológica similar, de modo a aumentar a redundância.
- Evitar combinar marcadores com funções biológicas divergentes, o que aumentaria a variabilidade e diminuiria a robustez.
- Utilizar marcadores que dispensem a necessidade de um limiar.
- Substituição por outras metodologias da área da proteómica.

Não obstante a sua inaplicabilidade clínica em termos de prognóstico nos TP, a IHC continua a representar um modelo atrativo em termos investigacionais. Para isso contribui uma metodologia relativamente simples e os custos contidos. Pelo menos enquanto se espera uma maior democratização de metodologias de maior débito.

1.6.4.1. Caderina E

A caderina E (também conhecida como “epithelial cell–cell adhesion molecule cadherin 1”) é uma glicoproteína epitelial transmembranar que promove a adesão intercelular. A sua terminação intracelular liga-se a moléculas do citoesqueleto, enquanto que a sua terminação extracelular se liga a outra molécula de caderina E, pertencente a outra célula, formando a “zona adherens”. Em condições fisiológicas é, sobretudo, expressa pelos tecidos epiteliais. A sua função como supressor do crescimento e da invasão tumoral está bem estabelecida e passa por uma série de mecanismos complexos que promovem a organização tecidular, a ativação de vias de transdução de sinal e a transição epitelial-mesenquimatosa (TEM). É codificada pelo gene CDH1 (16q22.1)^{219,220}.

Em termos de IHC, o padrão normal é a coloração da membrana²²¹. Uma redução da expressão de caderina E foi documentada em múltiplos tipos de tumores (mama, pâncreas, estômago, cólon, fígado, cabeça e pescoço e pele)²²⁰. Existem vários trabalhos que relacionam a perda de expressão de caderina E e os TP. O maior, ainda que datado, impressiona pelo número. Avaliaram-se 1220 amostras histológicas (757 de tecido benigno, 41 de PIN de alto grau, 325 de TP e 97 de CRPC). Uma expressão normal de caderina E ocorreu em 87% dos casos de tecido benignos, em 80% dos PIN, em 82% dos TP e em 90% dos CRPC. Em 128 casos de TP localizado, uma expressão anormal da caderina E associou-se com RBQ e com MCP e houve uma tendência para associação com um SG mais elevado. Não se documentou associação com EEP nem com invasão das vesículas seminais²²². Existem outros estudos que associam a perda de expressão de caderina E com várias expressões de maior agressividade tumoral:

- Associação a factores clínicos e anatomopatológicos de pior prognóstico, em doentes tratados com PR^{223–225}.
- Possível relação com desenvolvimento de metastização^{226,227}, com progressão clínica e com RBQ^{225,228}.
- Possível papel na carcinogénese do TP²²⁹.

1.6.4.2. Caderina N

A caderina N (também conhecida por CDH2 ou caderina neuronal) tal como a caderina E pertence à super-família das caderinas. Esta possui mais de 110 membros, muitos deles ainda mal conhecidos. Ao contrário da caderina E, a caderina N desempenha funções fisiológicas sobretudo em tecidos não epiteliais. No sistema nervoso central, funciona como molécula de adesão e é importante na sinaptogénese. No coração participa na ligação entre os cardiomiócitos. Em termos fisiopatológicos, está associada ao fenótipo maligno, contexto em que é conhecida como a caderina mesenquimatosa. Durante o processo de transição epitelial-mesenquimatosa, a caderina E é substituída pela caderina N. Esta última liga-se e ativa os recetores do factor de crescimento dos fibroblastos. A interação entre ambos é importante para o processo de migração celular. Por outro lado, promove a atividade da β -catenina nuclear. Contudo, nem em todos os modelos tumorais, um

aumento de expressão da caderina N é deletério. Por exemplo, em neuroblastomas uma perda da expressão de caderina N está associada a metastização²¹⁹. O aumento da sua expressão ocorre em várias neoplasias epiteliais e parece estar associado a um pior prognóstico. Numa metaanálise muito recente foram incluídos 36 estudos perfazendo mais de 5700 doentes, com tumores da mama, cabeça e pescoço, pulmão, digestivos, urotélio, próstata e ginecológicos. Um aumento da expressão da caderina N associou-se a metastização ganglionar, a menor diferenciação, a invasão linfo-vascular e a estádios clínicos mais avançado. Em termos prognósticos associou-se a desenvolvimento de metástases e a diminuição da sobrevivência. Nos dados referentes a tumores da próstata, a sobreexpressão de caderina N associou-se a disseminação ganglionar²³⁰. Em relação ao TP, existem vários dados que atribuem importância à sua associação com a caderina N:

- A caderina N poderá estar associada à carcinogénese. Esta noção é sugerida por um aumento de expressão da caderina N em tecido neoplásico, primário e metastático, quando comparado com tecido não neoplásico²³¹⁻²³³.
- Parece estar associada a factores clínico patológicos de pior prognóstico^{225,232-234}.
- Parece também estar associada a pior prognóstico como recorrência clínica²²⁵.
- Possível papel no desenvolvimento de resistência a castração^{235,236}.

1.6.4.3. Vimentina

A vimentina pertence a um grupo de proteínas - filamentos intermediários - que são um dos constituintes do citoesqueleto. A vimentina é a molécula mais estudada deste grupo. É uma proteína citoplasmática que ocorre sobretudo em células mesenquimatosas e em células indiferenciadas. À medida que as células se diferenciam, a vimentina tende a ser substituída por outras proteínas da mesma família. Aumento da vimentina inibe a diferenciação. A vimentina é expressa na maioria das neoplasias e admite-se que tenha um papel ativo na tumorigénese, para além de ser um molécula basilar na transição epitelial mesenquimatosa²³⁷. A expressão de vimentina está associado a pior prognóstico em diversas neoplasias²³⁸.

Em relação aos TP os dados são ainda incipientes. Ainda assim existe evidência que os relaciona a expressão de vimentina:

- Estudos *in vitro* associam a expressão da vimentina a maior agressividade biológica^{239–241}.
- Poderá ser um factor preditivo de RBQ, independente do SG, em doentes tratados com PR²⁴².
- Poderá estar associada ao desenvolvimento de resistência a castração²⁴³.
- Dados *in vitro*^{244,245} e *in vivo*²⁴⁶, sugerem possível associação a um pior prognóstico na doença resistente a castração.

1.6.4.4. ERG

A proteína ERG (“ETS-related Gene”) é codificada pelo gene ERG. Este é um dos proto-oncogenes mais frequentemente sobreexpresso nos TP. Contudo o epitélio prostático normal não expresse o ERG. O ERG pertence à família de genes ETS (“E26 transformation-specific”). Estes genes codificam fosfoproteínas que se ligam ao ADN e participam na regulação de diversas funções celulares. Os genes ETS participam em rearranjos genómicos em várias neoplasias, como leucemias agudas e o sarcoma de Ewing. Nos TP os genes da família ETS tendem a formar rearranjos genómicos com o TMPRSS2 (“androgen-responsive transmembrane serine proteinase”). São vários os genes da família ETS que podem participar nestes rearranjos, mas o que o faz com maior frequência é o ERG. A fusão que resulta deste rearranjo (TMPRSS2-ERG) ocorre em cerca de metade dos TP. Como o promotor do gene TMPRSS2 contém elementos sensíveis a androgénios o resultado desta fusão leva a sobreexpressão do ERG. A fusão parece ser facilitada por androgénios e nem sempre ocorre na mesma localização cromossómica. No entanto, na maior parte dos casos, o produto proteico da fusão é a proteína ERG (completa ou truncada). Os diversos produtos proteicos resultantes das várias fusões, poderão ter diferentes agressividades biológicas. O aumento da proteína ERG conduz a disrupção da via de sinalização dependente do recetor de androgénio e pode levar a perda de diferenciação celular. Poderá ainda interagir com outras vias de transdução de sinal (WNT, TGF- β) e com outros alvos celulares (*C-MYC*, *NKX3.1*). O ERG também parece poder induzir o fenómeno de

transição epitelial mesenquimatosa, através do gene FZD4, da caderina E e da vimentina. Particular importância parece assumir a interação com o PTEN. Modelos murinos sugerem uma relação de cooperação entre PTEN e ERG. Vários estudos retrospectivos em humanos confirmam esta relação, no entanto o seu verdadeiro significado clínico ainda não está estabelecido.

Também o significado clínico e prognóstico da sobreexpressão do ERG não está perfeitamente definido. Existe uma multiplicidade de estudos que avaliam a importância do ERG em vários momentos da história natural dos TP, desde a vigilância ativa até à resistência a castração. Muitos estudos demonstraram um impacto prognóstico negativo enquanto que outros não o conseguiram. Esta disparidade parece continuar a existir em estudos com metodologias mais evoluídas (expressão genética). Em parte esta disparidade poderá advir do facto de diferentes rearranjos poderem ter significados biológicos diversos²⁴⁷⁻²⁴⁹.

1.6.4.5. P53

O gene de supressão tumoral p53 é o gene mais frequentemente mutado em doenças oncológicas. A proteína produzida pelo gene p53 exerce a sua função de supressão tumoral através de múltiplas vias. O p53 funciona como um sensor de “stress” celular. É acionado por lesão do ADN e pela ativação de oncogenes. Em condições normais os níveis da proteína p53 são baixos devido a uma regulação por parte da MDM2. Esta proteína marca a proteína p53 de modo a que a mesma seja degradada por proteossomas. Em situações de “stress” a ligação da MDM2 à p53 é inibida, uma vez que ambas as proteínas sofrem uma fosforilação. Como consequência a proteína p53 acumula-se e é ativada, tornando-se detetável por IHC. Através de múltiplos efetores, a ativação da p53 pode conduzir a uma paragem do ciclo celular, à apoptose ou à senescência. A p53 está ainda envolvido em vários outros processos celulares como a reparação do ADN, diferenciação e renovação de células estaminais. Perante o papel de supressão tumoral basilar da p53 é fácil compreender que mutações do gene p53, que induzam inativação da proteína p53, facilitem o fenótipo maligno²⁵⁰. Nas doenças oncológicas a mutação do p53 pode ser germinativa ou somática. A mutação germinativa associa-se à síndrome de Li-Fraumeni. Trata-se de uma doença rara, muito complexa e associada a múltiplos

tumores pediátricos e da idade adulta. A sua associação a carcinomas da próstata parece ser extremamente rara, mas poderá aumentar à medida que melhores cuidados de saúde permitam aumentar a longevidade destes doentes²⁵¹. A mutação somática é a que mais frequentemente ocorre em neoplasias. Existem vários tipos de mutações. Algumas (mutações “nonsense”) implicam “apenas” a perda da função de supressão tumoral. Outras (mutações “misense”) poderão comportar-se como um oncogene, por exemplo conduzindo à inativação de outras proteínas da família p53 e deste modo facilitando a progressão tumoral²⁵⁰.

Nos TP a frequência das mutações aumenta muito à medida que se avança na história natural da doença. São relativamente raras em tumores primários²⁵² e muito mais frequentes em formas avançadas da doença²⁵³. A complexidade das alterações associadas ao p53 poderia sugerir a necessidade de uma metodologia complexa para sua detecção. Um trabalho recente sugere que a IHC é suficiente²⁵⁴.

São vários os estudos que associam alterações do p53 aos TP:

- Em TP localizados, alteração da p53, por IHC, foi um factor preditivo independente para sobrevivência específica por TP e para sobrevivência global²⁵⁵.
- Mutações do p53 aumentam o risco de desenvolvimento de metastização em doentes em que ocorreu RBQ²⁵⁴ e podem aumentar o próprio risco de RBQ²⁵⁶.
- Alterações do p53 associam-se a uma maior agressividade biológica^{257,258}.
- Poderá haver uma associação entre p53 e outros factores anatomopatológicos de mau prognóstico^{259,260}.

1.6.4.6. Ki-67

O Ki67 é uma proteína nuclear não-histona. Representa um marcador de proliferação celular muito utilizado na prática clínica enquanto factor prognóstico e mais pontualmente como factor preditivo. O Ki67 acumula-se durante as fases S, G2 e M do ciclo celular e é degradado continuamente ao longo das fases G1 e G0, independentemente da causa para entrada em G0. Consequentemente o nível de Ki67 durante as fases G0 e G1 varia muito de célula para célula e depende do tempo

que a mesma já passou em G0. Não obstante a sua importância prognóstica, a sua função ainda não está bem estabelecida. Apesar de participar na regulação do ciclo celular, o seu impacto em termos de proliferação poderá variar de acordo com o tipo célula. O Ki67 também está implicado na biogénese de ribossomas, na organização da heterocromatina e na separação dos cromossomas durante a mitose²⁶¹. São vários os métodos que permitem avaliar a proliferação celular, existindo vários trabalhos que atestam que o Ki67 avaliado por IHC se correlaciona com metodologias mais complexas. Um deles foi realizado em tumores da próstata. A avaliação da proliferação celular pelo método da captação da bromodesoxiridina foi equivalente à avaliação do Ki67²⁶². É relativamente abundante e consistente, a literatura que associa o Ki67 aos TP:

- Ki67 parece estar associado a factores patológicos de pior prognóstico²⁶³.
- Em doentes tratados com PR, existem vários trabalhos que associam o Ki67 a um pior prognóstico, quantificado por mortalidade específica por TP e por RBQ^{263–267}.
- O valor prognóstico do Ki67, determinado em tecido de biópsia, também foi demonstrado. Quer quando estes doentes eram posteriormente submetidos a cirurgia^{268,269}, quer quando realizavam vigilância ativa²⁷⁰.
- A maior parte destes dados forma compilados numa meta-análise recente. Esta incluiu 21 estudos e mais de cinco mil doentes. Valores mais elevados de Ki67 associaram-se a factores de mau prognóstico (RBQ, desenvolvimento de metástases e sobrevivência específica por TP)²⁷¹. Uma outra meta-análise, citada anteriormente também confirma a importância prognóstica do Ki67²¹⁸.

1.6.4.7. PTEN

O PTEN (“Phosphatase and tensin homologue deleted”) é um gene de supressão tumoral que codifica a proteína PTEN. Regula negativamente a via de sinalização Pi3K/Akt. Esta via, que possui vários efetores, está implicada na inibição da apoptose, na progressão do ciclo celular e na estimulação do crescimento e da proliferação celular. A perda do PTEN leva a uma ausência de restrição da atividade desta via. A perda do PTEN está ainda associada a vários outros processos celulares,

como a motilidade celular, a senescência e a modulação do microambiente tumoral. Pode também suprimir a atividade transcricional do recetor de androgénios (AR), gerar instabilidade dos centrómeros e alterar mecanismos de reparação de ADN. Dada as suas múltiplas funções de supressão tumoral é fácil entender que o PTEN seja um dos genes mais frequentemente mutado nas neoplasias humanas. A inativação do PTEN pode dever-se à deleção, mecanismo mais frequente, ou a outras causas como mutação, silenciamento epigenético, modificação pós-transcrição e pós-tradução. A perda de PTEN ocorre em até um quarto dos tumores primários da próstata. Este valor aumenta se considerarmos formas mais avançadas da doença^{132,248,272}. Um dado importante e já referenciado anteriormente é a interação com o ERG. Esta relação sobressai em modelos animais e humanos. Em tumores primários, a perda de PTEN acarreta um aumento de 2 a 5 vezes na frequência de fusões do ERG. No entanto o seu verdadeiro significado clínico ainda é incerto. Não é claro que a associação de alteração do ERG, agrave o prognóstico associado à perda do PTEN^{248,272}.

A perda do PTEN em TP, apresenta várias implicações prognósticas e terapêuticas:

- Está associada a vários factores patológicos de pior prognóstico quer em biopsias quer em peças cirúrgicas^{132,248,272}. Esta associação foi confirmada por uma meta-análise relativamente recente²⁷³.
- Na doença primária com SG e valores da CE mais baixos, poderá ajudar a identificar as lesões com maior agressividade biológica. Deste modo poderá ajudar a otimizar a estratégia de vigilância ativa²⁷².
- A perda de PTEN, isoladamente ou em combinação com outros marcadores, está associada de modo reprodutível a um pior prognóstico. (RBQ, desenvolvimento de metástases, mortalidade específica por TP e progressão para resistência a castração)^{132,248,272}.
- Factor preditivo de resposta a vários tratamentos sistémicos^{132,274}.
- A perda do PTEN poderá facilitar o desenvolvimento de microambiente tumoral com características imunossupressoras. Este facto poderá ter impacto na resposta à imunoterapia²⁷².

1.6.4.8. Marcadores de reparação de ADN (PMS2, MSH6, MLH1 E MSH2)

A estabilidade genética é essencial à manutenção da vida. Depende não apenas da fidelidade da replicação do ADN, como também da reparação dos danos constantemente sofridos pelo ADN. A reparação do ADN é um fenómeno extremamente complexo que envolve múltiplas vias e muitíssimos mais efetores, responsáveis pelo reconhecimento, sinalização e reparação. Se estes mecanismos forem disfuncionais, advém a instabilidade genética, uma das características do fenótipo maligno²⁷⁵. Com o advento da sequenciação genética, percebeu-se que uma percentagem considerável dos TP primários, cerca de um quinto, apresentavam mutações em genes relacionados com a reparação do ADN²⁵². A frequência destas alterações parece aumentar ao longo da história natural dos TP²⁷⁶. Subsiste a dúvida se serão marcadores de uma maior agressividade ou antes adaptação à pressão terapêutica. Num trabalho seminal Robinson e colegas, identificaram defeitos da reparação do ADN em 23% dos casos de TP avançado. Estes defeitos interessaram genes, implicados nas várias vias de reparação do ADN²⁵³. Uma das vias de reparação do ADN é a reparação de “Mismatch” (MMR). Esta via é responsável pela reparação de erros que ocorrem durante a replicação e a recombinação do ADN. Defeitos nesta via de reparação conduzem a instabilidade de microsatélites (MSI). Nos TP associados a MMR, os genes mais frequentemente envolvidos são os MSH2 e MSH6²⁷⁷. Outros genes desta via que também podem estar envolvidos são o PMS2 e o MLH1²⁷⁸. Existem trabalhos que sugerem a importância prognóstica destes genes nos TP:

- A perda de expressão associa-se a factores patológicos de pior prognóstico^{279–282}
- Agravamento do prognóstico de doença resistente a castração²⁸³.
- Parece estar associado a RBQ^{281,282}

Uma última nota para a importância preditiva destes marcadores. São factores preditivos importantes, pois estão associados a respostas ao tratamento com inibidores de “checkpoint” Este facto levou a entidade reguladora norte-americana (“Food and Drug Administration”) a conceder aprovação para a utilização destes fármacos em tumores com defeitos da MMR, independentemente da localização do primário.

1.6.4.9. Marcadores de potencial estaminal

A teoria das células estaminais na doença oncológica postula que nem todas as células do tumor, uma vez dissociadas do mesmo, são capazes de o reconstituir. Existe uma subpopulação, caracterizada pela capacidade de renovação e de diferenciação, que é responsável pela iniciação, renovação e recorrência tumoral. Esta realidade seria um reflexo do que se passa nos tecidos normais. Este pequeno subgrupo de células serviria de base a um programa de diferenciação aberrante que explicaria a variação celular encontrada em múltiplas neoplasias. Aceita-se que as células estaminais neoplásicas (CEN) possam participar no estabelecimento e na manutenção do fenótipo maligno, sendo importantes para a progressão tumoral. As CEN foram reconhecidas em múltiplos tumores, incluindo nos TP, onde lesões mais ou menos agressivas, do ponto de vista biológico, poderão estar associados a diferentes subtipos de CEN ²⁸⁴. Metodologicamente as CEN são identificadas e caracterizadas através de vários métodos. Um delas passa pela avaliação da capacidade de uma população celular que contem CEN, poder originar, num modelo murino, um tumor que em termos histológicos é similar à neoplasia “progenitora”²⁸⁵.

Já foram identificadas vários marcadores que estão associados às CEN prostáticas: ALDH (“Aldeido desidrogenase”), NANOG, OCT4, SOX2, CD133, CD44, NESTIN, CD166 entre outros. Estes marcadores podem ser utilizados para enriquecimento e purificação de CEN, no entanto existem noutras neoplasias e em algumas células não neoplásicas^{286,287}. O SOX2, também apelidado de “SRY (sex determining region Y)-box 2” é um factor de transcrição associado a pluripotência e a capacidade de renovação. Aceita-se que funcione como oncoproteína, facilitando a tumorigénese e a aquisição de características associadas a metastização, como a migração e invasão²⁸⁸. O OCT4, também apelidado de “Octamer-binding transcription factor 4” é um outro factor de transcrição que se considera ser essencial no estabelecimento do fenótipo estaminal. Em modelos tumorais existem vários estudos que implicam o OCT4 na tumorigénese e em maior agressividade biológica²⁸⁹.

Existem vários trabalhos que atribuem valor prognóstico e preditivo à expressão destes marcadores:

- Aumento da expressão do gene que codifica a ALDH e aumento da atividade da enzima estão associadas a SG mais elevados. Um aumento da ALDH documentado por IHC, por seu lado, associou-se a pior sobrevivência²⁹⁰.
- Aumento da expressão do gene de CD166 e aumento da CD44 por IHC, correlacionam-se ambos com menor sobrevivência livre de RBQ²⁸⁶.
- A expressão de SOX2 parece associar-se a um SG mais elevado^{288,291} a invasão linfo-vascular²⁹² e a uma menor sobrevivência livre de RBQ²⁹³.
- A expressão de OCT4 poderá estar associado a factores anatomopatológicos de pior prognóstico e a menor sobrevivência livre de RBQ^{289,294,295}. No entanto diferentes isoformas deste, poderão ter impacto prognóstico diferente²⁹⁴.
- A expressão de OCT4 e SOX2 é maior em tecido neoplásico do que em tecido prostático não neoplásico²⁹³.
- O OCT4 poderá ter alguma importância enquanto factor preditivo, em TP resistentes a castração tratados com Docetaxel²⁸⁹.

1.6.5. Factores genéticos

Os TP apresentam um “panorama” genético, diferente da maioria dos outros tumores sólidos. Nos TP são mais frequentes as variações do número de cópias do que as mutações pontuais. É sobretudo através desta variação do número de cópias que ocorre o estabelecimento do fenótipo maligno e a sua evolução. Esta “desarrumação” genómica, composta por vários acontecimentos seriados, parece ocorrer de um modo coordenado e é apelidada de cromoplécia. A dimensão temporal associada à evolução genética dos TP é desconhecida, mas admite-se que seja prolongada. Existem alterações “fundadoras” como os rearranjos genéticos dos genes da família ETS ou as deleções de NKX3.1. Existem outras alterações, como as deleções do PTEN e do CDKN1B, que são mais tardias. O advento, nos últimos anos de estudos de sequenciação em TP, permitiram identificar múltiplas características genéticas de tumores primários e de lesões mais avançadas. No entanto, aquando da interpretação destes dados, há que levar em linha de conta a heterogeneidade tumoral que ocorre nos TP. Embora menos frequentes em tumores primários do que

em lesões mais avançadas, mutações em genes de supressão tumoral “clássicos”, como o p53 e o RB1 também ocorrem. O p53, conjuntamente com o SPOP e com PTEN são os genes mais frequentemente mutados em tumores da próstata primários, ainda assim com frequências baixas, que não deverão ultrapassar os 15 a 20%. Um outro fenómeno presumivelmente importante, são as alterações da reparação do ADN, que poderão facilitar a cromoplécia. Estas alterações poderão ser majoradas por agressões genéticas, como inflamações e infeções, que resultem em disrupções da cadeia de ADN. A desregulação de proteínas que se ligam e modificam a cromatina também ocorre com maior frequência nos TP. São exemplos a EZH2, associada a perda de diferenciação celular, e a MLL2, associada a ativação do recetor de androgénios. As alterações epigenéticas específicas também serão essenciais para o fenótipo maligno, nomeadamente as associadas IDH1.

O acumular de dados relativos às alterações genéticas associadas aos TP, permitiu o reconhecimento de vários subtipos moleculares. O mais significativo está associado à fusão dos genes da família ETS. Os TP em que ocorrem fusões são distintos daqueles em que não ocorrem fusões. A existência de fusão está associada, com maior frequência, a deleção do PTEN e do p53. A inexistência de fusão está associada a SPINK1 e a alterações do RAF-RAS-FGFR. Um outro subtipo poderá estar associado a deleção de CDH1 e a mutação de SPOP. Ambas são exclusivas da ocorrência de fusão dos genes da família ETS. A CDH1 parece participar no processo de fusão e o SPOP, tal como a fusão, aumenta a expressão de ERG. Parecem existir vários outros subtipos, em parte tributários de várias combinações das alterações supracitadas. Expectavelmente, a aumento progressivo deste conhecimento, traduzir-se-á em abordagens terapêuticas diferenciadas e otimizadas^{252,296–298}.

A complexidade e variabilidade das alterações genéticas associadas aos TP podem ser interpretadas de vários modos. Por um lado, consubstanciam a heterogeneidade quer histológica quer clínica. Por outro poderão representar uma via alternativa e promissora para a identificação de factores prognósticos e preditivos mais precisos. Fruto desta noção, foram desenvolvidos nos últimos anos vários “painéis” genéticos com o intuito de otimizar os esquemas de estratificação de risco já conhecidos. Em seguida, descrevem-se sucintamente os painéis genéticos mais utilizados.

O “Prolaris” é um painel genético baseado em 46 genes. Trinta e um estão

relacionados com a progressão no ciclo celular e 15 funcionam como controlo. É utilizado em tecido de biópsia de doentes de baixo risco para ajudar na decisão entre tratamento imediato (PR, radioterapia) ou diferido (vigilância ativa). Vários estudos demonstraram a capacidade prognóstica (mortalidade específica, RBQ e desenvolvimento de metastização) deste teste. Por fim poderá aumentar marginalmente a capacidade preditiva de esquemas de estratificação de risco, como é o caso do score CAPRA¹²³.

O “Oncotype DX - Genomic Prostate Score” consiste em 17 genes, através dos quais se calcula um score que varia entre 0 e 100. Tal como o teste anterior baseia-se em tecido de biópsia conservado em parafina. Valores mais elevados estão associados a uma maior probabilidade de factores anatomopatológicos adversos documentados na peça da PR. Tal como o “Prolaris”, também serve para ajudar na decisão entre tratamento imediato ou vigilância ativa, em doentes com TP de baixo risco. Também existem dados que associam o resultado deste teste a “endpoints” clínicos, como a RBQ ou o desenvolvimento de metastização¹²³.

O “Decipher” utiliza a expressão de 22 biomarcadores de ARN. Estes estão relacionados com proliferação celular, com diferenciação, com a via de sinalização dos androgénios e a imunomodulação. Da sua aplicação resulta um score entre 0 e 1, com capacidade para prever o risco de desenvolvimento de metástases após realização de PR. Tal como os métodos anteriores, a utilização deste teste pode otimizar o desempenho de outros esquemas de estratificação de risco, quando utilizados em conjunto¹²³.

A utilização destas ferramentas genéticas está associada a resultados promissores. Contudo são necessários estudos adicionais para se poder quantificar qual o benefício adicional associado ao seu uso. E por outro lado para estabelecer como deverão ser utilizados na prática clínica quotidiana. Esta realidade é espelhada pelo facto de a utilização destas ferramentas não ser recomendada pelas “guidelines” internacionais mais utilizadas^{65,75,91}.

Após a revisão dos dados teóricos relativos a factores preditivos e prognósticos, sobressai a quantidade, deveras impressionante, de informação disponível. Ainda assim, continuamos a não dispor de ferramentas que nos permitam, de modo preciso e reproduzível, identificar os casos com maior agressividade biológica.

1.7 Transição epitelial-mesenquimatosa

A transição epitelial-mesenquimatosa (TEM) é um fenómeno biológico complexo, essencial à vida e com grande importância fisiopatológica.

A ideia de que as células epiteliais podem perder características epiteliais e ganhar características mesenquimatosas foi proposta, inicialmente, na década de 80 do século passado, por Elizabeth Hay²⁹⁹. Em condições fisiológicas, a TEM é essencial durante a embriogénese e os processos de cicatrização. Ambos os processos implicam remodelação tecidual efetuada por vários tipos de células epiteliais. As adaptações que permitem às células epiteliais desempenharem esta função, dependem em grande medida da TEM. Durante a embriogénese são vários os fenómenos que dependem da TEM³⁰⁰:

- A formação da mesoderme durante a gastrulação.
- A formação do septo interauricular e interventricular.
- A formação da crista neural.
- A formação do palato.
- A regressão do ducto Mülleriano.

Durante a cicatrização, as células que se encontram nos bordos da ferida, migram para a área lesada de modo a restabelecer a arquitetura tecidual normal. Para que esta migração ocorra, as células epiteliais têm que reverter o seu fenótipo. Posteriormente para completar o processo devem reassumir o seu fenótipo epitelial. O fenómeno de TEM também está envolvido em processos de cicatrização noutros órgãos, como o pulmão³⁰¹. Em termos fisiopatológicos, a TEM também é um fenómeno basilar, nomeadamente no estabelecimento e manutenção do fenótipo maligno, bem como na evolução da “cascata” de invasão/metastização³⁰².

A aquisição da capacidade de invasão, característica neoplásica primordial, acarreta mudanças profundas no fenótipo celular. A organização das células em camadas que formam os epitélios, é incompatível com a motilidade e com a invasão. De modo a contornar esta limitação, as células tumorais mitigam as suas características epiteliais e adquirem características mesenquimatosas, através da TEM. Isto é, reativam um “programa” biológico latente, cuja expressão está usualmente associada à embriogénese e aos processos cicatriciais. É plausível, embora não esteja

provado, que todos os tipos de carcinoma, passem por este fenómeno^{300,303}. A fibrose é um fenómeno de cicatrização associado a muitas doenças crónicas e que resulta num impacto funcional, que pode chegar à falência orgânica. A fibrose ocorre em vários órgãos e aceita-se que está associada ao fenómeno de TEM. A TEM pode ocorrer em vários tipos de células não epiteliais, como o as células endoteliais, os hepatócitos e os cardiomiócitos^{301,303}.

Após revisão da literatura, decidiu-se, para melhor compreensão, encadear os vários aspetos associados à TEM, de um modo sequencial e cronológico. Uma representação esquemática desta organização está patente na figura 3.

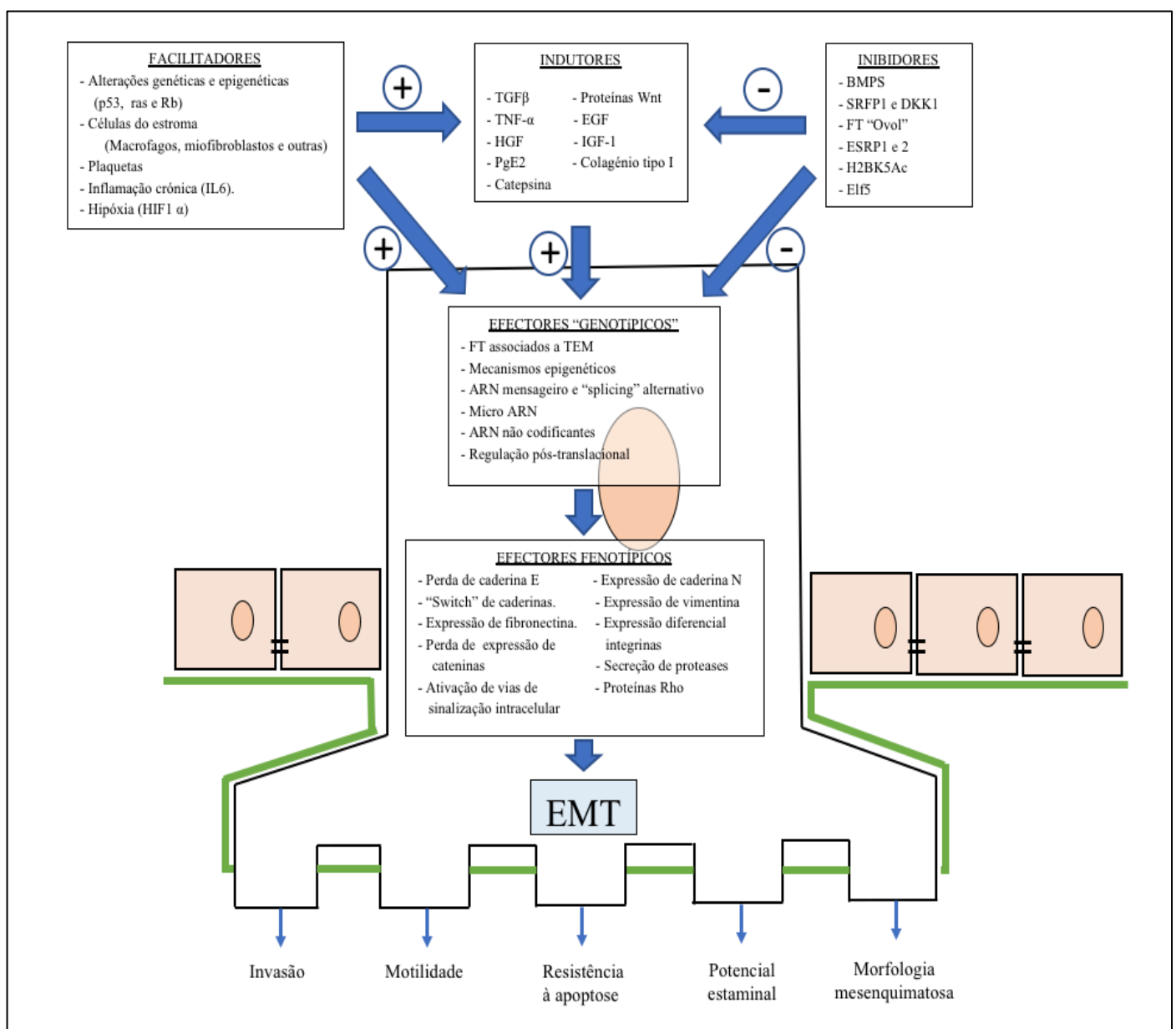


Figura 3. Visão global do fenómeno de transição epitelial-mesenquimatosa.

1.7.1. Indutores

A TEM é induzida por sinais extracelulares que a célula tumoral recebe a partir do microambiente tumoral. Em condições fisiológicas existe uma especificidade especial associada à TEM. Durante a embriogénese e a cicatrização, a TEM está limitada a áreas específicas. Esta especificidade especial está dependente de distintos sinais contextuais, indutores e repressores, com múltiplas origens. Esta noção também parece ser partilhada pelas neoplasias. A TEM ocorre sobretudo na frente invasiva dos tumores, onde as células neoplásicas estão em contacto estreito com o estroma circundante³⁰⁰. A existência de indutores e inibidores facilita a compreensão de outras propriedades da TEM: a reversibilidade e a parcialidade.

A TEM é reversível ao longo da evolução neoplásica. O seu estabelecimento é essencial no início da cascata de invasão / metastização, nomeadamente para a invasão, entrada em circulação e extravasação. Na parte final desta sequência este processo é revertido, através da transição mesenquimatosa epitelial (TME), o que permite à célula tumoral proliferar e metastizar. Um aspeto consensual que poderá suportar a noção de reversibilidade, é o facto de as metástases serem histologicamente similares ao tumor primário. No tumor primário o microambiente tumoral que, inclui um estroma reativo, liberta sinais que induzem a TEM. Após abandonar o tumor primário, a TEM pode ser perpetuada por outros factores secretados, por exemplo, pelas plaquetas que envolvem as células tumorais circulantes. No entanto após o extravasamento, as células tumorais encontram um estroma normal, que não produz indutores de TEM. Como tal tendem a reassumir um fenótipo epitelial através da TME, o qual parece ser importante para o desenvolvimento da metástase. Associada à noção de reversibilidade da TEM, há pois que considerar a noção de dependência contínua de sinais indutores³⁰⁰. Um aspeto que sugere a parcialidade da TEM diz respeito a células tumorais circulantes. A maioria destas, expressam simultaneamente marcadores epiteliais e mesenquimatosos. Estes dados associados a muitos outros obtidos “*in vitro*” apontam para uma grande flexibilidade da TEM, em que as células neoplásicas poderão passar por múltiplos estádios intermediários, sendo sujeitas a TEM “parcial”^{300,301}.

Os indutores da TEM podem ser libertados pelo estroma reativo ou pelas próprias células tumorais. Os dados apontam para maior importância do primeiro mecanismo, sobretudo no estabelecimento da TEM. O mecanismo autócrino parece ter mais importância na manutenção da TEM. Em seguida enumeram-se os mais importantes, embora a literatura faça referência a muitos mais:

- O **TGF- β** (“tumor growth factor beta”) está associado à embriogénese e ao processo de fibrose. Está associado às vias de sinalização celular, com um papel fulcral na patogénese neoplásica (SMAD, Rho GTPases, PI3K/Akt e MAPK). Suprime a proliferação de células epiteliais normais mas promove a capacidade de invasão e proliferação de células neoplásicas. Na TEM, o TGF- β , representa um dos indutores, cuja importância está mais bem estabelecida. A maioria carcinomas possuem recetores para o TGF- β . Por outro lado a inativação da via do retinoblastoma (Rb), que também ocorre em muitos tumores, leva à perda do efeito antiproliferativo, mas mantém as restantes funções da via do TGF- β . Como tal em contexto de TEM, o TGF- β funciona como estímulo proliferativo. Aliás este poderá ainda ser reforçado, através de um mecanismo autócrino, em que o TGF- β induz a secreção de factor de crescimento derivado das plaquetas^{300,304}.
- As **proteínas Wnt** (“*Wingless Drosophila* mutant and related murine gene *int-1*”) também são indutoras da TEM e estão ligadas à matriz extracelular. As Wnt podem ativar duas vias de sinalização intracelular. A via canónica, que está centrada na catenina. Quando esta via é ativada, a catenina deixa de ser degradada, acumula-se e promove a proliferação celular. Quando esta via não está ativada, a catenina é degradada, após fosforilação pela quinase GSK-3 β . A via não canónica está associada a proteínas G e a sua ativação facilita a invasão, a mobilização e a autorrenovação.
- **TNF- α** (“Tumor Necrosis Factor – Alpha”). É geralmente produzido por células inflamatórias, como os macrófagos. É o ligando que ativa a via de sinalização NF- κ B. A ativação desta via leva a expressão de genes anti-apoptóticos, de genes de proliferação e do gene do TNF- α .

- **EGF** (“Factor de crescimento epidérmico”). É um indutor importante da TEM. É produzido pelos macrófagos do estroma. A ativação do recetor do EGF, na célula tumoral, leva a invasão, motilidade e secreção da quimioquina CSF-1. Esta última induz proliferação dos macrófagos e secreção adicional de EGF.
- **HGF** (“Factor de crescimento de hepatócitos”). Produzido por várias células do estroma. Tem capacidade para induzir a TEM em células neoplásicas que expressem o “Met” (recetor do HGF).
- **IGF-1** (“Factor de crescimento similar à insulina -1”).
- **PGE2** (“Prostaglandina E2”). Trata-se de outro indutor relevante para a TEM. A sua produção pode ser paracrina, por miofibroblastos, ou autócrina. Podem facilitar a sinalização da via das proteínas Wnt e podem contribuir para desenvolvimento de potencial estaminal.
- **Catepsina**. Protesase secretada por macrófagos e com capacidade para induzir a TEM.
- **Colagenio tipo I**. Normalmente ausente no compartimento epitelial é abundante no estroma.

Os diferentes indutores podem atuar de forma concertada e aditiva, por vezes através da mesma via de transdução de sinal. Por exemplo o TNF- α e o TGF- β parecem atuar de modo concertado. Numa fase inicial o TNF- α , produzido por células inflamatórias, ativa a via NF- κ B. Esta também pode ser ativada pelo TGF- β . Deste modo, ambas as moléculas podem contribuir para a manutenção da ativação a longo prazo da via NF- κ B. Uma outra fonte de complexidade, advém do facto de muitos destes indutores partilharem várias vias de sinalização e efetores comuns. A literatura que o traduz é muito abundante. Considera-se que uma revisão cuidada da mesma, ultrapassa o âmbito desta tese. No entanto uma noção desta complexidade poderá ser apreciada no quadro 7.

1.7.2. Facilitadores

Existem diversos mecanismos que atuam como facilitadores da TEM.

Existem alterações genéticas e epigenéticas que majoram a resposta aos indutores^{300,304}.

- A perda de função da proteína p53 nas células neoplásicas aumenta a resposta a indutores. A proteína p53 recruta o SNAIL2 para degradação, suprimindo a capacidade de invasão.
- A mutação do gene RAS, em linhas celulares, aumenta a capacidade do TGF- β em induzir TEM.
- Também a perda da via do retinoblastoma poderá facilitar a ação do TGF- β .

Outro grupo que poderá funcionar como facilitador do fenómeno de TEM, são as células que constituem o estroma.

- Macrófagos. Em modelos murinos a ausência destas células ao nível do tumor primário, traduz-se em incapacidade de desenvolver metástases. São vários os indutores que poderão ser secretados por estas células: TNF- α , EGF, Catepsina e HGF.
- Miofibroblastos. São outro tipo celular presente no estroma reativo. Produzem PgE2 e podem facilitar a sinalização da via das proteínas.
- Várias outras células do estroma, tais como fibroblastos, células estaminais mesenquimatosas e células associadas a resposta inflamatória, também secretam indutores.

As plaquetas tendem a aderir às células neoplásicas que se encontram em circulação. Através da secreção de indutores, poderão contribuir para a manutenção da TEM. Condição importante para que a célula sobreviva até que ocorra o extravasamento.

Por fim há que considerar particularidades do microambiente tumoral. A inflamação crónica através da indução de expressão de determinadas integrinas poderá facilitar a TEM. Citoquinas inflamatórias, como a IL-6, também poderão facilitar a TEM. Condições de hipóxia também podem facilitar a TME. A expressão de HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor 1- α) induz a expressão de “Snail” e de “Twist”³⁰⁴.

1.7.3. Inibidores

Apesar da importância fisiológica e fisiopatológica da TEM, existem vários mecanismos que zelam pela integridade do fenótipo epitelial e que contrariam a TEM. A título exemplificativo refere-se o “splicing” alternativo mediado pelas ESRP1

e 2 (“epithelial-specific regulatory protein 1” e “2”), o marcador epigenético H2BK5Ac, os FT “Ovol” e o Elf5³⁰¹. O gene p53 também contribui para a hemóstase epitelial, interagindo diretamente com o miARN-200³⁰¹. Existem várias outras moléculas que podem contribuir para a manutenção do fenótipo epitelial. Como se escreveu acima, o TGF- β e as proteínas Wnt podem ser secretadas pelas células tumorais e, de modo autócrino, contribuir para a TEM. No entanto estas proteínas são secretadas concomitantemente com outras que possuem capacidade para reverter a TEM. As BMP (“Bone morphoegnic protein”) inibem a via de sinalização associada ao TGF β e à SFRP1, e a DKK1 inibem a via de sinalização associada ao Wnt³⁰⁰. Outra forma de inibição, são os inibidores tecidulares das metaloproteinases, que se ligam às metaloproteinases, mantendo-as numa forma inativa.

A TEM depende do balanço entre indutores e inibidores. Num individuo adulto saudável a preservação do fenótipo epitelial geralmente prevalece sobre a TEM. No entanto, mesmo em condições fisiológicas existem certos tecidos com marcada plasticidade epitelial, como é o caso da glândula mamária durante a puberdade e a gravidez. A noção de facilitadores, indutores e inibidores acrescenta complexidade ao fenómeno da TEM. Esta não é apenas governada pelo genoma da célula tumoral, também depende do microambiente tumoral.

1.7.4. Efeitores a nível genético

Os dados sugerem a importância das células do estroma enquanto indutores e facilitadores do processo de TEM. No entanto, a sua materialização ao nível da célula neoplásica, envolve a alteração da expressão em centenas de genes distintos, o que se traduzirá nas múltiplas características morfo-funcionais que caracterizam a TEM. O controlo da TEM parece depender de um pequeno número de factores de transcrição pleiotrópicos bem como de outros mecanismos, como modificações epigenéticas, controlo transcricional, “splicing” alternativo, estabilidade proteica e localização celular. Os dados disponíveis apontam para que alguns destes mecanismos regulatórios apresentem especificidade tecidular e entre diferentes neoplasias^{300,304}. Em modelos animais identificaram-se os genes que codificam os factores de transcrição (FT) responsáveis pela TEM. Estes genes são conservados ao

longo da evolução animal e estão associados à TEM, que ocorre durante a embriogénese. Alguns destes FT também são transcritos na idade adulta, associados a processos de cicatrização. Estes FT, isoladamente, parecem ter a capacidade de induzir TEM em células epiteliais. No entanto, na doença oncológica, atuam habitualmente em combinações capazes de induzirem múltiplas alterações celulares, com profundo impacto no fenótipo maligno, desde a invasão até à metastização. São ainda capazes de influenciar a sua própria expressão e a de outros FT igualmente associados à TEM. Trata-se de um processo mais lento, que pode durar horas ou dias, pois implica transcrição e tradução dos genes que codificam os FT. Alguns destes FT podem atuar de modo redundante. Por exemplo o “Snail”, o “Slug”, o “ZEB1” e o “ZEB2” podem todos ligar-se ao promotor do gene CDH1 e reprimirem a expressão de caderina E^{300,304}. São vários os FT descritos. Em seguida, descrevem-se sumariamente alguns deles (Quadro 7).

Quadro 7. Factores de transcrição associados a TEM (continua). Adaptado de Lamouille³⁰⁴.

Factor de transcrição	Diminuição da expressão associada a TEM	Aumento de expressão associada a TEM	Vias de sinalização
SNAIL 1 e SNAIL2	Caderina E, claudinas, ocludinas, Crumb3, PALS1, PATJ, citoqueratinas, desmoplaquinas e placofilinas	Fibronectina, Caderina N, colagéneo, MMP, Twist, ID1, ID2, ZEB1 e 2	TGF- β , Wnt, Notch, PI3K/Akt, NF-kb, EGF e FGF
TWIST	Caderina E, claudinas, ocludinas, desmoplaquinas e placofilinas	Fibronectina, Caderina N, integrina	MAPK
ZEB1 e ZEB2	Caderina E, ZO1, Crumb3 e placofilina	Caderina N e MMP	TGF- β , Wnt, MAPK
FOXD3	Desconhecido	Desconhecido	B1 Integrina e laminina
FOXC2	Caderina E	Fibronectina, Vimentina e caderina N	TGF- β
FOXF1	Caderina E, claudina, ocludina, desmogleina1 e 2, desmocolina e desmoplaquina	Fibronectina e caderina N	Desconhecida
FOXQ1	Caderina E	Fibronectina, Vimentina e caderina N	Desconhecida
FOXO3A	Caderina E	Snail	Akt
FOXA1	Caderina E	Fibronectina, vimentina e Snail	TGF- β , HGF e Akt
FOXA2	Caderina E e ZO1	Fibronectina, Caderina N vimentina e Snail	TGF- β , HGF e Akt

Quadro 7. Factores de transcrição associados a TEM (continuação).

Serpent, GATA4 e GATA6	Caderina E, Crumb e claudinas	Caderina N e MMP.	Desconhecida
HMG2	Caderina E	Snail e Twist	TGF- β
SOX9	Desconhecido	Snail	BMP e PKA
KLF8	Caderina E	MMP	Desconhecida
CBFA-KAP1	Desconhecido	FSP1	Desconhecida
ZNF703	Caderina E	Caderina N, vimentina, citoqueratinas e Snail	RHO-GTPase
PRX1	Caderina E	Vimentina e laminina	TGF- β e BMP2

“Snail” (SNAIL1). Descrito inicialmente em *Drosophilas*. Pertence à família de FT “C2H2-type zinc finger”. Atua principalmente como repressor da transcrição. O “Snail” é normalmente produzido em grande quantidade e degradado rapidamente, após fosforilação pela quinase GSK-3 β . Determinadas vias de sinalização, como as associadas às proteínas Wnt e ao PI3K/Akt, levam a inativação desta quinase. A degradação do “Snail” é bloqueada e o seu nível aumenta rapidamente. O “Snail” está envolvido em várias fases da embriogénese, onde a sua expressão depende de indutores como o TGF- β e as proteínas Wnt. Está também associado a processos de fibrose e a modelos neoplásicos animais e humanos. Pode reprimir a expressão do gene CDH1, ligando-se ao seu promotor e recrutando elementos repressivos. Durante a embriogénese também pode recrutar elementos ativadores, resultado num mecanismo de ação ambivalente. Em modelos tumorais poderia ajudar a explicar a reversibilidade do fenómeno de TEM. Por fim, uma referência ao facto de também induzir a expressão de marcadores de células estaminais³⁰⁴.

“Slug” (SNAIL2). Envolvido na embriogénese e em processos de cicatrização. Também pertence à família de FT “C2H2-type zinc finger”. Tal como o “Snail”, atua como repressor da transcrição, nomeadamente do gene CDH1. Em termos fisiopatológicos, também está envolvido em processos fibróticos e neoplásicos³⁰⁰.

“Twist” (TWIST1). Também envolvido na embriogénese. Juntamente com outros FT da mesma família (TWIST2, E12 e E47) está implicado na TEM tumoral. Liga-se diretamente aos promotores do “Snail”, do “Slug” e do “ZEB1”. Pode ainda ligar-se ao seu próprio promotor. Pode atuar isoladamente ou juntamente com outros FT como o “Slug”. É frequente que o “Twist” e o “Slug” sejam co-expressos. Em modelos animais, a diminuição do “Twist” traduz-se por uma menor capacidade de

metastização. Induz a expressão de marcadores de CE. Também está ligado a várias vias de sinalização intracelular, como a HIF1 α . Tal como o “Snail” a estabilidade do “Twist” é regulada por fosforilação. A MAPK fosforila-o e protege-o da degradação³⁰⁴.

“ZEB1” (**δ EF1**) e “ZEB2” (**SIP1**) tem um papel importante na regulação do arranque da TEM. Funcionam como um interruptor que mantém a célula com um fenótipo epitelial ou mesenquimatoso. Estes FT, uma vez ativados, são capazes de induzir a expressão de outros FT, também associados à TEM. Têm a capacidade de se ligar a sequências genéticas reguladoras, levando à repressão ou ativação da transcrição. A expressão de “ZEB1” frequentemente ativa a expressão de “Snail”. A expressão de ZEB pode ser induzida pelas vias de sinalização do TGF β e das proteínas Wnt.

O mecanismo de ação dos FT associados a TEM sugere que o fenótipo maligno não resulta da acumulação de múltiplas alterações genéticas. Antes pode resultar da ação pleiotrópica dos FT que levam ao desenvolvimento de características de elevada malignidade³⁰⁰. Os FT associados à TEM, para além de orquestrarem a plasticidade celular, a transformação oncogénica e a mobilidade, também podem ter impacto noutros fenómenos celulares, tal como a resposta às terapêuticas, imunomodulação e regulação do microambiente tumoral³⁰⁵.

Há ainda que considerar o papel regulador de várias classes de ARN, de fenómenos epigenéticos e pós-translacionais. As várias classes de ARN também têm um papel regulador importante. Ao nível do ARN mensageiro, “splicing” diferencial pode gerar proteínas com diferenças estruturais e funcionais importantes. Por outro lado também os micro ARNs (miARN) são importantes na regulação da TEM^{303,304}. Entre outros mecanismos, podem mediar a degradação de produtos da transcrição genética e deste modo influenciar proteínas chave da TEM. Existem micro ARN que promovem e outros que inibem a TEM. A regulação da TEM pelos micro ARN é um fenómeno complexo e não linear, que também depende de fenómenos epigenéticos. Um exemplo prototípico é dado pela regulação exercida pelo miARN-200 e pelo miARN-34 sobre o “Snail” e o “ZEB1”³⁰¹. A expressão do “Snail” também pode ser regulada, pelo miARN-29b e pelo miARN-30a. Quanto ao miARN-1 e ao miARN-200b, podem reprimir a expressão do “Slug”. Existem vários outros exemplos descritos na literatura^{304,306,307}. Dados mais recentes, também permitem relacionar

os lncARN com a regulação da TEM³⁰⁸. Em particular, o SChLAP1 poderá influenciar a TEM, através da modulação do complexo modificador de cromatina SWI/SNF (“Switch/Sucrose Nonfermenting”) e da via de sinalização da MAPK³⁰⁷. Ao nível proteico também ocorre regulação da TEM. Um exemplo ilustrativo da importância dos fenómenos pós-translacionais inclui a degradação, mediada pela ubiquitina, do “Snail” e do “Twist”, após fosforilação, respetivamente pelas quinases GSK3b e MAP³⁰¹.

1.7.5. Efeitores fenotípicos

A complexa regulação genética da TEM corporiza-se através de efetores que corporizam as modificações fenotípicas que a caracterizam. Em seguida descrevem-se os mais importantes.

Repressão da expressão de caderina E. A caderina E é uma glicoproteína epitelial transmembranar que promove a adesão intercelular. O domínio extracelular liga-se a outra molécula de caderina E, pertencente a outra célula, formando a “zona adherens”. O domínio intracitoplasmático liga-se ao citoesqueleto através das cateninas e de outras proteínas. O citoesqueleto de actina dá rigidez estrutural à célula. Por esta razão, é importante na manutenção da integridade epitelial. Desempenha um papel fulcral na determinação de um fenótipo epitelial versus mesenquimatoso e parece ser um dos primeiros fenómenos que ocorre na TEM. Alguns trabalhos sugerem que a supressão isolada da expressão de caderina E é suficiente para que as células adquiram uma morfologia mesenquimatosa e capacidade de mobilização. Por outro lado, em células sem expressão de caderina E, a indução da sua expressão suprime a capacidade de invasão e de metastização³⁰⁰. A repressão do CDH1, gene que codifica a caderina E, pode ocorrer por metilação do promotor, mecanismo mais frequente, ou por mutações. Para além da degradação da caderina E e da diminuição de expressão do CDH1, a TEM também está associada à repressão de genes que codificam outras proteínas (claudinas, ocludinas, desmoplaquinas e placofilinas) que também participam na ligação entre células epiteliais³⁰⁴.

Expressão de caderina N. Tal como a caderina E, a caderina N participa na ligação intercelular. Mas ao contrário da caderina E, a sua função fisiológica ocorre

sobretudo em tecidos não epiteliais. Em termos fisiopatológicos a célula neoplásica expressa caderina N, o que aumenta a sua afinidade por células do estroma, como os fibroblastos, que também expressam caderina N. Deste modo, facilita a motilidade e a invasão. A ligação entre moléculas de caderina N é mais fraca do que a ligação entre moléculas de caderina E³⁰⁰. Está associada ao recetor do FGFR (“fibroblast growth factor receptor”), ativando-o e, deste modo, promove a acumulação nuclear de catenina²¹⁹.

“Switch” de caderinas. A diminuição da caderina E e o aumento da caderina N podem ocorrer em simultâneo. Este “switch” ocorre durante a embriogénese. Em modelos tumorais, este “switch” parece ser induzido pelo HGF (“Hepatocyte Growth Factor”)³⁰⁰.

Expressão de vimentina. A vimentina pertence ao grupo dos filamentos intermediários, que são constituintes do citoesqueleto. Ocorre sobretudo em células mesenquimatosas e em células indiferenciadas. À medida que as células se diferenciam, a vimentina tende a ser substituída por outras proteínas da mesma família. O aumento da vimentina inibe a diferenciação celular.

Expressão de fibronectina. É uma proteína da matriz extracelular (MEC) que participa na adesão das células à matriz e na sua orientação durante a mobilização. As integrinas expressas na superfície celular são recetores da fibronectina. Esta proteína é normalmente secretada pelos fibroblastos.

Expressão diferencial de integrinas. As integrinas são uma família de proteínas transmembranares que permitem às células ligarem-se à matriz extracelular e, deste modo, facilitam a sua mobilização. A integrina $\alpha_v\beta_6$ é expressa em tecidos epiteliais sujeitos a processos de cicatrização e de inflamação crónica. A sua expressão também está associada à TEM e tende a ocorrer no interface entre o tumor e o estroma³⁰⁰. Durante o processo de TEM, a célula tumoral pode promover a expressão de algumas integrinas e suprime a expressão de outras. Por exemplo, suprime a expressão da integrina $\alpha_6\beta_4$, que medeia a ligação à membrana basal. Várias outras integrinas estão associadas à TEM³⁰⁴. A mudança do repertório de integrinas associa-se a expressão de proteases, nomeadamente metaloproteínases e confere especificidade espacial a este aumento.

Repressão da expressão das cateninas. Estas proteínas participam na ligação da caderina E ao citoesqueleto. A sua perda está associada à TEM. As cateninas também poderão atuar através da via do Wnt.

Secreção de proteases (metaloproteinases). A secreção de proteases, nomeadamente metaloproteinases, é uma das características da TEM. A invasão requer que a célula tumoral remodele o microambiente que a rodeia, abrindo caminho através da membrana basal, da MEC e de outras células. Os principais atores desta transformação são as proteases, nomeadamente as metaloproteinases (MP). Estas podem ser secretadas ou estarem associadas à membrana celular. Nas neoplasias, a maioria das proteases são recrutadas a partir das células do estroma, sobretudo a partir dos macrófagos, mastócitos e fibroblastos. Os produtos de degradação da MEC, como a fibronectina, o TGF- β e os colagénios, podem eles próprios contribuir para a indução e manutenção da TEM. Existem vários tipos de MP. A MP membranar de tipo 1 tem uma importância crítica, cliva componentes da MEC e moléculas de adesão intercelular, como as caderinas e as integrinas. Pode ainda clivar precursores de outras proteases, ativando-as. Em modelos animais um aumento de expressão de MP associa-se ao desenvolvimento de neoplasias^{300,304}.

Ativação de vias de sinalização intracelulares associados a recetores transmembranares, com função de tirosina quinase³⁰⁴:

- **PI3K/Akt e ERK/MAPK.** A sinalização através destas vias é essencial para a TEM, que depende da ativação de vias de sinalização. A ativação ocorre pela ligação de factores de crescimento ou constitucionalmente através de mutações. Estas vias promovem a expressão de “Snail” e de “Slug”, bem como a ativação das proteínas Rho.
- Via associada ao **FGF (“Fibroblast Growth factor”)**. O FGF promove a TEM através de vários mecanismos.
- Via associada ao **HGF**. O HGF, em células epiteliais, é um dos principais indutores de mobilidade. Dai ser também conhecido como “Scatter factor”. Em culturas celulares normalmente organizadas em monocamada, o HGF leva a movimento multidirecional das células. Promove o “switch” de caderinas e participa na destabilização de outras ligações intercelulares. Induz a expressão de “Snail” e de “Slug”.

- Via associada ao **IGF-1**. Induz TEM em culturas celulares. A associação a TEM é explicada através de vários mecanismos.
- Via associada ao **EGF**. Mais uma vez são múltiplos os mecanismos descritos que podem explicar a TEM associada a este factor de crescimento.
- Via associada ao **PDGF (“factor de crescimento derivado das plaquetas”)**. Pode ser induzida pelo TGF- β e parece ter um papel importante em neoplasias do cólon.
- **Via de sinalização Wnt**. A ativação desta via leva à acumulação de catenina no núcleo. Aqui liga-se a factores de transcrição que conduzem a proliferação celular.
- Existem outras vias de sinalização que poderão participar na TEM, tais como a via de sinalização do Hedgehog e a via de sinalização associada ao Notch^{300,304}.

Um outro aspeto relevante, é a comunicação e a cooperação entre as várias vias de sinalização. Esta ocorre durante a embriogénese e em situações fisiopatológicas³⁰⁴. Um exemplo ilustrativo é dado pela cooperação entre as vias do TGF- β e das proteínas Wnt. O TGF β destabiliza a zona “adherens”, libertando a catenina que se acumula no núcleo reforçando o resultado da via canónica das proteínas Wnt. Estão descritos vários outros exemplos de comunicação e cooperação entre diferentes efetores.

Proteínas Rho. São responsáveis pelo controlo da mobilidade celular e participam na perda da polaridade “apical-basal”. Trata-se de um grupo de proteínas relacionadas com o gene Ras e que pertencem à família Rho. Estas proteínas funcionam como interruptores, alternando entre a forma ativa, ligada ao GTP, e a forma inativa, quando hidrolisa o GTP em GDP (“GTPase”). As várias proteínas Rho possuem funções diversas e especificidade espacial dentro do citoplasma. Quando esta especificidade se perde e há uma ativação global destas proteínas, a célula mobiliza-se em todas as direções, formando um anel contínuo à periferia do citoplasma. Estas proteínas podem ser ativadas por factores de crescimento como o PDGF ou através de vias de sinalização como a PI3K/Akt³⁰⁰.

1.7.6. Características morfo-funcionais

Dado os vários FT, o elevado número de genes e os múltiplos efetores implicados na TEM, é fácil entender que se trata de processo biológico extremamente complexo. Aliás, à data atual, faz mais sentido admitir a TEM como um conjunto dinâmico de múltiplos estádios transitórios, entre os fenótipos epitelial e mesenquimatoso³⁰⁹. Esta conceção, por oposição à visão binária simplista, permite compaginar, com mais facilidade, as noções de parcialidade, reversibilidade e especificidade espacial^{300,301}. Estes estádios intermédios, tal como sugerido acima, muito provavelmente resultam de um equilíbrio entre indutores, inibidores e facilitadores. Podem ajudar a explicar a organização espacial da TEM, mais evidente na frente invasiva e menos evidente em zonas mais centrais. Estes achados, sustentam a noção de gradiente de TEM, pelo menos em modelos tumorais³⁰¹.

Talvez o aspeto último que testemunha a complexidade e a heterogeneidade associada ao TEM, são as mudanças profundas que ocorrem na morfologia, no metabolismo e na motilidade da célula tumoral:

- Capacidade de invasão.
- Motilidade. As protéases, ao degradarem a MEC, abrem caminho para a migração das células tumorais. Estas, para o aproveitarem, necessitam de adquirir capacidade de mobilização. A mobilização é uma propriedade, que se considera essencial para a cascata de invasão/metastização. *In vitro*, a mobilização pode ser induzida por determinados factores de crescimento, que são designados por “motogénicos”. Para as células epiteliais um dos principais indutores de mobilidade é o HGF. A maquinaria celular que é responsável pela transdução dos sinais motogénicos é extremamente complexa, sendo regulada pelas proteínas Rho. A mobilidade celular requer constantemente, uma reestruturação do citoesqueleto bem como o estabelecimento e a ruptura de ligações com a MEC^{300,304}.
- Aumento da resistência a senescência e a apoptose. Estes fenómenos associados à TEM podem ter muita importância, sobretudo após o extravasamento, de modo a permitir a sobrevivência da micrometástase³⁰³. Podem ainda explicar a quimioresistência que parece estar associada à TEM³⁰¹.

- Aquisição de características de células estaminais. Do ponto de vista biológico, a TEM pode participar em quase todos os processos que constituem a “cascata” da invasão/metastização. Para completar a última etapa desta “cascata”, a célula tumoral deverá ter características de CEN. Existe evidência que associa o fenómeno de TEM ao desenvolvimento de potencial estaminal³⁰⁰. A associação entre TEM e potencial estaminal começa por ser evidente a nível da embriogénese, em que células epiteliais pluripotentes sofrem TEM. Por outro lado, pode ocorrer reprogramação de fibroblastos em CE. A eficácia desta reprogramação parece depender do TGF- β . Aliás, ambas a TEM e a aquisição de potencial estaminal estão associadas ao TGF- β . A expressão de “Snail” ou “Twist” induz a expressão de marcadores similares aos observados em CE epiteliais. CEN podem expressar marcadores associados a TEM. A associação entre TEM e CEN, poderá facilitar a seleção de uma CEN, que possua uma nova mutação³⁰⁴.
- Perda de polaridade da “apical-basal”, típica da célula epitelial. Após início da TEM, os vários tipos de junções entre células epiteliais são destruídos e as proteínas que os constituem são relocalizadas ou destruídas. A caderina E é clivada da membrana e degradada, levando à libertação de catenina. Esta pode ser protegida da degradação, pela via de sinalização Wnt, e acumular-se. Posteriormente ocorre diminuição da expressão das proteínas que constituem as junções. Este fenómeno também poderá estar relacionado das proteínas Rho.³⁰⁴. Concomitantemente ocorre uma desregulação das várias proteínas (“Par”, “Crumbs” e “Scribble”) responsáveis pela manutenção da polaridade apical-basal³⁰³.
- Reorganização do citoesqueleto. Este ocorre de modo a permitir projeções do citoplasma (lamelopodias) e mobilização da célula. Estas projeções concentram atividade proteolítica (MP)³⁰⁴.
- Aquisição de morfologia mesenquimatosa e de polaridade “frente-trás”.
- Modificação do padrão de associação com células vizinhas.

1.7.7. Transição epitelial-mesenquimatosa e tumores da próstata

Aceita-se que a TEM é ativada em células tumorais. No entanto o impacto da TEM na progressão tumoral e enquanto factor prognóstico ainda não está bem estabelecido. Em relação a este particular, a literatura disponível vai desde o ceticismo à aceitação incondicional, passando pela dúvida cautelosa, não obstante a quantidade descomunal de dados disponíveis. Por outro lado, estes mesmos dados pouco acrescentaram à abordagem diagnóstica e terapêutica das doenças oncológicas.

Os dados publicados em relação aos TP sugerem que a associação existe, mas o seu verdadeiro impacto em termos clínicos, também não está perfeitamente estabelecido. É certo que a TEM poderia explicar alguns dos aspetos associados à história natural dos TP, nomeadamente a recorrência local após tratamento do tumor primário com intuito curativo. A evidência que associa o fenómeno de TEM ao TP, tal como noutros tumores é grande medida resultante de trabalhos “in vitro” em linhas celulares e em “in vivo” em modelos animais. Embora muito numerosos, são sobretudo estudos de cariz mecanístico, que procuram associar um determinado indutor, facilitador ou inibidor a um determinado efector ou efetores. Os artigos de revisão recentes^{307,310-312} sugerem algumas especificidades da TEM associada aos TP:

- Relação com androgénios. Os androgénios são essenciais para a fisiologia e fisiopatologia da próstata. A desregulação dos androgénios e do seu “eixo” parecem ser importantes para a TEM associada ao TP. Existem vários estudos que associam os androgénios e o seu eixo, a vários indutores e efetores. No entanto, seu papel exato é questionável. Há estudos que associam a TEM aos androgénios e outros à deprivação dos mesmos. A TEM poderá ainda participar no desenvolvimento de resistência a castração e à quimioterapia e na diferenciação neuroendócrina. Há ainda que referir o “diálogo” entre o eixo dos androgénios e via de sinalização do TGF- β .
- Relação com estrogénios. Os estrogénios também podem participar na fisiologia e fisiopatologia da próstata. O seu papel no TP é questionável. Repete-se a noção de que existem múltiplos estudos que associam os recetores de estrogénios (α e β) a vários indutores e efetores. Eventualmente merecedor de destaque será a relação entre o recetor de estrogénios β e a hipóxia. O recetor de estrogénios β parece suprimir a proliferação. A hipóxia

parece suprimir a expressão do recetor de estrogénios β e estimular a expressão de HIF1 α , levando a TEM.

Tudo somado é inquestionável que a TEM está associada a uma maior agressividade biológica. É, no entanto, mais questionável qual o verdadeiro impacto clínico da TEM. O inequívoco esclarecimento deste impacto é dificultado por vários factores. Os principais serão a parcialidade, a reversibilidade e a especificidade espacial. Provavelmente, todas majoradas pela reconhecida heterogeneidade dos TP. Deste modo é fácil compreender que em biopsias e em células tumorais circulantes, poderá ser difícil, com a metodologia atual, ter uma noção concreta da verdadeira dimensão da TEM. Logo, é difícil atribuir-lhe um seguro significado prognóstico ou preditivo. Melhorias tecnológicas como as assinaturas genéticas³¹³ ou aumento do conhecimento, nomeadamente acerca dos estádios intermédios³⁰⁹, poderão permitir ultrapassar esta dificuldade. No imediato o principal interesse prognóstico dos marcadores associados à TEM está confinado às peças histológicas obtidas a partir de PR³¹².

Existem vários trabalhos publicados que procuram estabelecer o interesse preditivo de recorrência bioquímica, dos marcadores de TEM, avaliados em peças cirúrgicas. O mais representativo é provavelmente o trabalho de Behnsawy e colaboradores³¹⁴. Em 197 doentes com TP localizado e tratados com PR procurou-se estabelecer o impacto prognóstico de marcadores de TEM (caderina E, caderina N, catenina- β , catenina- γ , fibronectina, metaloproteinase-2, metaloproteinase-9, "Slug", "Snail", "Twist", vimentina, "ZEB1" e ZEB2). A caderina E, o "Snail", o "Twist" e a vimentina, mas não os restantes marcadores, associaram-se de modo significativo a factores clínicos e patológicos de pior prognóstico. Em análise univariável, caderina E, "Snail", "Twist" vimentina, PSA pré-operatório, SG, invasão das vesículas seminais, margens cirúrgicas positivas e volume tumoral, associaram-se de modo significativo a diminuição da sobrevivência livre de RBQ. Na análise multivariável o "Twist", a vimentina, a invasão das vesículas seminais e margem cirúrgica positiva mantiveram significância estatística.

Não obstante os seus resultados, a este estudo pode ser apontado a pequena dimensão da amostra e a escolha arbitrária dos marcadores. Por outro lado, os seus resultados não são sobreponíveis aos da restante literatura. Numa tentativa de

esclarecer esta discrepância, os dados foram avaliados em conjunto e o resultado foi publicado, recentemente, sob a forma de metaanálise³¹⁵. Esta metaanálise avaliou a relação entre marcadores de TEM e a sobrevivência livre de RBQ. Como objetivo secundário avaliou qual a relação entre a intensidade da expressão de marcadores de TEM (“fraco” vs. “forte”) e TP de “alto-risco”. Este último foi definido como tendo um SG maior ou igual a 8 e um PSA pré-operatório superior a 20 ng/mL. Os marcadores avaliados foram: caderina E, caderina N, catenina- α , catenina- β , catenina- γ , fibronectina, metaloproteinase-2, metaloproteinase-9, Vimentina, “Snail”, “Twist”, “Slug”, “ZEB1” e “ZEB2”. Os critérios de inclusão dos estudos foram: Tratamento do tumor primário com PR; avaliação de marcadores exclusivamente na peça operatória; os resultados da expressão de marcadores expressos dicotomicamente (“fraco” vs. “forte”) ou através de frequência relativa; e a utilização da regressão de Cox para cálculo da sobrevivência livre de RBQ. Foram selecionados 25 estudos. Nos resultados dos estudos isolados, uma diminuição da sobrevivência livre de RBQ associou-se apenas a sobre expressão de caderina N, “Twist”, Vimentina e “Slug”. Após avaliação dos dados através da metodologia de metaanálise o impacto do “Snail” também se tornou significativo. Os restantes marcadores não tiveram impacto significativo. Em relação aos tumores com SG maior ou igual a 8, estes apresentaram, de modo significativo, uma diminuição da expressão de caderina E e da catenina- α e um aumento da expressão de caderina N, “Snail”, “Twist” e Vimentina. Apenas um estudo relacionou o PSA pré-operatório com marcadores de TEM.

1.8. “Second Chromosome Locus Associated with Prostate-1” e outros “long non-coding RNA”

De acordo com dados do “Human Genome Project”, apenas 1.5 a 2% do genoma humano é traduzido³¹⁶. Cerca de 70% do genoma humano é transcrito para moléculas de ARN que não codificam proteínas. Admite-se que a maioria destas moléculas são funcionais e não representam apenas “ruído” transcricional³¹⁷. A molécula de ARN é um polímero versátil com múltiplas funções. Este facto deve-se às suas propriedades³¹⁸:

- Capacidade de se ligar a outros ácidos nucleicos (ADN e ARN) através de

interações baseadas numa única base. Outras moléculas como ativadores de transcrição necessitam de uma sequência genética, cem vezes maior, para poderem estabelecer uma ligação específica.

- Podem dar origem a estruturas tridimensionais complexas com capacidade de reconhecimento de uma grande variedade de ligandos, desde pequenas moléculas a proteínas.
- Trata-se de uma molécula dinâmica, que rapidamente pode ser transcrita e degradada. Uma ação reguladora, exercida por uma molécula de ARN, é forçosamente mais rápida, pois dispensa a necessidade de tradução.
- É uma molécula maleável, com maior tolerância a mutações, o que a torna numa excelente plataforma em termos de evolução. Este aspeto é reforçado pela possibilidade de moléculas de ARN terem a capacidade de serem reintegradas no genoma.

Existem várias classes de ARN, entre as quais os “long non-coding RNA” (“Lnc-RNA”). Esta classe parece representar a maioria das transcrições^{319,320}. Os “Lnc-RNA” são caracterizados por terem uma sequência longa (>200 nucleóticos) não codificante³²¹. Possuem várias outras características. São transcritos pela RNA Polimerase II e estão associados a assinaturas epigenéticas (H3K4me3; H3K36me3) frequentemente presentes em genes que são traduzidos³²². No estudo destas moléculas, um dos aspetos mais complexos prende-se com a afirmação ou negação da funcionalidade dos vários “Lnc-RNA”. Métodos como a perturbação direta (ganho ou perda de função) e a degradação de ARN, permitiram estabelecer a importância funcional dos “Lnc-RNA”³²³. Há dados suficientes que nos permitem abandonar o conceito de que estas moléculas representam apenas ruído transcricional a partir de “junk DNA”. Contudo, aceita-se que nem todos os “Lnc-RNA” são funcionais. Por outro lado existe a noção de que os “Lnc-RNA” poderão ter especificidade tecidual, celular e eventualmente compartimental, a nível, intracelular^{321,323}. Por fim, há que ressaltar o facto de diferentes “Lnc-RNA” poderem ter funções divergentes, num mesmo processo celular.

Não obstante o crescente e rápido reconhecimento da sua importância, muitos dos aspetos referentes à fisiologia e à fisiopatologia destas moléculas permanecem obscuros.

1.8.1. Mecanismos de ação dos “long non-coding RNA”

Num excelente trabalho de revisão, Geisler e Coller revisitam os múltiplos possíveis mecanismos de ação dos “Lnc-RNA”³¹⁸.

Regulação da transcrição (figura 4). A maioria das funções atribuídas aos “Lnc-RNA” parecem passar por este mecanismo de ação. A regulação da transcrição poderá ser exercida a vários níveis:

- Ligação a complexos modificadores da cromatina. Ao modular a cromatina, regulam a transcrição, ativando-a ou reprimindo-a. Trata-se de um mecanismo independente da transcrição.
- A transcrição da própria molécula de “Lnc-RNA”, pode por si mesmo modular a cromatina e favorecer a ligação de factores reguladores. Trata-se de um mecanismo dependente da transcrição.
- Várias outras ações poderão participar na regulação da transcrição. Os “Lnc-RNA” podem ligar-se diretamente a polimerases, inibindo a transcrição. Os “Lnc-RNA” podem regular a ligação e atividade de factores de transcrição. Podem ligar-se a ADN formando estruturas complexas que inibem o começo da transcrição. Podem mimetizar áreas de ligação ao ADN e deste modo inibir ou ativar factores de transcrição. Por fim, podem inibir o transporte para o núcleo de factores e participar na organização dos vários subcompartimentos nucleares.

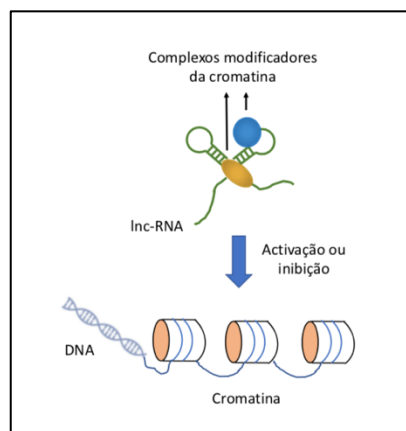


Figura 4. “Lnc-RNA” e regulação da transcrição. Adaptado de Geisler e Coller³¹⁸.

Regulação do processamento do ARN mensageiro (figura 5). Ainda durante a transcrição, a molécula de ARN mensageiro (ARNm) começa a ser processada dando origem a uma de várias isoformas possíveis. Os “Lnc-RNA” podem influenciar este processamento. O modo como exercem esta influência não está completamente esclarecido. Admite-se que possam ocultar o local de “splicing” e bloquear o recrutamento do “spliceosome”. Por outro lado, poderão favorecer o “splicing” alternativo e participar diretamente na edição do ARNm.

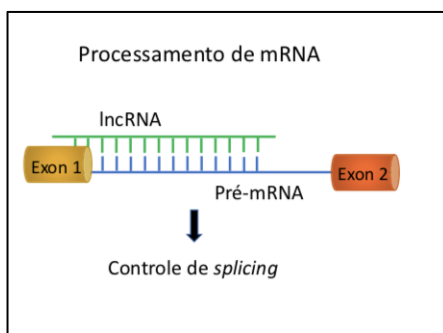


Figura 5. “Lnc-RNA” e regulação do processamento do ARNm. Adaptado de Geisler e Coller³¹⁸.

Modulação do controlo pós-transcricional (figuras 6 e 7). Após o processamento e exportação citoplasmática, as moléculas de ARNm são sujeitas a vários mecanismos regulatórios, que deste modo, contribuem para a modulação da expressão genética.

- Controlo da tradução. Os “Lnc-RNA” posicionam as moléculas de ARNm, aumentando a expressão proteica sem alterar a quantidade de ARNm.
- Controlo da estabilidade do ARNm. Esta regulação pode ser no sentido positivo ou negativo.
- “Esponjas” de miRNA. Os “Lnc-RNA” podem competir com outros ARN, pela ligação ao ARNm. Por outro lado, podem sequestrar proteínas e efetores relacionados com ARN, contribuindo para uma complexa rede de interações. Os ARN com esta propriedade são designados por “competing endogeneous RNA”.

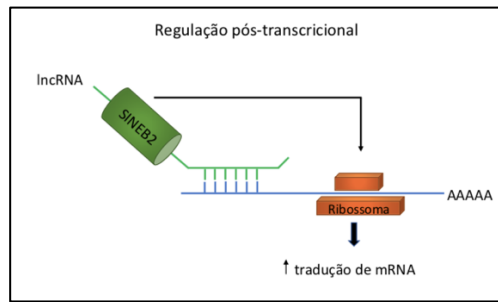


Figura 6. “Lnc-RNA” e regulação pós-transcricional. Adaptado de Geisler e Collier³¹⁸.

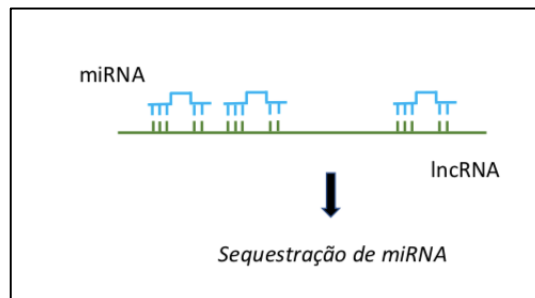


Figura 7. “Lnc-RNA” com função de “competing endogeneous RNA” . Adaptado de Geisler e Collier³¹⁸.

Regulação da atividade proteica (figura 8). Os “Lnc-RNA” também podem atuar ao nível das proteínas, nomeadamente dos factores de transcrição. Podem conduzir a “splicing” alternativo, através de interação com os reguladores de “splicing”. Estas moléculas possuem ainda a capacidade de inibir uma grande variedade de reações enzimáticas. Há ainda que referir a capacidade de modular as proteínas que se ligam às várias classes de ARN.

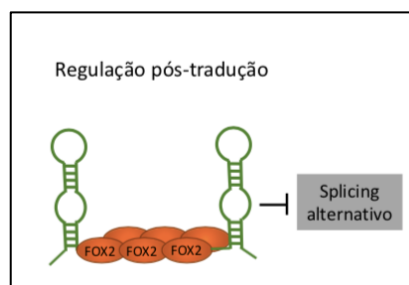


Figura 8. “Lnc-RNA” e regulação pós tradução. Adaptado de Geisler e Collier³¹⁸.

Papel de suporte de estruturas celulares complexas (figura 9). Existem dados que sugerem que os “Lnc-RNA” podem funcionar como estruturas de suporte.

- Provavelmente será esta, a principal função dos “Lnc-RNA” ao nível complexos modificadores da cromatina.
- Inteiração com telómeros. Os “Lnc-RNA” podem participar na extensão dos telómeros e deste modo manter a sua dimensão em células que estejam a replicar-se. Podem servir de suporte as proteínas reguladoras dos telómeros. Por outro lado, podem contribuir para o encurtamento dos telómeros. Como tal os “Lnc-RNA” parecem ter um papel importante na hemóstase dos telómeros.
- Interaçãõ com ribossomas. Esta interação parece acontecer sobretudo aquando da exportação dos polipeptídeos para o reticulo endoplasmático.
- Organização de varias subestruturas nucleares. Os “Lnc-RNA” parecem estar estrutural e funcionalmente relacionados com “histone locus bodies”, grânulos intercromatina, “paraspekles” (estrutura nuclear que poderá mediar a retenção, no núcleo, de ARNm híper-editado) e de “corpos nucleares de stress”.
- Organização de outras estruturas celulares de elevada complexidade como é o caso das que suportam a glicólise e o ciclo de Krebs.

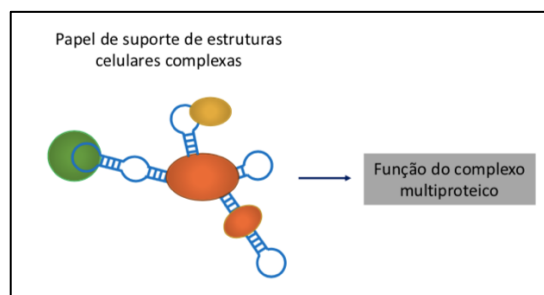


Figura 9. “Lnc-RNA” e a função de suporte de estruturas celulares complexas. Adaptado de Geisler e Coller³¹⁸.

Moléculas sinalizadoras (figura 10). As moléculas de ARN podem ser transferidas de uma célula para outra através de exossomas. A formação e trafico destas vesículas é um processo extremamente regulado e seletivo. Como tal um “Lnc-RNA” poderá

servir como um sinal, que modificaria várias funções celulares na célula recetora. Potencialmente de modo duradouro, pois os “Lnc-RNA” poderão ser integrados no genoma (figura 11).

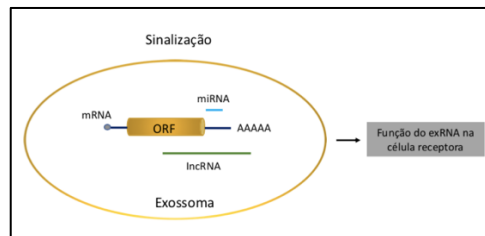


Figura 10. “Lnc-RNA” como moléculas sinalizadoras. Adaptado de Geisler e Coller³¹⁸.

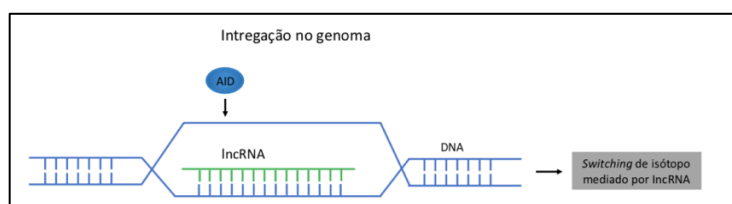


Figura 11. Integração no genoma de “Lnc-RNA”. Adaptado de Geisler e Coller³¹⁸.

É fácil compreender que perante tamanha abundância, variedade e pleomorfismo funcional, os “Lnc-RNA” estejam implicados em múltiplas funções celulares. Os exemplos que consubstanciam esta realidade são múltiplos. Os “Lnc-RNA” estão implicados em: “imprinting”, regulação epigenética; apoptose, controlo do ciclo celular, regulação da transcrição e da tradução, “splicing”, desenvolvimento e diferenciação celular e senescência celular³²². Uma revisão dos múltiplos exemplos específicos que consubstanciam esta realidade, extravasa o âmbito deste trabalho.

1.8.2. “Long non-coding RNA” e doença oncológica

Também são muito numerosos os trabalhos que avaliam a fisiopatologia dos “Lnc-RNA”, nomeadamente em contexto de doença oncológica. Há dados que consubstanciam a noção de que os “Lnc-RNA”, estão desregulados e participam no estabelecimento e manutenção do fenótipo neoplásico. Polimorfismos genéticos incluindo “single nucleotide polymorphisms” (SNP) podem ocorrer em áreas do genoma que não codificam proteínas, como é o caso de áreas transcritas como miRNA e “Lnc-RNA”. SNP ao nível de vários “Lnc-RNA” poderão estar associados a

um aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias, como o carcinoma da próstata³²⁴, cabeça e pescoço³²⁵, mama³²⁶ e carcinoma hepatocelular³²⁷. Após o estabelecimento do fenótipo maligno, os “Lnc-RNA”, podem ter uma função oncogénica ou de supressão tumoral. Estudos demonstraram-no em vários tumores como próstata, mama, pulmão, fígado, cólon e leucemia³²³.

“Lnc-RNA” e supressão tumoral. São vários os mecanismos celulares através dos quais se admite que os “Lnc-RNA” podem exercer uma função de supressão tumoral:

- Relacionado com p53. Vários “Lnc-RNA” estão incluídos na rede de genes cuja transcrição é modulada pelo p53³²³. O “Lnc-RNA” “activator of enhancer domains” (LED) é um deles. A transcrição do LED é induzida pelo p53. Por outro lado, o LED participa na regulação da transcrição de outras áreas do genoma associados ao p53. A supressão do LED atenua a função do p53. Os níveis de LED estão diminuídos em várias neoplasias³²⁸. O “maternally expressed gene 3” (MEG3) interage com o “locus” de ligação ao ADN do p53, estimulando a sua ativação. Demonstrou-se que está desregulado em vários tumores³²³. O “Lnc-RNA-p21” regula a p21. A depleção deste “Lnc-RNA” acelera a progressão do ciclo celular. Também se demonstrou estar desregulado em linfomas³²⁹ e em carcinomas do cólon³³⁰.
- O “Lnc-RNA” GUARDIN é ativado em resposta a lesão do ADN. Promove a sobrevivência celular contribuindo para a estabilidade genética. A sua depleção resulta na fusão dos telómeros e induz a senescência e a apoptose. Adicionalmente é um dos constituintes que integra a complexo ribonucleoproteico que inclui o BRCA1³²³.
- O “Lnc-RNA” NEAT1 também está relacionado ao p53. Em situações de agressão celular induz a formação e manutenção de “paraspekles”³³¹. A desregulação do NEAT1 poderá ter impacto em tumores da mama e do cólon.
- PTENP1 é um pseudogene do gene de supressão tumoral PTEN. O “Lnc-RNA” PTENP1 funciona como “esponja” para determinados “miRNA” (miR-17, miR-19b and miR-20) que inibiriam o PTEN. Está implicado em tumores da próstata, da mama e hepatocelulares³²³.

“Lnc-RNA” com função de “oncogene”. Também existem múltiplos dados que associam vários “Lnc-RNA” à promoção do fenótipo maligno:

- MALAT1 é um dos constituintes do “nuclear speckle” (trata-se de um subcompartimento nuclear associado ao “splicing” e a metabolismo do ARN). É um factor de prognóstico em tumores do pulmão, embora a sua função fisiológica não seja evidente³³². Poderá, também, ter importância prognóstica noutros tumores como gliomas, carcinoma hepatocelulares e TP.
- HOTAIR é um “Lnc-RNA” associado ao desenvolvimento de metástases. Terá importância prognóstica em tumores da mama e do cólon³²³.
- NORAD é regulado pela maquinaria de reparação de ADN. Parece ter papel importante no estabelecimento da instabilidade cromossómica³²³. Poderá ter significado prognóstico em tumores do cólon, do esófago e da bexiga.
- PVT1 parece ser importante na fisiopatologia dos tumores associados ao oncogene MYC, como por exemplo alguns dos tumores do cólon, da bexiga e do colo do útero.

“Lnc-RNA” e plasticidade tumoral. Existe uma quantidade crescente de dados que associam os “Lnc-RNA” ao fenómeno de TEM (figura 12):

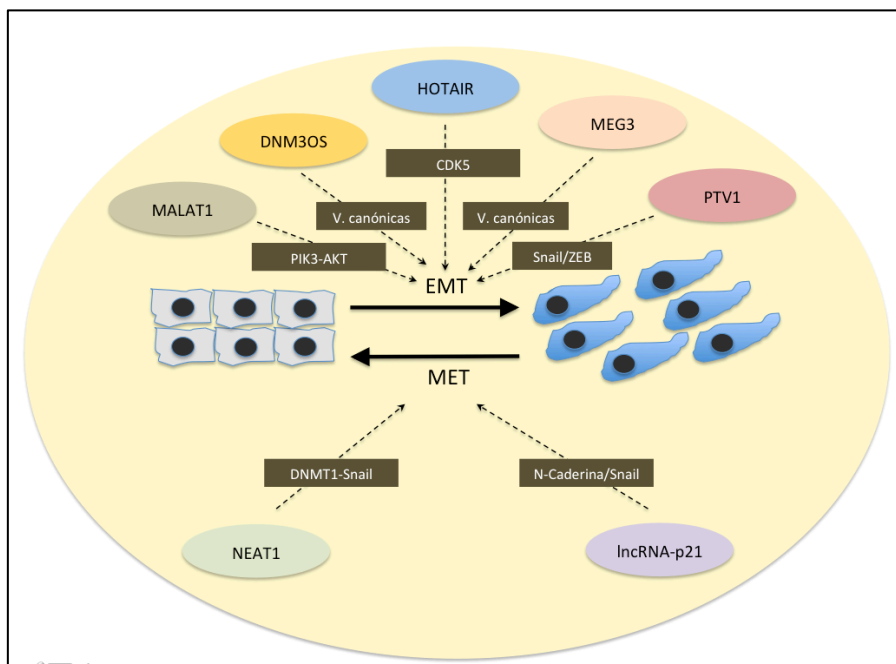


Figura 12. “Lnc-RNA” e transição epitelial-mesenquimatosa. Adaptado de Sanchez-Calle³²³.

- O DNMT3A e o DNMT3B contribuem para o estabelecimento de TEM em tumores epiteliais do ovário³³³. O DNMT3B também está implicado na regulação epigenética da TEM, em linhas celulares de tumor do pulmão³³⁴.
- A expressão de “Lnc-RNA-p21” está diminuída em tecidos e linhas celulares de carcinoma hepatocelular. A sua sobreexpressão inibiu a sinalização da via Notch e o estabelecimento de TEM. Por outro lado, a diminuição da expressão produziu o efeito inverso³³⁵. Em tumores gástricos o silenciamento de “Lnc-RNA-p21” promove a agressividade das células tumorais e induz a TEM. Níveis baixos de “Lnc-RNA-p21” associam-se a maior probabilidade de desenvolvimento de metastização e estádios TNM mais elevados³³⁶.
- Nos carcinomas da nasofaringe, o NEAT1 regula a TEM e poderá contribuir para a resistência a radioterapia³³⁷. Em osteossarcomas a expressão de NEAT1 está aumentada em tecidos e em linhas celulares, facto que parece ter importância prognóstica. A expressão de NEAT1 induz a TEM e suprime, epigeneticamente, a expressão de caderina E³³⁸.
- Em tumores epiteliais do ovário, a inibição de MALAT1 diminuiu a proliferação celular, invasão e surgimento de metastização. A nível molecular a diminuição de MALAT1 impediu a expressão de genes associados a TEM³³⁹. Neste modelo tumoral, o MALAT1 parece estar associado ao estabelecimento de TEM.
- O HOTAIR parece atuar como suporte estrutural que permite o recrutamento de EZH2 e de “Snail”. Deste modo forma-se um complexo com função inibitória que suprime a caderina E e promove a TEM, em hepatócitos não transformados. Por outro lado, em carcinomas hepatocelulares existe um aumento de EZH2, de HOTAIR e de “Snail”, o que se correlaciona com progressão e agressividade tumoral^{323,340}. Nos tumores da mama, o HOTAIR está relacionado com a TEM, através do microambiente tumoral e de mecanismos paracrinos. Os fibroblastos associados ao tumor secretam TGF- β 1. Esta citocina promove a expressão de HOTAIR a qual por sua vez induz a

TEM. Em modelos *in vivo*, a depleção de HOTAIR inibe o crescimento tumoral e a metastização dependente de fibroblastos associados ao tumor³⁴¹.

- A sobreexpressão de PVT1, em tumores pancreáticos leva a um aumento de expressão de “Snail” e de “ZEB1”³⁴².

Estes são apenas alguns dos múltiplos trabalhos que associam os “Lnc-RNA” à fisiopatologia tumoral. Os dados disponíveis enfatizam a extrema complexidade associada aos “Lnc-RNA”. Os mecanismos de ação são diversos e o resultado em termos de funcionamento celular nem sempre é igual, podendo mesmo ser divergente, quando consideramos um mesmo “Lnc-RNA”.

1.8.3. “Long non coding RNA” nos tumores da próstata.

Existem vários “Lnc-RNA” associados aos tumores da próstata (quadro 8).

Quadro 8. ““Lnc-RNA”” associados aos TP. Adaptado de Cimadamore³⁴³

“Lnc-RNA”	Características
PCA3	Marcador urinário. Factor preditivo de achados histológicos.
MALAT1	Aumento progressivo em formas mais agressivas da doença. Possível utilidade diagnostica.
FALEC	Associado a proliferação celular, migração e invasão.
CCAT2	Factor prognóstico.
LOC400891	Factor prognóstico.
ATB	Associado a factores clínico-patológicos de maior agressividade. Factor prognóstico.
ANRIL	Supressão de senescência através de INK4A
PCAT1	Proliferação celular (cMyc); inibição BRCA2. Sobre-expresso em doença metastática.
PCGEM1	Inibição de apoptose. Promoção proliferação celular. Desenvolvimento de resitência a castração(?).
PTENP1	Supressão de PTEN
SPRY4-IT1	Proliferação celular e invasão. Inibição de apoptose
PRNCR1	Desenvolvimento de resitência a castração(?).

O “Prostate cancer antigen 3” (PCA3) é provavelmente, de entre os “Lnc-RNA” associados ao tumor da próstata, o mais conhecido. A sua utilização clínica foi alvo de extensa avaliação. A deteção e quantificação de PCA3 na urina é preditiva dos

achados anatomopatológicos³⁴⁴. No entanto a sua utilização nunca se impôs na prática clínica diária, provavelmente por incapacidade de produzir ganhos significativos em termos da abordagem terapêutica. Este aspeto levou o “Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group” a desaconselhar o seu uso clínico³⁴⁵.

O “Lnc-RNA” MALAT1 está sobreexpresso no tecido de TP quando comparado com tecido normal. Um valor mais elevado de MALAT-1 associou-se a um score de Gleason mais elevado, a um valor de PSA mais elevado e a estádios mais avançados. Em modelos animais, a inibição do MALAT1 levou a redução do crescimento tumoral e da metastização³⁴⁶. MALAT1 urinário também poderá vir a ter interesse enquanto biomarcador. Doentes com biopsias positivas apresentaram valores de MALAT1 urinário significativamente mais elevados do que aqueles com biopsias negativas. De acordo com estes dados entre um terço a metade das biopsias seriam desnecessárias³⁴⁷. MALAT1 poderá também ser factor preditivo em doentes tratados com Enzalutamida e com Docetaxel^{348,349}. FALEC é outro “Lnc-RNA”. Parece ser regulado positivamente pela hipóxia. A sua expressão está aumentada no tecido tumoral de TP, em comparação com tecido normal. *In vitro* a diminuição de FALEC poderá inibir a proliferação celular, a migração e a invasão³⁵⁰.

O “Lnc-RNA” LOC400891 também parece ter importância prognóstica. Em doentes com TP, uma maior expressão de LOC400891 associou-se a uma sobrevivência livre de RBQ mais curta, mesmo quando se utilizou metodologia de análise multivariável³⁵¹. CCAT2 é outro “Lnc-RNA” com provável importância prognóstica. Digno de registo o facto de o mecanismo fisiopatológico associado ao CCAT2 provavelmente englobar a modulação da TEM³⁵². PCAT-1 é um “Lnc-RNA” que está marcadamente sobreexpresso nalguns TP, particularmente na doença metastática. Poderá contribuir para a proliferação celular nestes tumores, eventualmente através do MYC. Isto porque o PCAT-1 encontra-se no locus 8q24 “gene desert”, na vizinhança de alguns SNP, bem estabelecidos como factores de risco para TP, e do oncogene MYC³⁵³.

Embora parecem ter importância prognóstica e mesmo preditiva, os “Lnc-RNA” apresentam a limitação de não serem documentados com muita frequência. Um modo de otimizar a sua utilização, poderia passar pela utilização de assinaturas que

incluíssem vários “Lnc-RNA”³⁴³. Huang e colaboradores avaliaram mais de 100 “Lnc-RNA”, numa população de 291 doentes com TP. Selecionaram quatro “Lnc-RNA” que estavam significativamente associados a sobrevivência livre de RBQ. O RP11-108P20.4 e o RP11-757G1.6 estavam positivamente associados à sobrevivência livre de RBQ enquanto que o RP11-347I19.8 e o LINC01123 estavam associados de modo pejorativo. Com base nesta “assinatura” genética, criaram um score de risco que dicotomizou os doentes em alto e baixo risco. Em análise multivariável esta assinatura mostrou ser um factor de prognóstico independente da idade, do estágio T e N, do SG, da margem e da utilização de radioterapia adjuvante³⁵⁴.

Os dados referentes à importância prognóstica dos “Lnc-RNA” no TP, foram compilados numa meta-análise recente. Esta inclui dezoito estudos. Os resultados mostram que uma expressão anormal de “Lnc-RNA” está associada de modo significativo a sobrevivência livre de RBQ e a sobrevivência livre de progressão. Também confirma que a expressão de “Lnc-RNA” está relacionada com vários factores clínicos e anatomopatológicos, de reconhecido impacto prognóstico³⁵⁵.

1.8.4. “Second Chromosome Locus Associated with Prostate-1” (SChLAP1)

Numa tentativa de caracterizar os “Lnc-RNA” associados aos TP, o grupo de Prensner avaliou 102 amostras tecidulares e de linhas celulares de carcinoma da próstata. Para o efeito utilizou a tecnologia RNA-Seq. Em mais de 1800 “Lnc-RNA”, identificaram 121 que associaram aos TP. Para além do PCAT-1 também descreveram o PCAT-114. Caracterizaram-no como tendo origem num *locus* de transcrição extenso (>500 kb) localizado num “gene desert” no braço longo do cromossoma 2 (2q31). Esta região foi denominada “Second Chromosome Locus Associated with Prostate-1 (SChLAP1)³⁵³. O mesmo grupo, em trabalhos subsequentes, aprofundou a investigação sobre o SChLAP1. Num segundo trabalho, publicado em 2013, sugeriram de modo indelével, a importância prognóstica e postularam acerca do mecanismo de ação do SChLAP1³⁵⁶. O SChLAP1 é o produto da transcrição de um gene com 1,4 kb e que inclui até 7 exões. Possui várias isoformas de “splicing”, sendo que as variantes denominadas #1, #2, e #3, representam a maioria (>90%) das transcrições. A única alteração molecular, a que a expressão de SChLAP1 estava associada, era a presença de fusões do ETS. Confirmou-se a ausência

de potencial para codificar proteína. De modo a avaliar a importância prognóstica, utilizou-se uma coorte constituída por 235 doentes com TP localizado e tratados com prostatectomia. O SChLAP1 estava expresso em cerca de 25% dos casos. A expressão de SChLAP1 foi maior na doença metastática do que na doença localizada. Em termos prognósticos confirmou-se a importância do SChLAP1. A expressão de SChLAP1 foi um factor prognóstico independente para a RBQ e para a mortalidade específica por TP. A magnitude da sua importância prognóstica foi similar à do estágio clínico avançado e à do SG. A associação do SChLAP1 à agressividade biológica, foi adicionalmente sugerida através estratégias, *in vitro*, de ganho e de perda de função. O silenciamento de SChLAP1 diminuiu marcadamente a capacidade de invasão e de proliferação celular. A sua sobreexpressão em células prostáticas benignas aumentou marcadamente a capacidade de invasão. Em modelos animais, o silenciamento também diminuiu a capacidade de metastização. Por fim este trabalho lançou alguma luz acerca do mecanismo de ação do SChLAP1 (figura 13).

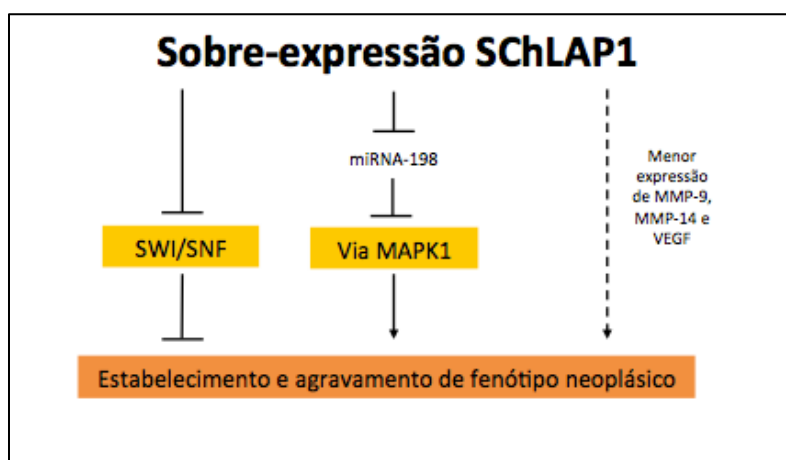


Figura 13. Mecanismos de ação do SChLAP1. Adaptado de Cimadamore³⁴³.

Antagoniza o complexo SWI/SNF. Este complexo, constituído por múltiplas proteínas, participa na regulação negativa da transcrição através da modulação dos nucleossomas e da cromatina. Perda funcional deste complexo promove a progressão neoplásica. Múltiplos componentes deste complexo estão

somaticamente inativos em várias doenças oncológicas. A inibição deste complexo pelo SChLAP1 parece ser mediada pela repressão da transcrição do gene SNF5. Outro mecanismo de ação possível, é através da via MAPK. Aparentemente mediado pelo miRNA198. O miR-198 parece exercer a sua função supressão tumoral através de inibição da via MAPK. O SChLAP1 diminui a expressão do miR-198 e poderá funcionar como “esponja” desta molécula. Deste modo, exerceria um papel de modulação na via MAPK³⁵⁷. Neste mesmo trabalho o silenciamento do SChLAP1 levou a uma diminuição das MMP-9 e MMP-14 e do VEGF.

O SChLAP1 parece ser relativamente específico da próstata, existindo em pequenas quantidades noutros órgãos e tecidos³⁵⁸. No entanto SChLAP1 também está sobre-expresso em tumores da bexiga quando comparado com tecido vesical normal. Em linhas celulares de tumores da bexiga, o silenciamento do SChLAP1 também assumiu uma função de supressão tumoral³⁵⁹. No último dos trabalhos disponibilizados pelo grupo de Prensner, tentou-se identificar quais os ARN associados a progressão de metastização após PR. Foram obtidas amostras de 1008 doentes com doença localizada e tratados cirurgicamente. A expressão genética foi determinada com base na plataforma “Affymetrix GeneChip”. O SChLAP1 foi hierarquizado como o primeiro de entre os genes sobreexpressos nos doentes em que ocorreu metastização. Com base em análise multivariável, a expressão de SChLAP1 (alta versus baixa) foi um factor preditivo independente de desenvolvimento de metastização a 10 anos. Esta capacidade só foi partilhada com o SG (8-10 versus 5-7)³⁶⁰.

A importância prognóstica do SChLAP1 foi confirmada pelos trabalhos de outro grupo. Utilizaram uma outra tecnologia, a “RNA *in situ* hybridization”, a qual permitiu a deteção de SChLAP1 a partir de blocos de parafina. Não obstante as diferenças metodológicas, confirmou-se a importância do SChLAP1 enquanto factor de prognóstico. Numa coorte de 150 doentes com carcinoma da próstata localizado, o SChLAP1 estava aumentado em 16% dos casos. Esta elevação associou-se a uma maior probabilidade de recorrência da doença e a factores clínicos e anatomopatológicos de alto risco³⁶¹. Numa expansão deste trabalho, que passou a incluir 935 doentes com TP localizados e tratados com PR, obtiveram-se resultados similares. Em vez de recorrência da doença, os autores procuram estabelecer uma

relação entre o SChLAP1 e desenvolvimento de TP letal. A expressão elevada de SChLAP1 ocorreu em 9.5% dos casos e associou-se de modo significativo a desenvolvimento de TP letal, independentemente da idade, do SG, do estágio patológico e da expressão de PTEN³⁶². Existe um outro trabalho extenso que consubstancia a associação do SChLAP1 a formas mais agressivas do TP. Em mais de 1300 doentes tratados com cirurgia ou com radioterapia, avaliou-se a importância prognóstica dos subtipos histológicos intraductal e cribiforme. A presença destes subtipos, a qual ocorreu em 211 casos, aumentou de modo significativo o risco de recorrência bioquímica (2 a 3 vezes) e de metastização (4 vezes). Em 156 tumores avaliou-se a abundância de ARN. O SChLAP1 foi o único gene com um aumento de expressão de 3 vezes nos tumores com subtipos intraductal e cribiforme, quando comparado com os tumores sem estes subtipos. Para além disso, num outro conjunto de 393 amostras, a expressão de SChLAP1 teve uma precisão superior a 80% na identificação de tumores com subtipos intraductal e cribiforme^{363,364}. O mesmo trabalho evidenciou ainda que tumores com subtipos intraductal e cribiforme estão associados a instabilidade genómica e a hipóxia.

Em termos genéricos, o ARN e as suas várias classes parecem querer compaginar um admirável mundo novo. Em nome desta minha percepção, transcrevo a seguinte frase: “With eyes open to new possibilities, undoubtedly we will be surprised by what we will find”³¹⁸. Em termos mais específicos, no que concerne aos TP, a investigação relativa aos “Lnc-RNA” é ainda relativamente recente. No entanto os dados disponíveis permitem afirmar com segurança que:

- Os “Lnc-RNA” tem um papel importante nas várias etapas da história natural dos TP.
- Esta importância parece ser mais significativa, se considerarmos especificamente o SChLAP1 (quadro 9).
- A utilização da informação aportada pelo SChLAP1 poderá modificar radicalmente a abordagem terapêutica dos TP. Enquanto factor preditivo e prognóstico poderá conduzir a otimização da abordagem terapêutica, sobretudo no que concerne à sua intensificação em contexto curativo. Por outro lado, o SChLAP1 poderá ser, em si mesmo, um alvo terapêutico através de estratégias que conduzam ao seu silenciamento.

Quadro 9. Estudos que avaliam SChLAP1 em tumores da próstata. Adaptado de Cimadamore³⁴³.

Referência	Amostra	Achados
Prensner ³⁵³	102 amostras tecidulares e linhas celulares de PCa.	Identificação de 121 “Lnc-RNA” associados a PCa. Descrição do SChLAP1.
Prensner ³⁵⁶	235 dts submetidos a PR; doença localizada.	Importância prognóstica do SChLAP1 (recorrência bioquímica e mortalidade específica). Sugestão do mecanismo de ação (Complexo SWI/SNF).
Prensner ³⁶⁵	1008 dts submetidos a PR; doença localizada.	Confirma importância prognóstica do SChLAP1. Valor prognóstico similar ao score de Gleason.
Mehra ³⁶¹	150 dts submetidos a PR; doença localizada.	Confirma importância prognóstica. Utilização de amostras conservadas em blocos de parafina.
Mehra ³⁶²	937 dts com PCa localizado.	Importância prognóstica independente de idade, score de Gleason e estágio patológico.
Chua ³⁶³	1325 dts com PCa localizado.	SChLAP1 foi o único gene com expressão aumentada >3x em subtipo intraductal e cribiforme. Pior prognóstico associado a subtipo intraductal e cribiforme.

2. OBJECTIVOS

O TP tem uma incidência elevadíssima. Com as opções terapêuticas disponíveis, a doença localizada é curável na maioria dos casos. No entanto a sua recorrência é um fenómeno quase sempre incurável, associado a morbilidade importante e a custos muito elevados. Existem abordagens terapêuticas adicionais que poderão diminuir o risco de recorrência. Como tal, é essencial conseguir identificar, com maior precisão, quais os doentes em que a doença irá recorrer. Será que a TEM e vários outros biomarcadores, dadas as suas características fisiopatológicas, poderão contribuir para uma otimização da predição de recorrência?

Com base nesta hipótese, definiram-se os seguintes objectivos de investigação:

- Avaliar quais os factores clínicos e anatomopatológicos, com valor preditivo de RBQ.
- Avaliar se a expressão de biomarcadores associados a TEM, possuem valor preditivo de RBQ.
- Avaliar se outros biomarcadores, representativos de vários processos fisiopatológicos celulares, possuem valor preditivo de RBQ.
- Avaliar se a sobreexpressão de SCHLAP1, possui valor preditivo de RBQ.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente tese foi elaborada de acordo com o regulamento n.º 320/2015 da NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas da Universidade NOVA de Lisboa.

A realização deste projeto de Doutoramento recebeu parecer positivo, por parte da Comissão de Ética da Fundação Champalimaud e da Comissão de Ética da NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas da Universidade NOVA de Lisboa (CEFCM).

3.1. Tipo de estudo

O estudo que serve de base ao presente projeto de investigação é observacional, do tipo coorte clínico, com uma componente retrospectiva e outra prospetiva. Em termos de investigação quando a experimentação não é possível, os estudos do tipo coorte representam a melhor opção para a obtenção de evidência³⁶⁶. Numa primeira fase, recolheram-se os dados referentes às variáveis clínicas e anatomopatológicas. Numa segunda fase, estudaram-se os biomarcadores e efetuou-se o acompanhamento dos doentes.

O resultado de interesse primário para o estudo foi a ocorrência de recorrência bioquímica.

3.2. População em estudo e critérios de seleção

O presente projeto de investigação tem por base uma população de 164 doentes com o diagnóstico de carcinoma da próstata localizado, tratados com prostatectomia radical, na Fundação Champalimaud, entre 1 de Junho de 2012 e 31 de Maio de 2016.

Os critérios de inclusão foram os seguintes:

- Doentes do sexo masculino, sem limite de idade, com carcinoma da próstata, estabelecido histologicamente.
- Doentes tratados com prostatectomia radical de intuito curativo.
- Ausência de evidência de disseminação a distância, à data da cirurgia.

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Realização de tratamento neoadjuvante e ou adjuvante.

- Ocorrência de persistência bioquímica durante os primeiros 3 meses após a cirurgia.
- Antecedentes de realização de outras formas de tratamento focal do carcinoma da próstata.
- Cirurgia radical realizada em contexto de “resgaste”, por recorrência ou persistência local.
- Documentação, intraoperatória, de margem cirúrgica positiva macroscópica.

Todos os doentes, desta série, foram tratados cirurgicamente após discussão do respetivo caso clínico em reunião multidisciplinar. Realizaram prostatectomia radical, por via laparoscópica, após confirmação do diagnóstico de TP por biópsia prostática. A decisão da realização de linfadenectomia foi baseada no nomograma de Briganti e colaboradores³⁶⁷. O estadiamento clínico local foi efetuado com base em toque rectal e em ressonância magnética multiparamétrica. A exclusão de disseminação a distância foi efetuada de acordo as “guidelines” da “European Association of Urology”⁶⁵. Foi realizado exame anatomopatológico de todas as peças cirúrgicas, por um único anatomopatologista dedicado, o Professor Doutor Antonio Lopez-Beltran. O estadiamento patológico da peça foi realizado de acordo com a sétima edição do sistema TNM da AJCC³⁶⁸. O seguimento dos doentes, após PR, foi efetuado com avaliação trimestral, durante o primeiro ano e daí em diante semestralmente. A cada consulta, os doentes realizaram avaliação clínica e quantificação de PSA.

Após avaliação inicial de todos os casos que cumpriam os critérios de inclusão, foram excluídos dezassete doentes. Destes, dez casos foram excluídos, porque se considerou que os dados clínicos e anatomopatológicos disponíveis estavam incompletos. Estes primeiros casos coincidiram com o arranque da atividade assistencial na Fundação Champalimaud. Como tal, os doentes foram submetidos a cirurgia no Hospital da Cruz Vermelha, o que acarretou avaliação por um outro Anatomopatologista e alguma dificuldade no acesso à informação clínica. Outros quatro doentes foram excluídos porque tiveram necessidade de realizar radioterapia externa adjuvante. Dois outros, por persistência e posterior progressão bioquímica durante os primeiros 3 meses, após a PR, e um último, porque estava a realizar

hormonoterapia neoadjuvante, à data da cirurgia. Daqui resultou a amostra populacional, utilizada neste estudo, constituída por 147 casos (figura 14).

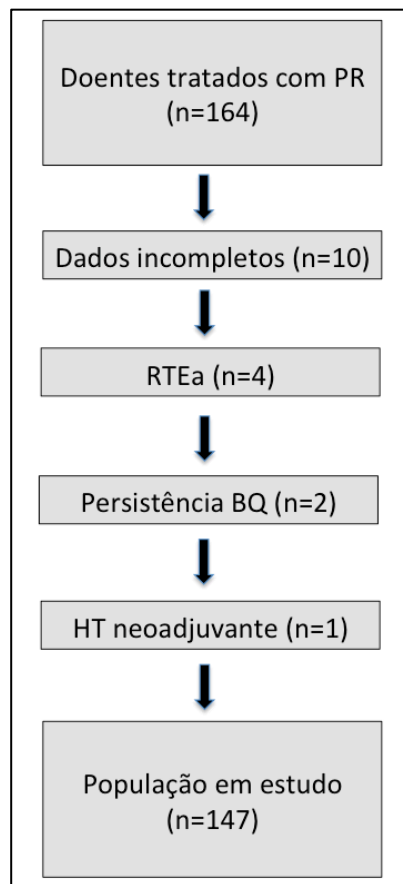


Figura 14. Seleção da população em estudo.

3.3. Colheita de dados

Os registos clínicos referentes a todos os doentes, foram consultados a partir do processo clínico eletrónico da Fundação Champalimaud.

Recolheram-se dados clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos (biópsia e peça operatória), referentes a todos os doentes. Esta recolha foi efetuada no “baseline” e em dois outros momentos distintos. Estes vários momentos de colheita de dados consubstanciam a componente retrospectiva e prospetiva do estudo. Nos doentes em que ocorreu RBQ, a data desta representa o fim do acompanhamento, no que concerne a este estudo. Nos doentes em que não ocorreu RBQ, definiu-se como data final de acompanhamento, a data da última consulta registada no diário clínico. O seguimento referente a este projeto de investigação, foi encerrado no dia 31 de Julho de 2017. O tempo de seguimento do doente foi contado em meses, a partir da

data da cirurgia, até à data da RBQ - nos doentes com RBQ – e até à data da última consulta - nos doentes sem RBQ.

Para cada doente, recolheu-lhe informação referente a:

- Idade.
- Valor de PSA pré-operatório.
- Data da biópsia.
- Data da cirurgia.
- Valores seriados de PSA obtidos durante o seguimento.
- Data em que se obteve o último valor de PSA, durante o seguimento.
- Data da última consulta.
- Data da recorrência bioquímica.
- Score de Gleason da biópsia.
- Classificação de Epstein da biópsia.
- Número de fragmentos invadidos por neoplasia na biópsia.
- Extensão máxima do envolvimento neoplásico nos fragmentos da biópsia.
- Percentagem máxima de envolvimento neoplásico nos fragmentos da biópsia.
- Invasão perineural na biópsia.
- Tipo de cirurgia efetuado.
- Subtipo histológico.
- Percentagem de subtipo intraductal.
- Score de Gleason na peça operatória.
- Classificação de Epstein na peça operatória.
- Presença de padrão terciário de Gleason 5, na peça operatória.
- Classificação de Epstein da lesão índice.
- Score de Gleason da lesão índice.
- Extensão máxima da lesão índice.
- Volume da lesão índice.
- Unifocalidade vs. multifocalidade.
- Estado da margem cirúrgica.
- Extensão da margem cirúrgica positiva.

- Extensão extraprostática na peça operatória.
- Dimensão da extensão extraprostática na peça operatória.
- Invasão perineural na peça operatória.
- Invasão vascular na peça operatória.
- Invasão das vesículas seminais na peça operatória.
- Número de gânglios linfáticos isolados em doentes submetidos a linfadenectomia.
- Número de gânglios linfáticos positivos.
- Estádio patológico “T”.
- Estádio patológico “N”.

Foram ainda recolhidos vários outros dados, nomeadamente respeitantes ao estadiamento clínico por toque rectal e por RM, que se decidiu não incluir na presente análise. Em seguida, enumeram-se algumas definições simples utilizadas na caracterização da população em estudo:

- Data da biópsia. Foi definida como a data em que foi realizada a biópsia.
- Data da cirurgia. Foi definida como a data em que foi realizada a cirurgia.
- Data de RBQ. Foi definida como a data da quantificação do PSA, em que se registou, pela primeira vez, um valor igual ou superior a 0.2 ng/mL.

3.4. Metodologia utilizada na avaliação de biomarcadores.

Nos casos incluídos neste projeto, a avaliação da expressão de biomarcadores, foi efetuada em tecido tumoral e, no caso do SChLAP1 também em tecido não neoplásico, ambos isolados a partir da peça operatória. Para a pesquisa dos vários biomarcadores utilizou-se a técnica de imunohistoquímica (IHC) e a de “Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction” (qRT-PCR).

Devido a limitações económicas e de tempo, foram selecionados 62 casos para estudo imunohistoquímico e quinze para estudo molecular. Os 62 casos selecionados para IHC, incluíram 18 casos em que ocorreu RBQ e 44 controlos. Os 15 casos selecionados para estudo molecular incluíram 7 casos com RBQ e 8 controlos.

A lista dos vários biomarcadores estudados neste projeto, pode ser consultada no quadro 10.

A IHC envolve a identificação visual de moléculas alvo, em células e tecidos, através da interação específica entre anticorpo e antigénio. O anticorpo é marcado com um gerador de sinal específico, apelidado de indicador. Este pode ser, por exemplo, um fluorocromo, uma enzima ou uma partícula metálica³⁶⁹. Apresenta vantagens relativamente a outras técnicas mais recentes de análise molecular. É menos complexa e mais barata. Ainda em relação às técnicas mais recentes, produz uma menor quantidade de informação, o que pode ser uma vantagem ou uma desvantagem. Apresenta várias outras desvantagens. A IHC, apesar de simples, requer conhecimento para ser efetuada de forma adequada. A sua interpretação requer treino, não é clara a sua concordância com outras técnicas mais recentes e a sua padronização, amiúde, não é consensual.

De modo a otimizar os recursos, para os casos selecionados para IHC, construíram-se “Tissue microarrays” (TMA). Esta técnica permite comparar muitas amostras diferentes, numa única lâmina. É uma técnica custo-efetiva, em termos de trabalho e de material corante, e que apresenta ainda a vantagem de permitir condições homogéneas de coloração. A área tumoral de interesse é identificada através de uma lâmina corada com hematoxilina-eosina. É sujeita a microdissecção e os fragmentos dos vários casos são reunidos num molde. A este molde acrescenta-se um meio consolidante. Posteriormente produzem-se cortes deste novo bloco para técnicas histopatológicas³⁷⁰.

A partir de blocos de parafina selecionados, obteve-se uma lâmina corada com hematoxilina-eosina, para cada um deles. A partir destas lâminas foi selecionada a área tumoral a analisar. Esta seleção foi efetuada por um único anatomopatologista (Professor Doutor Antonio Lopez-Beltran). Repartiram-se os 62 casos em 6 planos de matrizes, 4 com 10 casos e duas com 11 casos. Para cada caso em estudo, foram obtidas 3 amostras distintas de tecido tumoral. Em cada um dos planos das matrizes acrescentaram-se 3 a 4 casos de controlo, obtidos a partir de tecido não neoplásico e não prostático. Posteriormente à seleção da área tumoral e à realização dos planos das matrizes, as amostras de tecido foram enviadas para o laboratório da Professora Doutora Maria Raspollini (University of Florence, Division of Histology and Molecular

Diagnosics), onde se construíram os TMA. Em seguida, descreve-se sucintamente a técnica utilizada. Construíram-se 6 blocos em branco, que receberam os cilindros de tecido em estudo. Os blocos foram desbastados com micrótomo, de modo a assegurar uma superfície de corte regular. Em seguida utilizou-se um “MTA1-manual Tissue Arrayer”, para a construção das matrizes tecidulares de acordo com os 6 planos de matrizes previamente definidos. Posteriormente procedeu-se à inclusão dos blocos, de modo a permitir que os cilindros de tecido aderissem melhor ao bloco recetor.

Os seis blocos foram reenviados para o laboratório do Serviço de Anatomia Patológica da Fundação Champalimaud onde se realizou a técnica de imunohistoquímica. A partir das várias matrizes tecidulares realizaram-se cortes de 2 µm de espessura. Estes cortes foram realizados em micrótomo automático Leica® RM2255 e sujeitos à técnica de IHC no laboratório de Anatomia Patológica da Fundação Champalimaud. As técnicas de IHC, foram efetuadas com recurso aos equipamentos Ventana® Benchmark Ultra, Leica® Bond-Max e Leica® Bond-III. Estes aparelhos realizam, de modo automático, todos os passos que constituem a técnica de imunohistoquímica:

- Desparafinização.
- Reidratação.
- Recuperação antigénica.
- Bloqueio da peroxidase endógena.
- Aplicação do anticorpo primário. Na maior parte dos casos utilizaram-se anticorpos previamente diluídos, “ready to use” (quadro 10).
- Incubação.
- Visualização da reação. O sistema de deteção variou de acordo com o tipo de anticorpo utilizado (quadro 10).
- Contraste com hematoxilina.

Posteriormente, procedeu-se à lavagem, desidratação e montagem. Em termos de controlo de qualidade, em todas as lâminas foi incluída uma amostra que funcionou como controlo positivo, garantindo assim a fiabilidade do procedimento técnico.

Quadro 10. Lista dos biomarcadores estudados por IHC.

Biomarcador (Clone)	Diluição	Sistema de detecção	Fabricante
SOX2 (CSP76)	“Ready to use”	“Ultra View”	Ventana
OCT4 (NINK)	“Ready to use”	“Bond Polymer Refine Detection”	Novocastra
caderina E(Clone 36B5)	“Ready to use”	“Bond Polymer Refine Detection”	Novocastra
caderina N (IAR06)	“Ready to use”	“Bond Polymer Refine Detection”	Novocastra
Vimentina (SRL33)	“Ready to use”	“Bond Polymer Refine Detection”	Novocastra
ERG (EPR3864)	“Ready to use”	“Ultra View”	Ventana
P53 (DO7)	“Ready to use”	“Bond Polymer Refine Detection”	Novocastra
Ki67 (K2)	“Ready to use”	“Bond Polymer Refine Detection”	Novocastra
PTEN (6H2.1)	1:75	“Bond Polymer Refine Detection”	Enzo Life Sciences
PMS2 (EPR3947)	“Ready to use”	“Bond Polymer Refine Detection”	Cell Marque
MSH6 (44)	“Ready to use”	“Opti View”	Ventana
MLH1 (M1)	“Ready to use”	“Opti View”	Ventana
MSH2 (G219-1129)	“Ready to use”	“Opti View”	Cell Marque

Uma vez terminada a técnica de imunohistoquímica, as lâminas foram digitalizadas através de um digitalizador de lâminas Ultra Fast Scanner da Philips®. Foi a partir da imagem resultante deste digitalizador, que se procedeu à leitura e interpretação dos resultados.

De modo a conseguir uma familiarização aceitável com o sistema de microscopia digital e para assegurar a consistência dos resultados da leitura da IHC, realizaram-se dois treinos distintos. Um deles baseou-se na avaliação de margens cirúrgicas em vários casos de TP. Os resultados deste conjunto de treino foram confirmados e corrigidos pelo Professor Doutor Antonio Lopez-Beltran. A realização deste trabalho traduziu-se na coautoria de um artigo, que procurou estabelecer a validade da microscopia digital na avaliação das margens cirúrgicas¹⁵⁹. Um segundo conjunto de treino foi corporizado, pela avaliação de um outro TMA, distinto, constituído por 33 casos de TP e 5 controlos. Neste outro TMA, foram utilizados os mesmos

biomarcadores que neste projeto. Os resultados foram confirmados e corrigidos pelo Professor Doutor António Lopez-Beltran. Por fim, no TMA do próprio projeto, realizou-se uma escolha aleatória de 10 casos. A leitura destes, foi efetuada em separado, pelo autor deste projeto e pelo Professor Doutor António Lopez-Beltran. Os resultados foram comparados e apresentaram uma elevada concordância. Por fim, efetuou-se a leitura de todos os casos do TMA deste projeto. A leitura foi efetuada sem conhecimento das características clínicas e anatomopatológicas associadas a cada caso. Foi acompanhada, de perto, pelo Professor Doutor Antonio Lopez-Beltran.

Em relação à análise genética, importa ressaltar uma mudança que ocorreu durante a realização deste projeto de investigação. Inicialmente definiu-se como objetivo, avaliar o papel preditivo de análise mutacional. Esta acabou por não se realizar por duas razões distintas. Quando o projeto foi idealizado, havia uma possibilidade palpável de a Fundação Champalimaud vir a dispor de capacidade própria para a realização de análise genética através da tecnologia de “next generation sequencing”. Como tal considerou-se que seria exequível avaliar geneticamente alguns dos casos com RBQ e outros sem RBQ que serviriam de controlos. Infelizmente a Fundação não veio a dispor de capacidade própria e, como tal, a avaliação genética passou a ser efetuada através de prestadores externos. O valor pecuniário desta análise, impossibilitou a sua realização no âmbito deste projeto. Por outro lado, os dados que foram sendo publicados na literatura internacional, tornaram claro que os TP primários possuem uma carga mutacional relativamente baixa^{252,371}. Quando se começou a procurar alternativas, o SCHLAP1 rapidamente conseguiu um lugar de destaque. Para tal, contribuíram a consistência dos dados que suportam a sua relação com os TP (quadro 9) e, por outro lado o seu carácter inovador. Contactou-se o grupo da Sra. Professora Doutora Maria Alexandra Fernandes e do Sr. Professor Doutor Pedro Viana Baptista, da Universidade Nova de Lisboa, que aceitaram realizar a avaliação de SCHLAP1, em alguns casos da nossa amostra.

Tal como referido acima, selecionaram-se 15 casos para avaliação de SCHLAP1, 7 casos com RBQ e 8 controlos. Ao contrário da seleção efetuada para IHC, apenas constituída por tecido tumoral, a seleção de tecido para o SCHLAP1 incluiu, para

cada caso, uma amostra de tecido tumoral e uma outra amostra de tecido não tumoral. A metodologia para avaliação de SCHLAP1 implicou, numa primeira fase, a extração de ARN e a síntese de ADN complementar. Realizou-se a extração de ARN usando 5 a 10 cortes (5 µm), obtidos a partir de blocos de parafina. Estes foram previamente selecionados pelo Sr. Professor Antonio Lopez-Beltran. Os cortes foram desparafinados. O ARN foi extraído utilizando um kit “PAXgene Tissue RNA” e de acordo com as instruções do fabricante (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland). O ARN foi conservado a -80°C. O ADN complementar foi sintetizado a partir da totalidade do ARN (100 ng) utilizando um kit “NZY M-MuLV First-Strand cDNA Synthesis kit” e de acordo com as instruções do fabricante (NZYtech). Seguidamente realizou-se a técnica de “Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction” (qRT-PCR). Utilizaram-se os “primers” (SchLAP1, 5’-TGGACACAATTTCAAGTCCTCA-3’ e CATGGTGAAAGTGCCTTATACA-3’) e a sonda “Taqman” (Schlap1 Hs04421236_m1). A sua utilização seguiu as instruções do fabricante (Applied Biosystems). Incluiu uma desnaturação inicial a 95 °C, durante 20 segundos, e 40 ciclos a 95 °C, durante 30 segundos; 60 °C, durante 30 segundos e 72 °C, durante 15 segundos. Os dados da expressão foram analisados pelo método Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), utilizando ARN 18S como gene “housekeeping”. Para cada amostra, repetiu-se o procedimento três vezes e considerou-se haver um silenciamento significativo do gene quando $2^{-\Delta\Delta Ct} < 0,5$ e um valor de $p < 0,05$.

3.5. Variáveis e respetivo plano de operacionalização

Em seguida, descrevem-se as variáveis e o seu plano de operacionalização. A ordem de encadeamento das variáveis é cronológica, de acordo com a prática clínica diária. Distinguem-se variáveis que representam possíveis factores preditivos de RBQ - variáveis independentes, da variável que representa o resultado de interesse do estudo - variável dependente. A classificação do tipo de variáveis é feita de acordo com Petrie e Sabin³⁷². Interessa, mais uma vez, clarificar uma aparente confusão entre factor preditivo e prognóstico. Um factor prognóstico diz respeito a uma característica que identifica subgrupos de doentes não tratados, com diferentes “outcomes”. Um factor preditivo diz respeito a uma característica que identifica subgrupos de doentes tratados, com diferentes “outcomes”, como consequência do

tratamento³⁷³. Na maioria das situações, mas não sempre, um factor prognóstico também é um factor preditivo do efeito de tratamentos específicos. A clarificação, se um factor de prognóstico é, ou não, também um factor preditivo, pode requerer evidência gerada com recurso a estudo aleatorizado. Neste projeto assumimos a RBQ como factor preditivo em relação à PR. Por um lado, porque a ocorrência de RBQ identifica um “outcome” diferente após a PR. Por outro lado, porque a importância da RBQ enquanto factor prognóstico não é inequívoca. Nem todos os doentes com RBQ desenvolvem doença clinicamente significativa. E também porque modalidades terapêuticas de “salvação”, subsequentes à RBQ, podem ser curativas. A contextualização teórica das variáveis foi efetuada na introdução da presente tese.

3.5.1. Variáveis independentes

As variáveis independentes agrupam-se em vários conjuntos: demográfica, clínicas, anatomopatológicas e moleculares (quadro 11).

Quadro 11. Lista das variáveis independentes (continua).

Tipo	Enumeração
Demográfica	-Idade
Clínicas	-PSA pré-operatório -Intervalo entre a biópsia e a cirurgia -Tipo de cirurgia -PSA pós-operatório -Intervalo entre cirurgia e a última consulta -Intervalo entre cirurgia e RBQ
Anatomopatológicas	-Score de Gleason da biópsia -Classificação de Epstein da biópsia -Número de fragmentos invadidos por neoplasia, na biópsia -Extensão máxima do envolvimento neoplásico nos fragmentos da biópsia -Porcentagem máxima de envolvimento neoplásico nos fragmentos da biópsia -Invasão perineural na biópsia -Subtipo histológico na peça -Porcentagem de intraductal na peça -Score de Gleason da peça operatória -Classificação de Epstein da peça operatória -Presença de padrão terciário na peça operatória -Score de Gleason da lesão índice -Classificação de Epstein da lesão índice -Extensão máxima da lesão índice -Volume da lesão índice -Unifocalidade vs. multifocalidade -Estado da margem cirúrgica -Extensão da margem cirúrgica positiva -Extensão extra-prostática na peça operatória -Dimensão da extensão extra-prostática na peça operatória -Invasão perineural na peça operatória -Invasão vascular na peça operatória -Invasão das vesículas seminais na peça operatória -Número de gânglios linfáticos isolados -Número de gânglios linfáticos positivos. -Estádio patológico “T” -Estádio patológico “N”

Quadro 11. Lista das variáveis independentes (continuação).

Moleculares	<ul style="list-style-type: none"> -SOX2 -OCT4 -Caderina E -Caderina N -Vimentina -ERG -p53 -Ki67 -PTEN -PMS2 -MSH6 -MLH1 -MSH2 -Marcadores de potencial estaminal -Marcadores de TEM -Marcadores de reparação de ADN -SCHLAP1 em tecido tumoral -SCHLAP1 em tecido normal
-------------	--

3.5.1.1. Variável demográfica

A única variável demográfica considerada neste projeto foi a idade, medida em anos, à data do diagnóstico. A data do diagnóstico foi assumida como a data do resultado da biópsia. Nos doentes em que ocorreu RBQ, registou-se, também, a idade à data em que a mesma foi documentada.

3.5.1.2. Variáveis clínicas

São várias, as variáveis clínicas consideradas neste projeto. Em seguida, descrevem-se, sumariamente, cada uma delas.

PSA pré-operatório. Variável numérica contínua. Registou-se, para cada doente, o valor de PSA prévio à biópsia. Apenas em dois doentes não foi possível obter este resultado antes da biópsia e utilizou-se um resultado anterior à cirurgia. A unidade de medida foi ng/mL.

Intervalo entre a biópsia e a cirurgia. Variável numérica contínua. Quantificou-se, em semanas, o intervalo de tempo compreendido, entre a data de biópsia e a data da cirurgia.

Tipo de cirurgia. Variável dicotómica. Em todas as cirurgias registou-se se, para além da PR, se foi efetuada (1), ou não (0), linfadenectomia.

PSA pós-operatório. Variável numérica contínua. Para cada doente, registaram-se as várias quantificações do PSA, seriadas cronologicamente, após a cirurgia. Como o

procedimento de seguimento não é rígido, optou-se por registrar todos os PSA disponíveis de modo seriado e não assumindo pontos de corte temporais previamente estabelecidos. Para cada doente foi ainda considerada, a última data de quantificação do PSA. No caso dos doentes com RBQ, considerou-se que esta coincidia com a data do último PSA. A unidade de medida foi ng/mL.

Intervalo entre cirurgia e a última consulta. Variável numérica contínua. Definido como intervalo de tempo entre a data da cirurgia e a data em que foi efetuada a última consulta. Este parâmetro, foi assumido neste projeto como correspondendo ao seguimento dos doentes sem RBQ incluídos neste estudo. Esta variável foi quantificada em meses.

Intervalo entre cirurgia e RBQ. Variável numérica contínua. Definida como o intervalo de tempo, entre a data da cirurgia e a data da primeira determinação de PSA, cujo resultado foi igual ou superior a 0.2 ng/mL. Este parâmetro permite quantificar o seguimento dos doentes com RBQ. Esta variável também foi quantificada em meses.

3.5.1.3. Variáveis anatomopatológicas

As variáveis anatomopatológicas são consideradas em dois contextos distintos: na biópsia e na peça operatória. Existem algumas variáveis que são descritas em ambos os contextos, enquanto que outras são específicas de um ou de outro. Descrevem-se, inicialmente, as variáveis anatomopatológicas referentes à biópsia e em seguida as referentes à peça.

Score de Gleason da biópsia. Esta variável é numérica discreta. O SG é obtido pela soma dos dois padrões de diferenciação mais frequentes. Teoricamente varia entre 2 e 10¹¹⁴. Na maior parte dos estudos, e também, neste projeto, estabelece-se que varia entre 6 e 10. De modo a evitar repetição dos dados, com a Classificação de Epstein, não se subdividiu o score 7, em “3+4” e “4+3”.

Classificação de Epstein da biópsia. Uma das limitações do SG, diz respeito aos casos com valor “7”. Doentes com SG “3+4” têm melhor prognóstico do que os com SG “4+3”¹¹⁷. A classificação de Epstein permite ultrapassar esta limitação. É uma variável numérica discreta, definida pelos seguintes valores:

- “1” = SG menor ou igual a 6.

- "2" = SG "3 + 4".
- "3" = SG "4 + 3".
- "4" = SG "4 + 4".
- "5" = SG 9 e 10.

Número de fragmentos invadidos por neoplasia na biópsia. Variável numérica discreta. Quantifica o número de fragmentos da biópsia em que se documentou a existência de tumor.

Extensão máxima do envolvimento neoplásico nos fragmentos da biópsia. Variável numérica contínua. Quantifica-se qual o comprimento máximo, em milímetros, ocupado pelo tumor em todos os cilindros de uma biópsia.

Porcentagem máxima de envolvimento neoplásico nos fragmentos da biópsia. Variável numérica contínua. Quantifica-se, em porcentagem, a razão entre a extensão de tumor e o comprimento total do mesmo fragmento. Dos vários fragmentos da biópsia, que contêm tumor, utiliza-se o valor daquele em que esta razão é mais elevada.

Invasão perineural na biópsia. Variável dicotômica, em que se afirma (1), ou refuta (0), a existência de invasão perineural no tecido neoplásico obtido por biópsia.

Subtipo histológico na peça. Variável categórica ordinal. Define o subtipo histológico. Neste projeto reconhecem-se os seguintes subtipos: acinar(1); intraductal(3); mucinoso(5) e de pequenas células/neuroendócrino(6). A atribuição de classificação de acinar pressupõem que a totalidade do tumor é constituída por este subtipo. Por outro lado, a classificação como qualquer um dos outros subtipos, requer apenas a existência de uma qualquer porcentagem dos mesmos.

Porcentagem de intraductal na peça. Variável numérica contínua. Quantifica, em porcentagem, a quantidade do subtipo intraductal em relação à totalidade da área tumoral.

Score de Gleason da peça operatória. Variável numérica discreta. Varia entre 6 e 10. De modo a evitar repetição dos dados não se subdividiu o score 7.

Classificação de Epstein da peça operatória. Variável numérica discreta, definida pelos seguintes valores:

- "1" = SG menor ou igual a 6.
- "2" = SG "3 + 4".

- "3" = SG "4 + 3".
- "4" = SG "4 + 4".
- "5" = SG 9 e 10.

Presença de padrão terciário na peça operatória. Variável dicotômica. Reflete a existência (1), ou não (0), deste padrão.

Score de Gleason da lesão índice. Variável numérica discreta. Varia entre 6 e 10. De modo a evitar repetição dos dados não se subdividiu o score 7. A lesão índice na nossa população foi definida como o nódulo tumoral de maior dimensão e com o SG mais elevado.

Classificação de Epstein da lesão índice. Variável numérica discreta, definida pelos seguintes valores:

- "1" = SG menor ou igual a 6.
- "2" = SG "3 + 4".
- "3" = SG "4 + 3".
- "4" = SG "4 + 4".
- "5" = SG 9 e 10.

Extensão máxima da lesão índice. Variável numérica contínua. Expressa em milímetros, o maior eixo da LI.

Volume da lesão índice. Variável numérica contínua. Expressa em centímetros cúbicos.

Unifocalidade versus multifocalidade. Variável dicotômica, que identifica a natureza unifocal (0) ou multifocal (1) do tumor, na peça operatória.

Estado da margem cirúrgica. Variável dicotômica. Identifica a presença (1) ou ausência (0) de tecido tumoral na margem cirúrgica.

Extensão da margem cirúrgica positiva. Variável numérica contínua expressa em milímetros. Quantifica a extensão da margem cirúrgica positiva.

Extensão extraprostática na peça operatória. Variável dicotômica. Identifica a presença (1) ou ausência (0) de extensão extraprostática.

Dimensão da extensão extraprostática na peça operatória. Variável numérica contínua expressa em milímetros. Quantifica a dimensão da extensão extraprostática.

Invasão perineural na peça operatória. Variável dicotômica, em que se afirma (1), ou refuta (0), a existência de invasão perineural na peça.

Invasão vascular na peça operatória. Variável dicotômica, em que se afirma (1), ou refuta (0), a existência de invasão vascular na peça.

Invasão das vesículas seminais na peça operatória. Variável dicotômica, em que se afirma (1), ou refuta (0), a existência de invasão das vesículas seminais na peça.

Número de gânglios linfáticos isolados. Variável numérica discreta. Quantifica o número de gânglios isolados, nos doentes submetidos a linfadenectomia.

Número de gânglios linfáticos positivos. Variável numérica discreta. Reporta-se, apenas a doentes em que ocorreu metastização ganglionar. Nestes quantifica-se o número total de gânglios com invasão tumoral.

Estádio patológico “T”. Variável categórica ordinal definida pelas seguintes categorias:

- “1” = pT2a, pT2b e pT2c
- “2” = pT3a
- “3” = pT3b

Estádio patológico “N”. Variável categórica ordinal definida pelas seguintes categorias:

- “0” = pN0
- “1” = pN1

3.5.1.4. Variáveis moleculares

Quando um teste quantitativo ou biomarcador é utilizado para fins de diagnóstico, é necessário especificar um valor de corte acima, ou abaixo, do qual o resultado é considerado normal ou anormal. O estabelecimento dos pontos de corte representa um compromisso entre sensibilidade e especificidade. Também depende de outros factores, nomeadamente clínicos e anatomopatológicos.

Para a maioria dos biomarcadores utilizados neste estudo, estabeleceram-se pontos de corte, definidos após revisão da literatura e discussão. Estão resumidos no quadro 12. A título exemplificativo, na figura 15, podem observar-se microfotografias referentes a alguns dos biomarcadores utilizados neste projeto.

Quadro 12. Plano de operacionalização das variáveis moleculares.

Biomarcador	Pontos de corte	Localização celular	Referência
SOX2	“+” (1) = <10% “++” (2) = entre 10 e 50% “+++” (3) = > 50%	Nuclear	Ugolkov ³⁷⁴
OCT4	“+” (1) = <10% “++” (2) = entre 10 e 50% “+++” (3) = > 50%	Nuclear	Ugolkov ³⁷⁴
caderina E	Normal (0) = ≥ 70% Anormal (1) = < 70%	Membrana celular	Junior ^{222,226}
caderina N	Negativo (0) = < 5% Positivo (1) = ≥ 5%	Membrana celular	Jaggi e Liu ^{229,234}
Vimentina	Negativo (0) = 0% Positivo (1) = > 0%	Citoplasma	Zhao ³⁷⁵
ERG	Negativo (0) = ≤ 90% Positivo (1) = > 90%	Nuclear	Lokman ³⁷⁶
p53	Negativo (0) = ≤ 10% Positivo (1) = > 10%	Nuclear	Guedes ²⁵⁴
Ki67	Negativo (0) = ≤ 2% “+” (1) = entre 3 e 25 % “++” (2) = entre 26 e 50% “+++” (3) = entre 51 e 75% “++++” (4) = > 75%	Nuclear	Verma ²⁵⁹
PTEN	Positivo (0) = > 90% Negativo (1) = ≤ 90%	Citoplasma	Downes ³⁷⁷
PMS2	Positivo (0) = 100% Negativo (1) = < 100%	Nuclear	Guedes ²⁸⁰
MSH6	Positivo (0) = 100% Negativo (1) = < 100%	Nuclear	Guedes ²⁸⁰
MLH1	Positivo (0) = 100% Negativo (1) = < 100%	Nuclear	Guedes ²⁸⁰
MSH2	Positivo (0) = 100% Negativo (1) = < 100%	Nuclear	Guedes ²⁸⁰

Tal como referido acima, os dados referentes aos marcadores moleculares estudados por IHC, englobaram 62 casos. Os dados do SchLAP1 foram recolhidos em 15 casos. A escolha dos 62 casos para IHC, incluiu 18 casos em que ocorreu RBQ. Os restantes 44, sem RBQ, foram escolhidos ao acaso e funcionaram como controlos. Nos 15 casos selecionados para SchLAP1, foram selecionados 7 casos com RBQ e 8 casos escolhidos ao acaso. A escolha destes casos foi influenciada pela disponibilidade de tecido tumoral e não neoplásico. Em seguida descreve-se a operacionalização das diversas variáveis moleculares.

SOX2. Variável categórica ordinal. Dados publicados apontam para vários pontos de corte^{288,291,292,374,378}. Utilizam-se os pontos de corte definidos no trabalho de Ugolkov e colaboradores³⁷⁴:

- “+” (1) = coloração nuclear presente em menos de 10% das células.
- “++” (2) = coloração nuclear presente entre 10 e 50% das células.
- “+++” (3) = coloração nuclear presente em mais de 50% das células.

OCT4. Variável categórica ordinal. Dados publicados apontam para vários pontos de corte^{289,294,295,379}. Para este biomarcador, também se utilizaram os pontos de corte definidos no trabalho de Ugolkov e colaboradores³⁷⁴:

- “+” (1) = coloração nuclear presente em menos de 10% das células.
- “++” (2) = coloração nuclear presente entre 10 e 50% das células.
- “+++” (3) = coloração nuclear presente em mais de 50% das células.

Caderina E. Variável dicotômica. Vários trabalhos utilizam diferentes pontos de corte^{222–224,226–229,235}. Utilizam-se os dados dos grupos de Rubin e Junior^{222,226}.

Definiram-se duas categorias:

- Normal (0) = coloração, ao nível da membrana celular, em 70%, ou mais, das células.
- Anormal (1) = coloração, ao nível da membrana celular, em menos de 70% das células.

Caderina N. Variável dicotômica. Existem vários pontos de corte reportados na literatura^{225,229,232,234,235}. Definem-se duas categorias^{229,234}:

- Negativo (0) = coloração, ao nível da membrana celular, em menos de 5% das células.
- Positivo (1) = coloração, ao nível da membrana celular, em 5%, ou mais, das células.

Vimentina. Variável dicotômica. Para este biomarcador existem poucos dados disponíveis em relação à sua utilização em TP³⁷⁵. De acordo com estes autores:

- Negativo (0) = Coloração citoplasmática em nenhuma célula.
- Positivo (1) = Coloração citoplasmática em qualquer célula.

Em relação a pontos de corte, noutros tumores, existem mais dados disponíveis^{380–}

ERG. Variável dicotômica. Existem vários trabalhos que indicam pontos de corte diferentes^{376,377,386-392}. Neste estudo reproduzem-se os pontos de corte do trabalho de Lokman³⁷⁶:

- Negativo (0) = coloração nuclear em 90%, ou menos, das células.
- Positivo (1) = coloração nuclear em mais de 90% das células.

p53. Variável dicotômica. Referência a vários pontos de corte disponíveis na literatura. Utilizam-se os pontos de corte do trabalho de Guedes e colaboradores²⁵⁴:

- Negativo (0) = coloração nuclear em 10% ou menos das células.
- Positivo (1) = coloração nuclear em mais de 10% das células.

Ki67. Variável categórica ordinal. Existem várias formas, descritas na literatura, de operacionalização desta variável^{259,263,269,393-396}. Decidiu-se utilizá-la como variável categórica ordinal, considerando-se os pontos de corte do trabalho de Verma²⁵⁹:

- Negativo (0) = coloração nuclear em 2% ou menos das células.
- “+” (1) = coloração nuclear em 25 %, ou menos, das células.
- “++” (2) = coloração nuclear entre 26 e 50% das células.
- “+++” (3) = coloração nuclear entre 51 e 75% das células.
- “++++” (4) = coloração nuclear em mais de 75% das células.

PTEN. Variável dicotômica. Existem múltiplos trabalhos que avaliam a expressão deste marcador^{376,377,388,392,397-399}. Neste estudo reproduzem-se os pontos de corte do trabalho de Downes³⁷⁷:

- Positivo (0) = coloração citoplasmática em mais de 90% das células.
- Negativo (1) = coloração citoplasmática em 90%, ou menos, das células.

PMS2. Variável dicotômica. Existem vários trabalhos que sugerem diferentes formas de operacionalização desta variável^{279-283,400,401}. Usaram-se os pontos de corte referenciados no trabalho de Guedes e colaboradores²⁸⁰:

- Positivo (0) = coloração nuclear em 100% das células.
- Negativo (1) = coloração nuclear em menos de 100% das células.

MSH6. Variável dicotômica. Existem vários trabalhos que sugerem diferentes formas de operacionalização desta variável^{280,282,283,401-403}. Usaram-se os pontos de corte referenciados no trabalho de Guedes e colaboradores²⁸⁰:

- Positivo (0) = coloração nuclear em 100% das células.

- Negativo (1) = coloração nuclear em menos de 100% das células.

MLH1. Variável dicotômica. Existem vários trabalhos que sugerem diferentes formas de operacionalização desta variável^{279–283,400,401,403}. Usaram-se os pontos de corte referenciados no trabalho de Guedes e colaboradores²⁸⁰:

- Positivo (0) = coloração nuclear em 100% das células.
- Negativo (1) = coloração nuclear em menos de 100% das células.

MSH2. Variável dicotômica. Existem vários trabalhos que sugerem diferentes formas de operacionalização desta variável^{279–281,400,401,403}. Usaram-se os pontos de corte referenciados no trabalho de Guedes e colaboradores²⁸⁰:

- Positivo (0) = coloração nuclear em 100% das células.
- Negativo (1) = coloração nuclear em menos de 100% das células.

Numa tentativa de potenciar a capacidade discriminativa dos dados disponíveis, considerou-se pertinente avaliar conjuntamente vários biomarcadores, que estão associadas às mesmas características do fenótipo neoplásico.

Marcadores de potencial estaminal. Variável dicotômica. Nesta variável avaliaram-se em conjunto os dois marcadores, que estão associados a potencial estaminal (SOX2 e OCT4).

- Negativo (0) = ausência de expressão de ambos os marcadores.
- Positivo (1) = se ocorre expressão de qualquer um dos marcadores.

Marcadores de TEM. Variável dicotômica. Nesta variável avaliaram-se em conjunto os três marcadores, que estão associados a TEM (caderina E, caderina N e Vimentina).

- Negativo (0) = se ocorre expressão de caderina E e ausência de expressão de caderina N e de vimentina.
- Positivo (1) – se ocorre perda de expressão de caderina E ou expressão de caderina N ou expressão de vimentina.

Marcadores de reparação de ADN. Variável dicotômica. Nesta variável avaliaram-se em conjunto os quatro marcadores, que estão associados a reparação do ADN (PMS2, MSH6, MLH1 e MSH2).

- Negativo (0) – expressão em todos os marcadores.
- Positivo (1) – se ocorre perda de expressão de qualquer um dos marcadores.

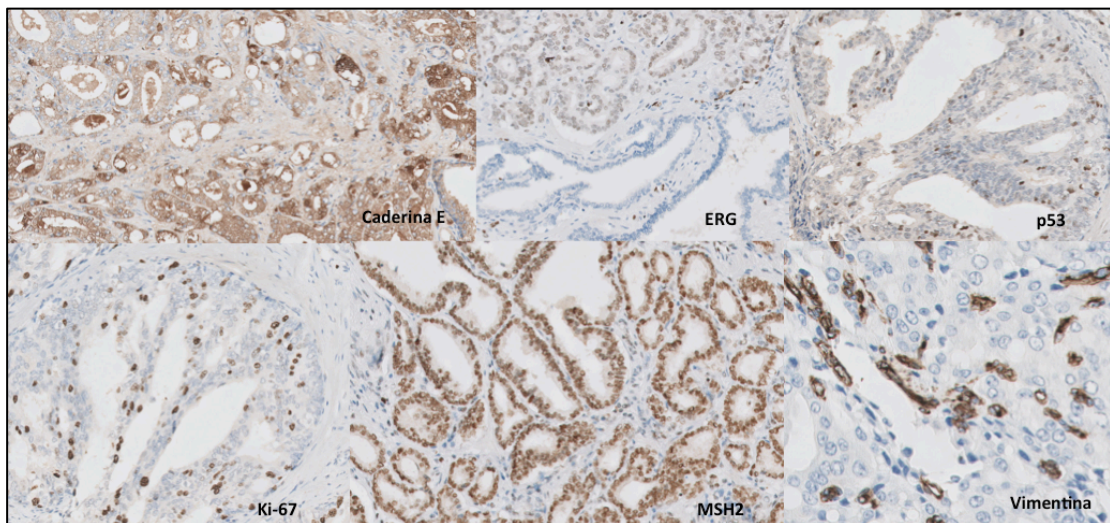


Figura 15. Microfotografias referentes a algumas das variáveis moleculares

SCHLAP1 em tecido tumoral. Variável numérica contínua.

SCHLAP1 em tecido normal. Variável numérica contínua.

3.5.2 Variável dependente

A única variável dependente do presente estudo é a RBQ. Esta representa o resultado de interesse do estudo e é definida pela ocorrência de uma quantificação de PSA com um valor maior ou igual a 0,2 ng/mL. A data em que a análise foi efetuada é assumida como a data de RBQ.

3.6. Metodologia estatística

A análise estatística associada a este projeto, dividiu-se em 3 fases. Na primeira realizou-se uma análise descritiva das variáveis acima descritas. Na segunda realizou-se uma análise univariável. Através desta procurou estabelecer-se quais as variáveis associadas ao tempo até ocorrência de RBQ candidatas ao modelo multivariável, o que corresponde à terceira fase desta análise. Todas as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$), e outras que se consideraram ter significado clínico, não obstante um p mais elevado, foram incluídas no modelo de análise multivariável.

Para a análise descritiva das diversas variáveis utilizaram-se tabelas de frequência, para as variáveis categóricas e medidas de localização (média e mediana, conforme

adequado) e de dispersão (desvio padrão e amplitude), para as variáveis quantitativas.

Foram utilizados os testes Qui-quadrado e exato de Fisher para relacionar as variáveis independentes com a RBQ. Também se utilizaram, o teste de Mann Whitney para comparar dois grupos independentes, e o teste de Wilcoxon para comparar amostras emparelhadas.

Para relacionar as diversas variáveis com o tempo até à ocorrência de RBQ, foi efetuada uma análise de sobrevivência. O estimador de Kaplan Meier foi utilizado para comparar grupos e, adicionalmente, ajustaram-se vários modelos de regressão de Cox para as análises univariáveis e multivariáveis. Através deste método de regressão é possível determinar o efeito de um dado factor no tempo até à ocorrência RBQ, ajustado para o eventual confundimento de outros factores envolvidos no processo. Para verificar a proporcionalidade das funções de risco (condição de aplicabilidade necessária à aplicação do modelo de Cox) foram utilizados os resíduos de Shoenfeld, necessários à construção da estatística de teste. Valores de p superiores a 0,050 significam que a variável em estudo verifica esta condição de aplicabilidade.

Para a análise dos dados foi considerado um nível de significância $\alpha=0,05$.

Todas as análises foram efetuadas com o programa estatístico R⁴⁰⁴. Nos modelos de regressão de Cox, foi utilizado o “package survival” do mesmo programa⁴⁰⁵.

3.7. Outros

A organização e apresentação, da presente tese, seguem as regras definidas por Serrano⁴⁰⁶.

A gestão das referências bibliográficas foi efetuada com recurso ao “Mendeley - Reference Management Software & Researcher Network”.

4. RESULTADOS

Neste capítulo apresentam-se os resultados. Inicialmente descrevem-se os resultados da análise descritiva, seguidos dos resultados da análise univariável e por fim os da análise multivariável.

4.1. Análise descritiva

Na análise descritiva apresentam-se dois conjuntos de informação. No primeiro faz-se uma descrição de todas as variáveis. No segundo descrevem-se e comparam-se os resultados de todas as variáveis independentes, em casos com e sem ocorrência de RBQ.

4.1.1. Caracterização da população e da variável demográfica

A amostra em que se baseou a realização deste projeto, foi constituída por 147 homens, todos submetidos a PR com intuito curativo. Dos 164 doentes identificados inicialmente, e que cumpriam os critérios de inclusão, 17 foram excluídos. Dez por se considerar que os dados clínicos disponíveis estavam demasiado incompletos. Quatro porque tiveram necessidade de realização de radioterapia externa adjuvante. Dois por persistência e posterior progressão bioquímica durante os primeiros 3 meses após a PR e um último, porque estava a realizar hormonoterapia neoadjuvante, à data da cirurgia. A mediana do seguimento para a totalidade da amostra foi de 20 meses, com um valor mínimo e máximo, respetivamente, de 4 e 55 meses. A mediana de seguimento nos doentes em que ocorreu RBQ foi de 9 meses, com um valor mínimo e máximo, respetivamente, de 4 e 30 meses. A média do seguimento nos doentes em que não ocorreu RBQ foi de 23,2 meses com um desvio padrão de 10,6.

A idade foi a única variável demográfica, considerada neste estudo. A idade média era de 61,38 anos. O desvio padrão era 5,6. A amplitude da variação etária foi de 45 a 74 anos.

4.1.2. Variáveis clínicas

Em seguida descrevem-se as variáveis clínicas utilizadas neste projeto. Os resultados estão resumidos no quadro 13.

Quadro 13. Análise descritiva das variáveis clínicas.

Variáveis clínicas	Categorias	Frequência absoluta / relativa (%)	Medida de localização central*	Medida de dispersão*
PSA pré-operatório			Mediana=6,42	Min/Máx:1,33/23
Intervalo entre biópsia e cirurgia			Mediana=11	Min/Máx:2/68
Tipo de cirurgia	PR PR e LFT	74 / 50.3 73 / 49.7		
PSA pós-operatório				
PSA1 (n=147)			Mediana=0,02	Min/Máx:0/1,58
PSA2 (n=139)			Mediana=0,02	Min/Máx:0/0,78
PSA3 (n=132)			Mediana=0,02	Min/Máx:0/0,28
PSA4 (n=122)			Mediana=0,02	Min/Máx:0/0,24
PSA5 (n=80)			Mediana=0,019	Min/Máx:0/0,29
PSA6 (n=35)			Mediana=0,011	Min/Máx:0,03/0,2
PSA7 (n=8)			Mediana=0,027	Min/Máx:0,03/0,11
PSA8 (n=1)			-	-
Intervalo entre cirurgia e a última consulta			Média=23,2	DP=10,6
Intervalo entre cirurgia e RBQ			Mediana=9	Min/Máx:4/30

*A escolha da medida de localização central e da medida de dispersão depende da existência ou inexistência de uma distribuição normal dos dados.

“Min/Máx” – corresponde aos valores mínimo e máximo.

“DP” – desvio padrão.

PSA pré-operatório. O PSA foi quantificado antes da biópsia em 145 doentes. Apenas em dois doentes não foi possível obter este resultado antes da realização da biópsia. Em ambos os casos, utilizou-se um resultado anterior à cirurgia mas posterior à biópsia. A mediana foi de 6,42 ng/mL, a amplitude interquartil foi de 4,62. O valor mínimo foi 1,33 e o máximo 23 ng/mL.

Intervalo entre a biópsia e a cirurgia. Para toda a população a mediana do intervalo de tempo entre a biópsia e a cirurgia foi 11 semanas. O valor mínimo e máximo foram respetivamente duas e 68 semanas.

Tipo de cirurgia. Setenta e quatro doentes (50,3%) realizaram como tratamento cirúrgico, PR sem linfadenectomia. Os restantes 73 (49,7%) realizaram PR e linfadenectomia.

PSA pós-operatório. Ao longo do seguimento dos doentes, os PSA foram quantificados de modo seriado. Todos os doentes realizaram pelo menos uma

quantificação (PSA1). Foram efetuadas duas quantificações (PSA2) em 139 doentes. Foram efetuadas 3 (PSA3) em 132 doentes. Quatro(PSA4), cinco(PSA5), seis(PSA6) e sete(PSA7) respetivamente em 122, 80, 35 e 8 doentes. O número máximo de vezes que se quantificou o PSA foi de 8, o que ocorreu num único doente. As medianas dos PSA 1 a PSA7 foram respetivamente de 0,02, 0,02, 0,02, 0,02, 0,019, 0,011, 0,027.

Intervalo entre cirurgia e a última consulta. O intervalo de tempo entre a cirurgia e a última consulta foi assumido, neste projeto, como a duração do seguimento dos doentes em que não ocorreu RBQ. A média foi 23,2 meses e o desvio padrão foi de 10,6.

Intervalo entre cirurgia e RBQ. O intervalo de tempo entre a data da cirurgia e a data da RBQ, representa o tempo até à RBQ. Foi assumido como representando, a duração do seguimento dos doentes em que ocorreu RBQ. A mediana foi de 9 meses, o valor mínimo foi de 4 meses e o máximo de 30 meses.

4.1.3. Variáveis anatomopatológicas

Em seguida descrevem-se as variáveis anatomopatológicas utilizadas neste projeto. Os resultados estão resumidos no quadro 14. Nos dados referentes a biopsias, o resultado do SG e da CE, só foram obtidos em 145 casos. Ainda na biópsia só foi possível recuperar informação referente à invasão perineural em 134 casos. Os dados referentes à peça operatória foram obtidos, para todas as variáveis, na grande maioria dos doentes. No quadro seguinte, para cada variável, descrevem-se os números de casos em relação aos quais se obteve dados. As medidas de localização central e de dispersão variam de acordo com a existência, ou não, de distribuição normal.

Quadro 14. Análise descritiva das variáveis anatomopatológicas (continua).

Variáveis anatomopatológicas	Categorias	Frequência absoluta / relativa (%)	Medida de localização central*	Medida de dispersão*
Score de Gleason (biópsia)	6	3 / 2		
	7	120 / 82,8		
	8	19 / 13,1		
	≥9	3 / 2,1		

Quadro 14. Análise descritiva das variáveis anatomopatológicas (continuação).

Classificação de Epstein (biópsia)	1 2 3 4 5	3 / 2,1 74 / 51 46 / 31,7 19 / 13,1 3 / 2,1		
Nº de fragmentos invadidos por neoplasia (biópsia)			Mediana=4	Min/Máx: 1/18
Extensão máxima do envolvimento neoplásico nos fragmento (biópsia)			Mediana=11	Min/Máx: 1/29
% máxima de envolvimento neoplásico nos fragmentos (biópsia)			Mediana=45	Min/máx: 5/100
Invasão perineural (biópsia)	0- ausente 1- presente	84 / 62,7 50 / 47,3		
Subtipo histológico (peça)	1- acinar 3- intraductal 5- mucinoso 6-neuroendó	100 / 69,4 42 / 29,1 1 / 0,7 1 / 0,7		
Percentagem de intraductal (peça)			Mediana=30	Min/Máx: 10/100
Score de Gleason (peça)	6 7 8 ≥9	19 / 13,1 118 / 80,1 9 / 6,1 1 / 0,7		
Classificação de Epstein (peça)	1 2 3 4 5	19 / 13,1 81 / 55,1 37 / 25 9 / 6,1 1 / 0,7		
Presença de padrão terciário (peça)	0- ausente 1- presente	142 / 96,6 5 / 3,4		
Score de Gleason da lesão índice	6 7 8 ≥9	0 / 0 123 / 89,8 10 / 7,3 4 / 2,9		
Classificação de Epstein da lesão índice	1 2 3 4 5	0 / 0 78 / 56,9 45 / 32,9 10 / 7,3 4 / 2,9		
Extensão máxima da lesão índice			Média=19,74	DP=7,98
Volume da lesão índice			Mediana=1,2	Min/Máx:0,15/17,2

Quadro 14. Análise descritiva das variáveis anatomopatológicas (continuação).

Unifocalidade vs. multifocalidade	0- unifocal 1- multifocal	34 / 23,1 113 / 76,9		
Estado da margem cirúrgica	0- negativa 1- positiva	117 / 79,6 30 / 20,4		
Extensão da margem cirúrgica positiva			Mediana=2	Min/Máx: 0,6/19
Extensão extra-prostática (peça)	0- ausente 1- presente	90 / 61,2 57 / 38,8		
Dimensão da extensão extra-prostática (peça)			Mediana=3	Min/Máx:0,2/26
Invasão perineural (peça)	0- ausente 1- presente	18 / 12,2 129 / 87,8		
Invasão vascular (peça)	0- ausente 1- presente	140 / 95,2 7 / 4,8		
Invasão vesículas seminais (peça)	0- ausente 1- presente	132 / 89,8 15 / 10,2		
Número de gânglios linfáticos isolados			Mediana=17	Min/Máx:2/41
Número de gânglios linfáticos positivos.			Mediana=1	Min/Máx:1/16
Estádio patológico "T"	1- pT2 2- pT3a 3- pT3b	86 / 57,8 46 / 32 15 / 10,2		
Estádio patológico "N"	0- pN0 1- pN1	65 / 89 8 / 11		

*A escolha da medida de localização central e da medida de dispersão depende da existência ou inexistência de uma distribuição normal dos dados.

"Min/Máx" – corresponde aos valores mínimo e máximo.

"DP" – desvio padrão.

Score de Gleason da biópsia. O score de Gleason da biópsia variou entre 6 e 9. Na maioria dos casos, 82,8% o score de Gleason foi 7. Para evitar repetição dos dados com a classificação de Epstein, não se subdividiu os dados referentes aos casos com este score de Gleason.

Classificação de Epstein da biópsia. A classificação de Epstein varia entre 1 e 5. A frequência absoluta nos grupos 1 a 5, foi respetivamente 3, 74, 46, 19 e 3 casos.

Número de fragmentos invadidos por neoplasia, na biópsia. A mediana do número de fragmentos envolvidos por tumor nas biopsias, foi de 4. O valor mínimo e máximo foram respetivamente 1 e 18.

Extensão máxima do envolvimento neoplásico nos fragmentos da biópsia. A mediana da extensão máxima de envolvimento tumoral dos fragmentos obtidos na biópsia foi de 11 mm. O valor mínimo e máximo foram respetivamente 1 e 29 mm.

Percentagem máxima de envolvimento neoplásico nos fragmentos da biópsia. A percentagem de envolvimento tumoral dos fragmentos da biópsia variou entre 5 e 100%. A mediana foi de 45%.

Invasão perineural na biópsia. A invasão perineural, na biópsia, foi documentada em 47,3% dos casos.

Subtipo histológico na peça. A maioria dos tumores (n=100) eram exclusivamente acinares. Em 41 casos adicionais, o subtipo acinar combinou-se com áreas variáveis de diferenciação intraductal (entre 10 e 80%). Num outro caso, a neoplasia apresentava diferenciação exclusivamente intraductal. Documentou-se, ainda 1 caso de carcinoma mucinoso e 1 caso com áreas de diferenciação neuroendócrina.

Percentagem de intraductal na peça. Nos 42 casos em que se documentou diferenciação intraductal, esta variou entre 10 e 100%. Este último ocorreu num único caso. A mediana foi de 30%.

Score de Gleason da peça operatória. O SG foi 7, na maioria dos casos (80,1%), à semelhança do registado na biópsia. Em toda a amostra o SG variou entre 6 e 9.

Classificação de Epstein da peça operatória. A frequência absoluta nos grupos 1 a 5, foi respetivamente 19, 81, 37, 9 e 1 casos.

Presença de padrão terciário na peça operatória. Esta foi documentada em 5 casos (3,4%).

Score de Gleason da lesão índice. Também este parâmetro apresentou como resultado mais frequente o SG de 7. Este ocorreu em 83% dos casos. Não se registaram casos com SG de 10.

Classificação de Epstein da lesão índice. A frequência absoluta nos grupos 1 a 5, foi respetivamente 9, 74, 48, 12 e 4 casos.

Extensão máxima da lesão índice. A média, dos valores da maior dimensão da LI, foi 19,74mm. O desvio padrão foi 7,98.

Volume da lesão índice. A mediana dos volumes da LI foi 1,2 cc³. O valor mínimo e máximo foram respetivamente 0,15 e 17,2 cc³.

Unifocalidade vs. multifocalidade. Na maioria dos casos (76,9%) a doença era multifocal.

Estado da margem cirúrgica. A margem cirúrgica foi positiva em 30 casos (20,4%).

Extensão da margem cirúrgica positiva. A mediana da extensão da margem cirúrgica foi de 2 mm, nos 29 casos em que a margem foi positiva. O valor mínimo e máximo foram respetivamente 0,6 e 19 mm.

Extensão extraprostática na peça operatória. Registou-se a existência de extensão extraprostática em 57 (38,8%) dos casos.

Dimensão da extensão extraprostática na peça operatória. Nos 57 doentes em que ocorreu extensão extraprostática, a mediana da sua dimensão foi 3 mm. O valor mínimo e máximo foram respetivamente 0,2 e 26 mm.

Invasão perineural na peça operatória. A invasão perineural ocorreu em 129 (87,8%) casos.

Invasão vascular na peça operatória. A invasão vascular foi documentada em 7 (4,8%) casos.

Invasão das vesículas seminais na peça operatória. A invasão das vesículas seminais ocorreu em 15 (10,2%) casos.

Número de gânglios linfáticos isolados. Foram isolados gânglios linfáticos, na totalidade dos 73 doentes submetidos a linfadenectomia. A mediana do número de gânglios isolados foi de 17. O valor mínimo e máximo foram respetivamente de 2 e 41.

Número de gânglios linfáticos positivos. Registaram-se 8 casos de disseminação ganglionar, entre os 73 doentes submetidos a linfadenectomia, A mediana do número de gânglios isolados, nestes 8 doentes, foi de 1. O valor mínimo e máximo foram respetivamente 1 e 16.

Estádio patológico "T". Na maioria dos casos a doença encontrava-se confinada à próstata (57,8%). A distribuição dos casos de doença confinada à próstata foi a seguinte: pT2a 7 (4,8%) casos, pT2b 9 (6,1%) casos e pT2c 69 (46,9%) casos. O estágio pT3a e o pT3b, estavam presentes, respetivamente, em 32% e 10,2% dos casos.

Estádio patológico “N”. Os dados referentes ao pN só foram obtidos nos 73 doentes submetidos a linfadenectomia. Em 8 casos (11%) registou-se a existência de metastização ganglionar.

4.1.4. Variáveis moleculares

Em seguida descrevem-se as variáveis moleculares utilizadas neste projeto. Os resultados estão resumidos no quadro 15 e ilustrados, de modo pontual, na figura 15. Os dados referentes aos marcadores moleculares obtidos por IHC, dizem respeito a 62 casos. Os dados do SChLAP1 foram recolhidos em 15 casos. As medidas de localização central e de dispersão variam de acordo com o facto de se ter apurado, ou não, a existência de distribuição normal dos dados.

Quadro 15. Análise descritiva das variáveis moleculares (continua).

Variáveis moleculares	Categorias	Frequência absoluta / relativa (%)	Medida de localização central*	Medida de dispersão*
SOX2	1 - <10% 2 - 10 e 50% 3 - > 50%	61 / 98,4 1 / 1,6 0 / 0		
OCT4	1 - <10% 2 - 10 e 50% 3 - > 50%	61 / 98,4 1 / 1,6 0 / 0		
Caderina E	0 - ≥ 70% 1 - < 70%	55 / 89 7 / 11		
Caderina N	0 - < 5% 1 - ≥ 5%	62 / 100 0 / 0		
Vimentina	0 - 0% 1 - > 0%	37 / 59,6 25 / 40,4		
ERG	0 - ≤ 90% 1 - > 90%	42 / 67,7 20 / 32,3		
p53	0 - ≤ 10% 1 - > 10%	45 / 72,5 17 / 27,5		
Ki67	0 - ≤ 2% 1 - 3 a 25 % 2 - 26 a 50% 3 - 51 a 75% 4 - ≥ 76%	31 / 50 25 / 40,4 6 / 9,6 0 / 0 0 / 0		
PTEN	0 - > 90% 1 - ≤ 90%	44 / 70,9 18 / 29,1		
PMS2	0 - 100% 1 - < 100%	57 / 91,9 5 / 8,1		
MSH6	0 - 100% 1 - < 100%	57 / 91,9 5 / 8,1		
MLH1	0 - 100% 1 - < 100%	58 / 93,5 4 / 6,5		

Quadro 15. Análise descritiva das variáveis moleculares (continuação).

MSH2	0 - 100% 1 - < 100%	61 / 98,4 1 / 1,6		
Marcadores de potencial estaminal	0 1	60 / 96,8 2 / 3,2		
Marcadores de TEM	0 1	39 / 62,9 23 / 37,1		
Marcadores de reparação de ADN	0 1	50 / 80,6 12 / 19,4		
SCHLAP1 em tecido tumoral			Mediana=2,19	Min/Máx: 0,35/7,91
SCHLAP1 em tecido normal			Mediana=0,57	Min/Máx:0/4,28

*A escolha da medida de localização central e da medida de dispersão depende da existência ou inexistência de uma distribuição normal dos dados.

“Min/Máx” – corresponde aos valores mínimo e máximo.

“DP” – desvio padrão.

Em relação ao **SOX2** e ao **OCT 4**, os resultados foram sobreponíveis. Na esmagadora maioria dos casos (98.4%), não ocorreu expressão destes marcadores no tecido tumoral. No que concerne ao SOX2, registou-se coloração nalgumas células do epitélio prostático normal. No OCT4 a coloração ao nível do epitélio normal era menos frequente do que a do SOX2.

Registou-se perda de expressão de **caderina E** em 7 casos (11%). Há ainda a referir uma notória heterogeneidade de intensidade de coloração entre os vários casos que constituíram as várias matrizes do TMA. O resultado da **caderina N** foi negativo na totalidade dos casos. Não se registaram casos de sobreexpressão deste marcador. Dado o resultado, resolveu-se, noutros cortes dos mesmos TMA, repetir o procedimento imunohistoquímico. A leitura, desta repetição, foi efetuada pelo Professor Doutor António Lopez-Beltran. O resultado foi o mesmo, ou seja ,nenhum dos casos apresentou sobreexpressão de caderina N. Ocorreu expressão de **vimentina** em 25 casos.

O resultado do **ERG** foi positivo em cerca de um terço dos casos (32,3%). O resultado do **p53** foi positivo em 17 casos (27,5%). A variável **Ki67** foi operacionalizada em várias categorias. Em metade dos casos, não se registou expressão deste biomarcador. Em 25 casos (40,4%), a expressão nuclear deste marcador ocorreu em

menos de 25% das células tumorais. Em cerca de 10% dos casos a expressão foi detetada em 25 a 50% das células tumorais. Em nenhum dos casos se documentou uma expressão de Ki67 superior a 50%. A perda de expressão do **PTEN** ocorreu em 18 casos (29,1%). Era muito evidente a expressão de PTEN no tecido não neoplásico. A expressão de **PMS2**, **MSH6**, **MLH1** e **MSH2** estava conservada na esmagadora maioria dos casos. A perda de expressão destes marcadores ocorreu respetivamente em 5 (8,1%), 5 (8,1%), 4 (6,5%) e 1 (1,6%) dos casos.

Quando considerados em conjunto os **marcadores de potencial estaminal**, foram positivos em apenas dois casos. Um para SOX2 e outro para OCT4. Os **marcadores de TEM** foram positivos em 23 casos (37,1%). Os **marcadores associados a reparação do ADN**, foram positivos em 12 casos (19,4%). Não foi possível recuperar informação acerca dos antecedentes familiares da maioria destes casos.

A quantificação de SCHLAP1 em tecido tumoral e em tecido normal apresentou resultados significativamente diferentes ($p=0,01$). A mediana em tecido tumoral foi 2,19 e em tecido normal foi 0,57.

4.1.5. Variável dependente - recorrência bioquímica

A recorrência bioquímica ocorreu em 23 casos, o que representa 15.6%. A mediana de tempo até à ocorrência de RBQ, foi de 9 meses. O valor mínimo foi 4 meses e o máximo 30 meses. Ver quadro 12.

Quadro 16. Análise descritiva da variável dependente.

Variável dependente	Categorias	Frequência absoluta / relativa (%)	Medida de localização central*	Medida de dispersão*
Recorrência bioquímica	0 - ausente	124/84,4		
	1 - presente	23/15,6		
Tempo até RBQ			Mediana=9	Min/Máx:4/30

*A escolha da medida de localização central e da medida de dispersão depende da existência ou inexistência de uma distribuição normal dos dados.

“Min/Máx” – corresponde aos valores mínimo e máximo.

O gráfico seguinte mostra-nos a estimativa ao longo do tempo, sob a forma de curva, da função de sobrevivência, referente à ocorrência de RBQ, obtida através do

estimador de Kaplan-Meier (figura 16). A função de sobrevivência, não atinge valor de 0,5, como tal não é possível obter a mediana do tempo de sobrevivência livre de recorrência bioquímica.

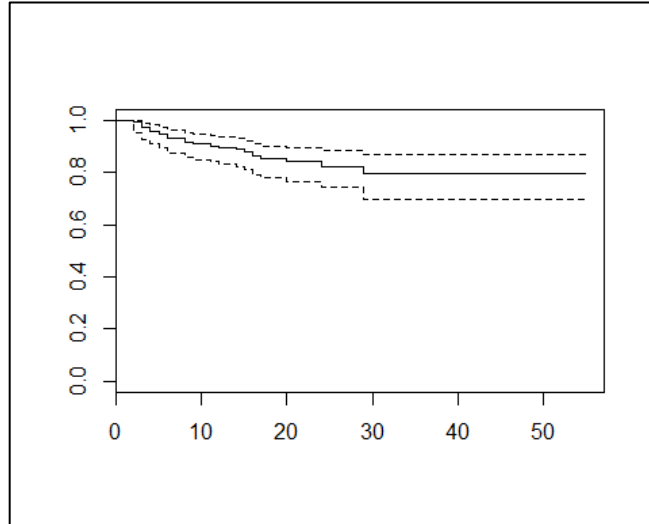


Figura 16. Estimativa da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier referente à ocorrência de RBQ e intervalos de confiança de 95% (curvas a tracejado).

4.1.6. Análise descritiva comparativa de casos com e sem recorrência bioquímica

Em seguida, maioritariamente sob a forma de tabelas descrevem-se o resultado das diversas variáveis independentes, em doentes com e sem RBQ.

Foram utilizados os testes de Qui-Quadrado e exato de Fisher para relacionar as variáveis independentes com a RBQ, e o teste de Mann Whitney para comparar dois grupos independentes.

4.1.6.1. Variáveis demográfica e clínicas

Em seguida descrevem-se os resultados das variáveis demográfica e clínicas, em doentes com e sem RBQ. Ver quadro 17. Para as variáveis numéricas utilizam-se as medidas de localização central e de dispersão, descritas acima. Para as variáveis categóricas utilizam-se valores absolutos e relativos, para cada categoria.

Quadro 17. Resultados das variáveis demográfica e clínica em doentes com e sem RBQ.

Variáveis demográfica e clínicas	Categorias	Resultado		p
		Sem RBQ*	Com RB*	
Idade		61,5(DP=5.6)	60,8(DP=5.7)	0,501
PSA pré-operatório		6.14 (1,3-23)**	8.1(4,1-22,8)**	0,013
Intervalo entre a biópsia e a cirurgia		11(2-68)**	10(4-64)**	0,690
Tipo de cirurgia	PR (n=74) PR e LFT (n=73)	69 (93,2%) 55 (75,3%)	5 (6,7%) 18 (24,7%)	0,002

*A escolha da medida de localização central e da medida de dispersão depende da existência ou inexistência de uma distribuição normal dos dados.

** Valor mínimo e máximo

4.1.6.2. Variáveis anatomopatológicas

Em seguida descrevem-se os resultados das variáveis anatomopatológicas, na biópsia e na peça operatória, em doentes com e sem RBQ (quadro 18). Para as variáveis numéricas utilizam-se as medidas de localização central e de dispersão, descritas acima. Para as variáveis categóricas utilizam-se valores absolutos e relativos, para cada categoria.

Quadro 18. Resultados das variáveis anatomopatológicas em doentes com e sem RBQ (continua).

Variáveis anatomopatológicas	Categorias	Resultado		p
		Sem RBQ*	Com RB*	
Score de Gleason (biópsia)	"6"- (n=3) "7"- (n=120) "8"- (n=19) "≥9"- (n=3)	2 (66,7%) 107 (89,2%) 12 (63,1%) 1 (33,3%)	1 (33,3%) 13 (10,8%) 7 (36,9%) 2 (66,7%)	0,001
Classificação de Epstein (biópsia)	"1"- (n=3) "2"- (n=74) "3"- (n=46) "4"- (n=19) "5"- (n=3)	2(66,7%) 71(95,9%) 36(78,2%) 12(63,1%) 1(33,3%)	1(33,3%) 3(4,1%) 10(21,8%) 7(36,8%) 2(66,7%)	< 0,001
Nº de fragmentos invadidos por neoplasia (biópsia)		4 (1-18)**	5 (1-18)**	0,062
Extensão máxima do envolvimento neoplásico nos fragmento (biópsia)		10 (1-28)**	14 (4-29)**	0,023
% máxima de envolvimento neoplásico nos fragmentos (biópsia)		40 (5-100)**	60 (10-90)**	0,023
Invasão perineural (biópsia)	0-ausente (n=84) 1-presente (n=50)	74 (88%) 41 (82%)	10 (12%) 9 (18%)	0,320

Quadro 18. Resultados das variáveis anatomopatológicas em doentes com e sem RBQ (continuação).

Subtipo histológico (peça)	1-acinar (n=100) 3-intraductal(n=42) 5-mucinoso (n=1) 6-neuroendo (n=1)	89(89%) 30(71,5%) - ¹ - ¹	11(11%) 12(28,5%) - -	0,010
Porcentagem de intraductal (peça)		20 (10-100)**	35 (20-80)**	0,009
Score de Gleason (peça)	"6"- (n=19) "7"- (n=118) "8"- (n=9) "≥9"- (n=1)	18 (94,8%) 100 (84,8%) 6 (66,7%) - ²	1 (5,2%) 18 (15,2%) 3 (33,3%) -	0,140
Classificação de Epstein (peça)	"1"- (n=19) "2"- (n=81) "3"- (n=37) "4"- (n=9) "5"- (n=1)	18 (94,8%) 75 (92,6%) 25 (67,6%) 6 (66,7%) - ³	1 (5,2%) 6 (7,4%) 12 (32,4%) 3 (33,3%) -	0,001
Presença de padrão terciário (peça)	0 - ausente(n=142) 1 - presente (n=5)	123 (86,6%) 1 (20%)	19 (13,4%) 4 (80%)	0,002
Score de Gleason da lesão índice	"6"- (n=0) "7"- (n=123) "8"- (n=10) "≥9"- (n=4)	- 109 (88,6%) 6 (60%) 0 (0%)	- 14 (11,4%) 4 (40%) 4 (100%)	<0,001
Classificação de Epstein da lesão índice	"1"- (n=0) "2"- (n=78) "3"- (n=45) "4"- (n=10) "5"- (n=4)	- 73 (93,6%) 36 (80%) 6 (60%) 0 (0%)	- 5 (6,4%) 9 (20%) 4 (40%) 4 (100%)	<0,001
Extensão máxima da lesão índice		18,86 (DP=7,6)	24,38 (DP=8,5)	0,006
Volume da lesão índice		1,2 (0,15-17,2)**	1,3 (0,35-11)**	0,170
Unifocalidade vs. multifocalidade	0-unifocal (n=34) 1-multifocal (n=113)	27 (79,4%) 97 (85,8%)	7 (20,6%) 16 (14,2%)	0,420
Estado da margem cirúrgica	0-negativa (n=117) 1- positiva (n=30)	102 (87,2%) 22 (73,4%)	15 (18,8%) 8 (26,6%)	0,080
Extensão da margem cirúrgica positiva		1 (0,9-19)**	4 (0,6-11)**	0,270
Extensão extra-prostática (peça)	0- ausente (n=90) 1- presente (n=57)	81 (90%) 43 (75,4%)	9 (10%) 14 (24,6%)	0,020
Dimensão da extensão extra-prostática (peça)		2 (0,2-24)**	5 (2-26)**	0,024
Invasão perineural (peça)	0- ausente (n=18) 1- presente (n=129)	18 (100%) 106 (82,2%)	0 (0%) 23 (17,8%)	0,070
Invasão vascular (peça)	0- ausente (n=140) 1- presente (n=7)	121 (86,5%) 3 (42,8%)	19 (13,5%) 4 (57,2%)	0,010
Invasão vesículas seminais (peça)	0- ausente (n=132) 1- presente (n=15)	115 (87,1%) 9 (60%)	17 (12,9%) 6 (40%)	0,010
Número de gânglios linfáticos isolados		15.5 (2-36)**	23 (4-41)**	0,042
Número de gânglios linfáticos positivos.		1 (1-1)**	1 (1-16)**	0,070
Estádio patológico "T"	1- pT2 (n=86) 2- pT3a (n=46) 3- pT3b (n=15)	78 (90,7%) 37 (80,4%) 9 (60%)	8 (9,3%) 9 (19,6%) 6 (40%)	0,007

Quadro 18. Resultados das variáveis anatomopatológicas em doentes com e sem RBQ (continuação).

Estádio patológico "N"	0- pN0 (n=65)	51 (78,5%)	14 (21,5%)	0.310
	1- pN1 (n=8)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	

¹ Por constrangimentos estatísticos, decorrentes da dimensão mínima das categorias "3-mucinoso" e "5-neuroendócrino", estas foram retiradas da análise.

² Por constrangimentos estatísticos, decorrentes da dimensão mínima da categoria "≥9", esta foi retirada da análise.

³ Por constrangimentos estatísticos, decorrentes da dimensão mínima da categoria "5", esta foi retirada da análise.

*A escolha da medida de localização central e da medida de dispersão depende da existência ou inexistência de uma distribuição normal dos dados.

** Valor mínimo e máximo

4.1.6.3. Variáveis moleculares

Em seguida descrevem-se os resultados das variáveis moleculares, em doentes com e sem RBQ (quadro 19). Para as variáveis numéricas utilizam-se as medidas de localização central e de dispersão, descritas acima. Para as variáveis categóricas utilizam-se valores absolutos e relativos, para cada categoria.

Quadro 19. Resultados das variáveis moleculares em doentes com e sem RBQ (continua).

Variáveis anatomopatológicas	Categorias	Resultado		p
		Sem RBQ*	Com RBQ*	
SOX2	1 - <10% (n=61)	43 (70,5%)	18 (29,5%)	1
	2-10 e 50% (n=1)	1 (100%)	0 (0%)	
	3 - > 50% (n=0)	-	-	
OCT4	1 - <10% (n=61)	43 (70,5%)	18 (29,5%)	1
	2-10 e 50% (n=1)	1 (100%)	0 (0%)	
	3 - > 50% (n=0)	-	-	
caderina E	0 - ≥ 70% (n=55)	43 (78,2%)	12 (21,8%)	0,020
	1 - < 70% (n=7)	1 (14,2%)	6 (85,8%)	
caderina N	0 - < 5% (n=62)	44 (71%)	18 (29%)	-
	1 - ≥ 5% (n=0)	-	-	
Vimentina	0 - 0% (n=37)	24 (64,8%)	13 (35,2%)	0,190
	1 - > 0% (n=25)	20 (80%)	5 (20%)	
ERG	0 - ≤ 90% (n=42)	29 (69%)	13 (31%)	0,620
	1 - > 90% (n=20)	15 (75%)	5 (25%)	
p53	0 - ≤ 10% (n=45)	32 (71%)	13 (29%)	0,900
	1 - > 10% (n=17)	12 (70,5%)	5 (29,5%)	
Ki67	0 - ≤ 2% (n=31)	24 (77,5%)	7 (22,5%)	0,260
	1-3 a 25% (n=25)	17 (68%)	8 (32%)	
	2-26 a 50% (n=6)	3 (50%)	3 (50%)	
	3-51 a 75% (n=0)	-	-	
	4 - ≥ 76% (n=0)	-	-	
PTEN	0 - > 90% (n=44)	30 (68,2%)	14 (31,2%)	0,440
	1 - ≤ 90% (n=18)	14 (77,8%)	4 (22,2%)	
PMS2	0 - 100% (n=57)	41 (71,9%)	16 (28,1%)	0,570
	1 - < 100% (n=5)	3 (60%)	2 (40%)	
MSH6	0 - 100% (n=57)	40 (70,2%)	17 (29,8%)	0,640
	1 - < 100% (n=5)	4 (80%)	1 (20%)	

Quadro 19. Resultados das variáveis moleculares em doentes com e sem RBQ (continuação).

MLH1	0 - 100% (n=58) 1 - < 100% (n=4)	41 (70,7%) 3 (75%)	17 (29,3%) 1 (25%)	0,850
MSH2	0 - 100% (n=61) 1 - < 100% (n=1)	43 (70,5%) 1 (100%)	18 (29,5%) 0 (0%)	0,710
Marcadores de potencial estaminal	0 (n=60) 1 (n=2)	42 (70%) 2 (100%)	18 (30%) 0 (0%)	1
Marcadores de TEM	0 (n=39) 1 (n=23)	27 (69,2%) 17 (73,9%)	12 (30,8%) 6 (27,1%)	0,690
Marcadores de reparação de ADN	0 (n=50) 1 (n=12)	35 (70%) 9 (75%)	15 (30%) 3 (25%)	1
SCHLAP1 em tecido tumoral		2,18 (0,35-7,91)**	2,46 (0,96-4,67)**	0,700
SCHLAP1 em tecido normal		0,57 (0-2,88)**	0,73 (0-4,28)**	0,600

*A escolha da medida de localização central e da medida de dispersão depende da existência ou inexistência de uma distribuição normal dos dados.

** Valor mínimo e máximo

4.2. Análise univariável

Em seguida descrevem-se os resultados da análise das diversas variáveis independentes face à ocorrência ou não de RBQ. Utilizar-se-ão estimativas das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e modelos de regressão de Cox. Manter-se-á a mesma ordem de avaliação para os vários grupos de variáveis. No início do capítulo seguinte apresentar-se-á uma lista das variáveis, que serão integradas no modelo de análise multivariável.

4.2.1. Variáveis demográfica e clínicas

No quadro seguinte resume-se os resultados dos modelos de regressão de Cox, univariáveis, para as variáveis demográfica e clínicas (Quadro 20).

Quadro 20. Resultado de modelos de regressão de Cox referente às variáveis demográfica e clínicas.

Variáveis demográfica e clínicas	Categorias	Estimativa HR (Hazard Ratio)	IC (95%)*	p ***
Idade		0,977	(0,909; 1,051)	0,530
PSA pré-operatório		1,082	(1,012; 1,157)	0,021
Intervalo entre biópsia e cirurgia		0,995	(0,952; 1,040)	0,839
Tipo de cirurgia	PR** (n=74) PR e LFT (n=73)	3,465	(1,281; 9,377)	0,014

* IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR.

** Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

*** Teste de Wald.

De acordo com os dados da nossa amostra, a variável **idade** não parece ter influência enquanto factor preditivo de ocorrência de RBQ ($p=0,530$).

Em relação ao valor de **PSA pré-operatório**, existe evidência, estatisticamente significativa ($p=0,021$), de relação entre este e o tempo até RBQ. Por cada aumento de um ng/mL, existe um aumento de cerca de 8,2% do risco estimado de ocorrência de RBQ ($HR=1,082$).

Não existe relação estatisticamente significativa ($p=0,839$) entre a duração do **intervalo entre biópsia e cirurgia** e o tempo até à recorrência bioquímica. Aliás o HR (0,995), parece sugerir que uma maior duração deste intervalo aparenta diminuir o risco de ocorrência de RBQ, embora somente em 0,5%.

Regista-se uma relação estatisticamente significativa ($p=0,014$), entre o **tipo de cirurgia** realizado e o tempo até ocorrência de RBQ. Em relação à PR, a PR combinada com LFT está associada a um aumento de risco, em cerca de 3.5 vezes, de ocorrência de RBQ. Este resultado, também, é traduzido pelas curvas de sobrevivência, obtidas pelo estimador de Kaplan-Meier (figura 17).

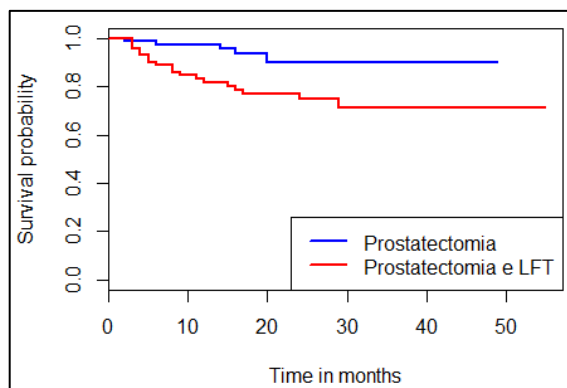


Figura 17. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos doentes submetidos a PR vs. PR e LFT.

4.2.2. Variáveis anatomopatológicas

No quadro seguinte resume-se os resultados dos modelos de regressão de Cox, univariáveis, para as variáveis anatomopatológicas (quadro 21).

Quadro 21. Resultado de modelos de regressão de Cox referente às variáveis anatomopatológicas (continua).

Variáveis anatomopatológicas	Categorias	Estimativa HR (IC 95%*)	Valor p	p***
Score de Gleason (biópsia)	"6"- (n=3)	2,671 (0,349; 20,443)	0,343	0,004
	"7"- (n=120)**	-	-	
	"8"- (n=19)	3,498 (1,393; 8,783)	0,007	
	"≥9"- (n=3)	9,491 (2,120; 42,494)	0,003	
Classificação de Epstein (biópsia)	"1"- (n=3)	- ¹	-	0,005
	"2"- (n=74)**	-	-	
	"3"- (n=46)	5,251 (1,444; 19,090)	0,012	
	"4"- (n=19)	9,248 (2,386; 35,850)	0,001	
	"5"- (n=3)	- ¹	-	
Nº de fragmentos invadidos por neoplasia (biópsia)	-	1,101 (1,001; 1,211)	0,047	0,050
Extensão máxima do envolvimento neoplásico nos fragmento (biópsia)	-	1,084 (1,016; 1,156)	0,015	0,015
% máxima de envolvimento neoplásico nos fragmentos (biópsia)	-	1,022 (1,004; 1,040)	0,016	0,020
Invasão perineural (biópsia)	0–ausente (n=84)** 1-presente (n=50)	1,563 (0,635; 3,850)	0,331	0,300
Subtipo histológico (peça)	1- acinar (n=100)**	-	-	0,003
	3- intraductal (n=42)	3,48 (1,516; 7,990)	0,003	
	5-mucinoso (n=1)	- ²	-	
	6-neuroendocino (n=1)	- ²	-	
Percentagem de intraductal (peça)	-	1,019 (0,999; 1,040)	0,066	0,070
Score de Gleason (peça)	"6"- (n=19)**	-	-	0,200
	"7"- (n=118)	3,490 (0,465; 26,220)	0,224	
	"8"- (n=9)	7,114 (0,734; 68,500)	0,089	
	"≥9"- (n=1)	- ³	-	
Classificação de Epstein (peça)	"1"- (n=19)**	-	-	0,006
	"2"- (n=81)	1,646 (0,198; 13,720)	0,645	
	"3"- (n=37)	7,704 (1,000; 59,320)	0,049	
	"4"- (n=9)	7,163 (0,744; 68,950)	0,088	
	"5"- (n=1)	- ⁴	-	
Presença de padrão terciário (peça)	0-ausente (n=142)** 1- presente (n=5)	9,014 (2,974; 27,320)	<0,001	<0,001
Score de Gleason da lesão índice	"6"- (n=0)	-	-	<0,001
	"7"- (n=123)**	-	-	
	"8"- (n=10)	3,440 (1,114; 10,620)	0,032	
	"≥9"- (n=4)	27,113 (7,881; 93,270)	<0,001	
Classificação de Epstein da lesão índice	"1"- (n=0)	-	-	<0,001
	"2"- (n=78)**	-	-	
	"3"- (n=45)	3,040 (1,018; 9,079)	0,046	
	"4"- (n=10)	6,053 (1,603; 22,847)	0,007	
	"5"- (n=4)	47,117 (11,431; 194,215)	<0,001	
Extensão máxima da lesão índice	-	1,068 (1,020; 1,119)	0,005	0,005
Volume da lesão índice	-	1,078 (0,945; 1,230)	0,263	0,300
Unifocalidade vs. multifocalidade	0– unifocal (n=34)** 1-multifocal (n=113)	0,562 (0,231; 1,367)	0,204	0,200

Quadro 21. Resultado de modelos de regressão de Cox referente às variáveis anatomopatológicas (continuação).

Estado da margem cirúrgica	0-negativa (n=117)** 1- positiva (n=30)	2,363 (1,001; 5,576)	0,049	0,050
Extensão da margem cirúrgica positiva	-	1,062 (0,928; 1,216)	0,381	0,400
Extensão extra-prostática (peça)	0- ausente (n=90)** 1- presente (n=57)	2,649 (1,146; 6,125)	0,023	0,020
Dimensão da extensão extra-prostática (peça)	-	1,075 (0,996; 1,160)	0,062	0,060
Invasão perineural (peça)	0- ausente (n=18)** 1- presente (n=129)	⁵	-	-
Invasão vascular (peça)	0- ausente (n=140)** 1- presente (n=7)	5,702 (1,933; 16,820)	0,002	0,002
Invasão vesículas seminais (peça)	0- ausente (n=132)** 1- presente (n=15)	3,388 (1,335; 8,597)	0,01	0,010
Número de gânglios linfáticos isolados	-	1,062 (1,013; 1,114)	0,01	0,010
Número de gânglios linfáticos positivos.	-	1,108 (0,985; 1,248)	0,089	0,090
Estádio patológico "T"	1- pT2 (n=86)** 2- pT3a (n=46) 3- pT3b (n=15)	- 2,155 (0,831; 5,588) 4,730 (1,640; 13,637)	- 0,114 0,004	0,020
Estádio patológico "N"	0- pN0 (n=65)** 1- pN1 (n=8)	2,072 (0,594; 7,231)	0,253	0,300

* IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR.

** Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

*** Teste de Wald

¹Por constrangimentos estatísticos, decorrentes da dimensão mínima da categoria "1" e "5", estas foram retiradas da análise.

²Por constrangimentos estatísticos, decorrentes da dimensão mínima das categorias "3-mucinoso" e "5-neuroendócrino", estas foram retiradas da análise.

³Por constrangimentos estatísticos, decorrentes da dimensão mínima da categoria "≥9", esta foi retirada da análise.

⁴Por constrangimentos estatísticos, decorrentes da dimensão mínima da categoria "5", esta foi retirada da análise.

⁵ Por impossibilidade matemática não se apresentam os resultados da regressão de Cox, referentes à invasão perineural na peça operatória

Parece haver evidência de que o **SG da biópsia**, seja um factor preditivo de RBQ (p=0,004). Doentes que tenham scores de Gleason do tipo 8 ou 9, têm um risco estimado de RBQ mais elevado em relação a doentes que tenham um score de Gleason igual a 7. Este facto é também confirmado pela observação das estimativas das curvas de sobrevivência obtidas a partir do estimador de Kaplan-Meier (figura 18).

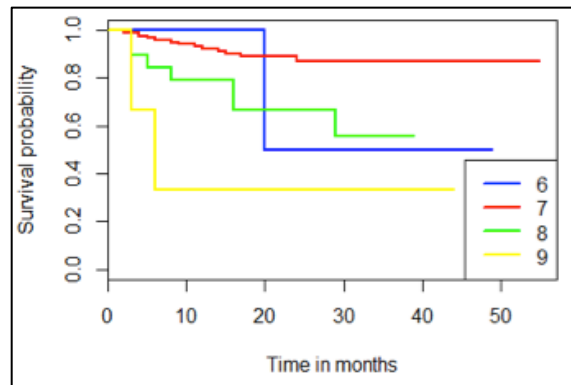


Figura 18. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para as várias categorias do SG da biópsia.

A **classificação de Epstein** determinada na biópsia, está associada, de modo estatisticamente significativo ($p=0,005$), ao tempo até ocorrência de RBQ. Um maior risco de RBQ, está associado a categorias com valores superiores da classificação de Epstein. Este facto pode ser observado nas estimativas das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier (figura 19).

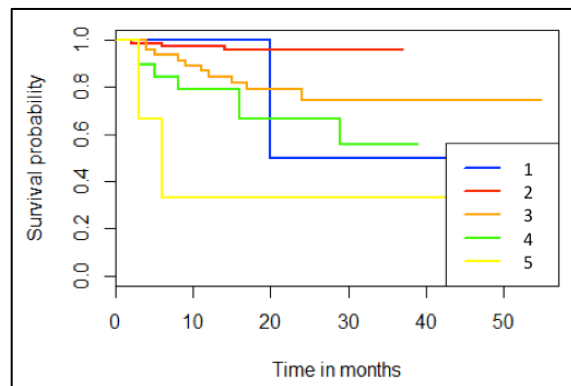


Figura 19. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para as várias categorias da CE da biópsia.

Quando se consideram o **número de fragmentos da biópsia** invadidos por tumor, a **extensão máxima do envolvimento neoplásico** na biópsia e a **percentagem máxima de envolvimento neoplásico**, também na biópsia, conclui-se que todos eles estão relacionados, com significado estatístico, com o tempo até à ocorrência de RBQ. As estimativas dos HR são, respetivamente, iguais a 1,10 ($p=0,05$), 1,08 ($p=0,01$) e 1,02 ($p=0,02$). Ainda dentro dos parâmetros obtidos a partir da biópsia, a ocorrência de

invasão perineural, não está associada ao tempo até ocorrência de RBQ (HR=1,56, p=0,30). Esta conclusão também pode ser observada através das estimativas das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier (figura 20).

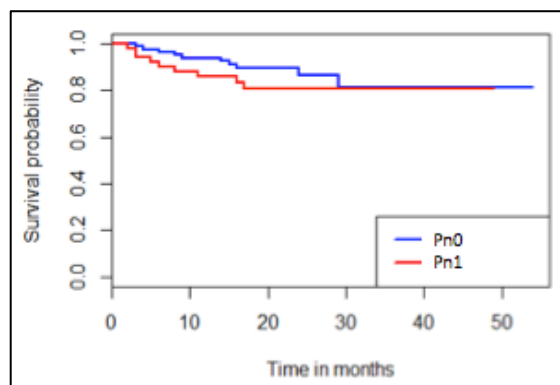


Figura 20. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier com e sem invasão perineural na biópsia.

A presença de **áreas de diferenciação intraductal** na peça operatória, está associada, de modo estatisticamente significativo (HR=3,48, p=0,003), ao tempo até ocorrência de RBQ. Doentes com áreas de diferenciação intraductal têm um risco estimado de RBQ, cerca de 3,48 vezes superior ao de doentes com tumores com diferenciação exclusivamente acinar (figura 21).

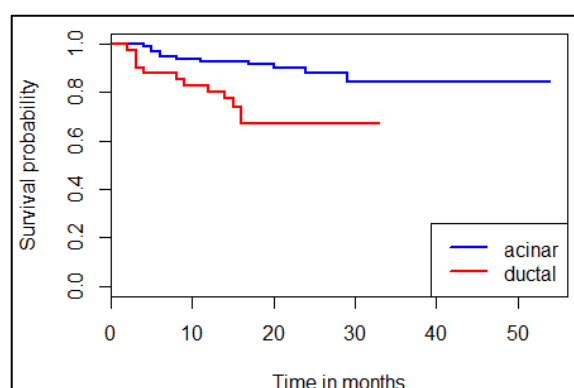


Figura 21. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier com e sem presença de áreas de diferenciação intraductal.

Quando se avaliou a **percentagem da área de diferenciação intraductal**, como variável numérica, esta não atingiu a significância estatística, embora o resultado se situe numa margem de tendência (p=0,07). Em face deste resultado, resolveu-se

categorizar esta variável usando como ponto de corte os 20%, e levando em linha de conta a totalidade dos casos. Tomando como categoria de referência a inexistência de diferenciação intraductal, obtiveram-se as seguintes conclusões (figura 22):

- O risco estimado de RBQ, nos doentes que têm até 20% de área tumoral com diferenciação intraductal, é cerca de duas vezes superior ao dos doentes com diferenciação exclusivamente acinar (HR=2,00; IC de 0,55 a 7,27).
- No caso de existir mais de 20% de área de diferenciação intraductal, este risco de RBQ, é cerca de quatro vezes superior ao risco de doentes com diferenciação exclusivamente acinar (HR=4,71; IC 95% de 1,93 a 11,45; $p<0,001$).

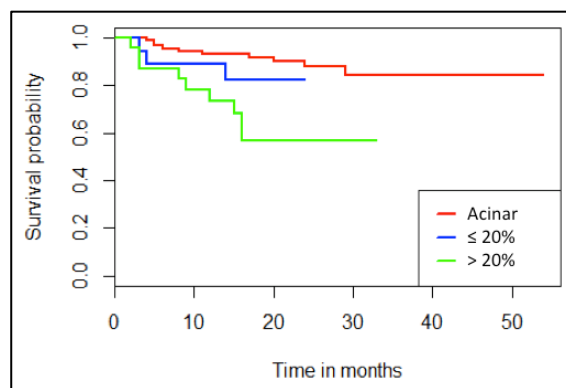


Figura 22. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, sem áreas de diferenciação intraductal e quando esta é menor ou igual a 20% e é maior que 20%.

Não foi detectada uma associação estatisticamente significativa entre o **SG da peça operatória** (figura 23) e o tempo até à ocorrência de RBQ ($p=0,20$), ao contrário do que sucedera com o SG da biópsia.

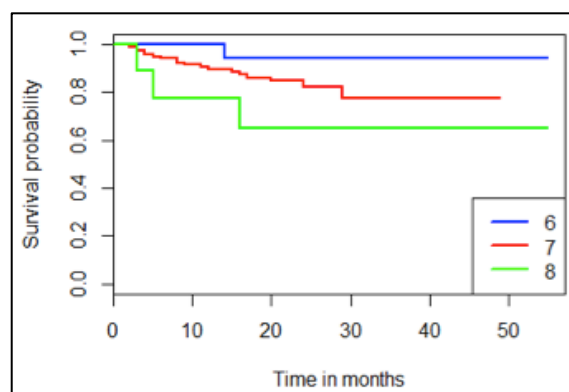


Figura 23. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, das várias categorias do Score de Gleason, na peça operatória.

No entanto, existe evidência estatisticamente significativa ($p=0,006$) de que a **classificação de Epstein** da peça operatória, está associada a um aumento do risco de RBQ, à medida que aumentam as categorias que a constituem (figura 24). Isto é, doentes com grupos de prognóstico mais elevados, nomeadamente os “2” “3” e “4”, têm riscos estimados de ocorrência de RBQ superiores ($HR=1,64$, $7,70$ e $7,16$, respetivamente) em relação aos doentes com um grupo de prognóstico de “1” (considerado como categoria de referência).

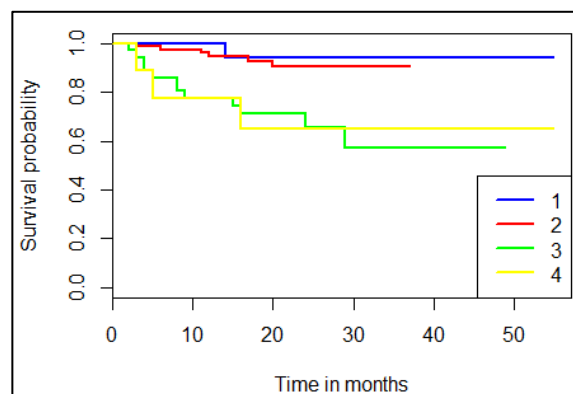


Figura 24. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, das várias categorias da classificação de Epstein, na peça operatória.

Existe evidência, estatisticamente significativa ($HR=9,01$, $p<0,001$), de que a presença de **padrão terciário**, está associada a um aumento do risco de ocorrência de RBQ (figura 25).

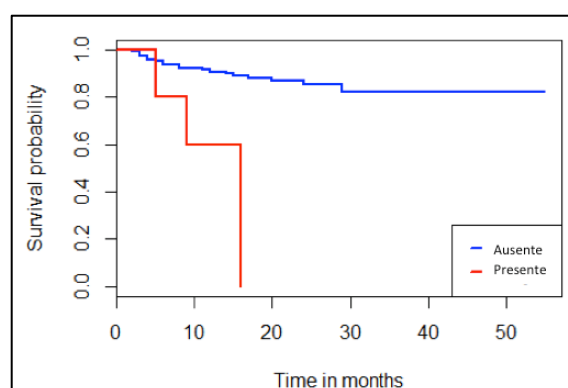


Figura 25. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, com e sem existência de padrão terciário, na peça operatória.

O **score de Gleason** da lesão índice (figura 26), parece estar associado a um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) do risco de ocorrência de RBQ. Isto ao contrário do que sucedia na totalidade da peça, em que esta variável não atingiu a significância estatística ($p = 0,20$). Aliás existe uma diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,001$), entre o resultado do SG da peça operatória e da lesão índice. Este resultado foi obtido através da realização do teste não paramétrico de Wilcoxon, para amostras emparelhadas.

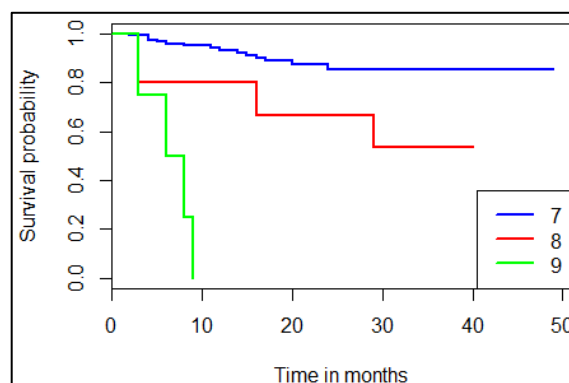


Figura 26. Comparação entre curvas de sobrevivência, das várias categorias do SG, na lesão índice.

Também ao nível da lesão índice, e à semelhança do que sucedeu na biópsia e na peça, a **classificação de Epstein**, foi um preditor, estatisticamente significativo ($p < 0,001$), do risco de RBQ (figura 27). Quando se consideraram, os resultados da CE na peça e na LI, estes apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$), à semelhança do que se demonstrou para o SG da peça e da LI. Este resultado também foi obtido através do teste de Wilcoxon.

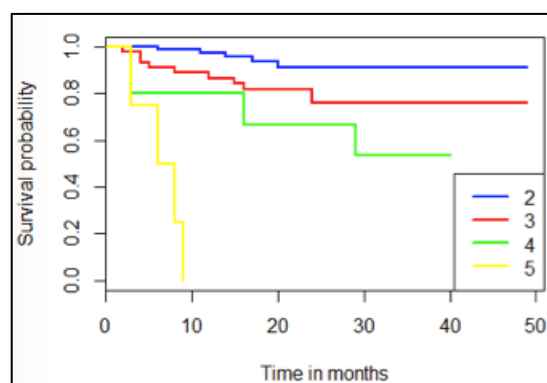


Figura 27. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, das várias categorias da CE, na lesão índice.

Quanto à análise dimensional da LI, os dois parâmetros estudados obtiveram resultados diferentes. A maior **extensão** linear é um factor preditivo, com significado estatístico (HR=1,06, p=0,005), de RBQ. Por outro, lado o **volume** da LI, não o é (HR=1,07, p=0,30).

Quando de se avaliou o impacto da **unifocalidade** versus o da **multifocalidade**, na ocorrência de RBQ, demonstrou-se que não têm significado estatístico (p=0,20). As curvas de sobrevivência desta variável, bem como o HR de 0,56, parecem sugerir que os tumores multifocais, na nossa amostra, estão associados a um menor risco estimado de RBQ (figura 28).

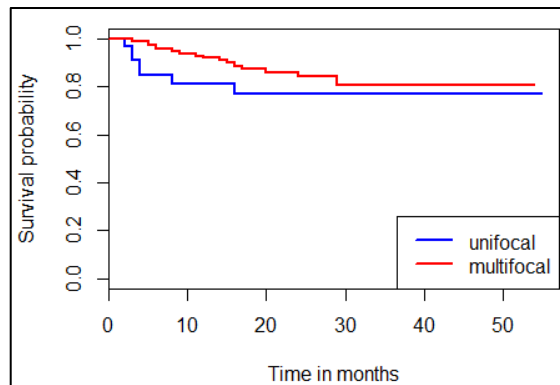


Figura 28. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, dos tumores unifocais versus multifocais.

O estado da **margem cirúrgica**, é um factor preditivo com significado estatístico (HR=2,36, p=0,05), para a ocorrência de RBQ (figura 29). A existência de uma margem cirúrgica positiva, aumenta o risco estimado de RBQ em cerca de 2,4 vezes, em relação a uma margem cirúrgica negativa. Por outro lado, não se detetou um resultado estatisticamente significativo para a variável **extensão da margem cirúrgica**, (HR=1,06, p=0,40).

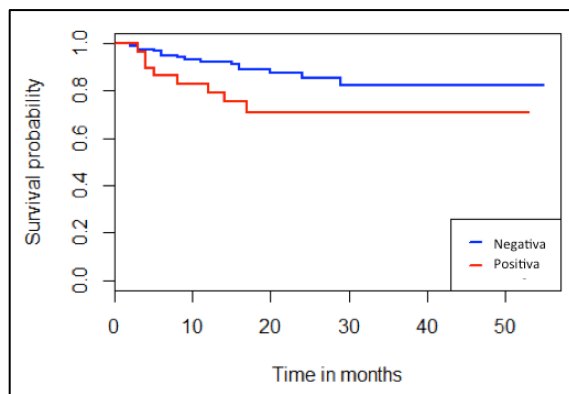


Figura 29. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com margem cirúrgica negativa versus positiva.

No que diz respeito à **extensão extraprostática** (figura 30) verificou-se que a ocorrência versus a não ocorrência de EEP, está relacionada, com significado estatístico, com o desenvolvimento de RBQ (HR=2,64, $p=0,02$). Por outro lado, a dimensão, em milímetros, da EEP não atingiu a significância estatística para $\alpha=0,05$, embora o HR=1,07 ($p=0,06$), sugira uma tendência de aumento do risco à medida que a dimensão da extensão extraprostática aumenta.

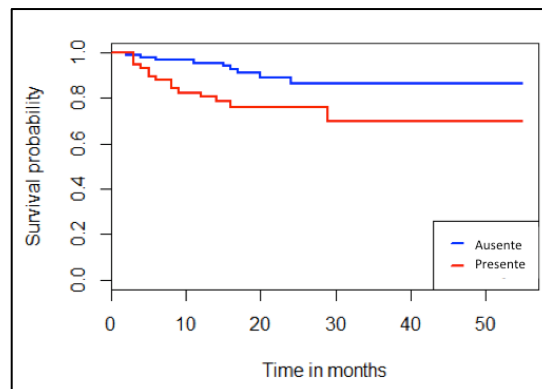


Figura 30. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem extensão extraprostática.

Não foi possível efetuar o modelo de regressão de Cox para a existência de **invasão perineural** na peça devido a não haver uma dimensão suficiente da amostra. Chama-se a atenção para o facto de nenhum dos 18 doentes, nos quais não se detetou

invasão perineural, ter tido a ocorrência de RBQ (recta azul horizontal na figura 31). O resultado do p (teste “log rank”) obtido a partir da análise de sobrevivência de Kaplan-Meier situou-se numa margem de tendência ($p=0,08$).

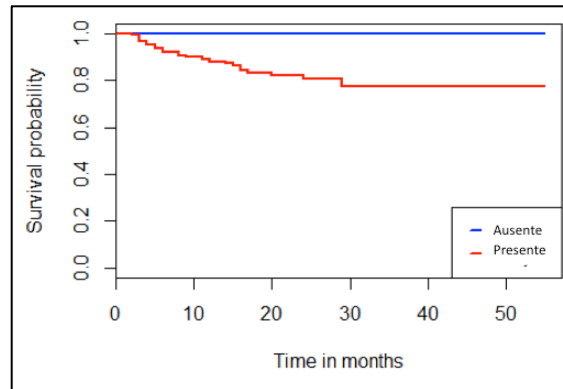


Figura 31. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem invasão perineural.

A presença de **invasão vascular** na peça (figura 32) influencia o tempo até à ocorrência de RBQ ($HR=5,70$, $p=0,002$). Um doente onde a presença de invasão vascular foi detectada tem um risco estimado de ocorrência de RBQ cerca de 5,7 vezes superior ao de um doente onde a invasão vascular não tenha sido detectada.

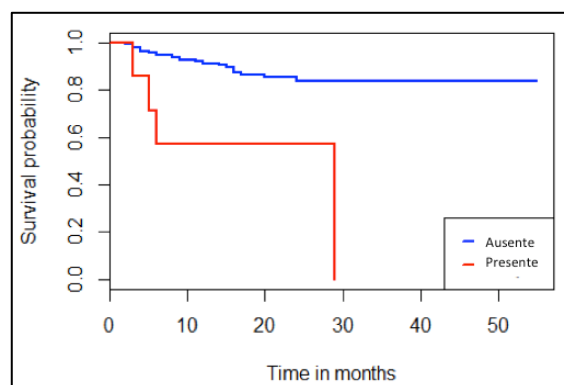


Figura 32. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem invasão vascular.

A existência de **invasão das vesículas seminais** está relacionada, de modo estatisticamente significativo ($HR=3,38$, $p=0,01$), com o tempo até à ocorrência de RBQ (figura 33). Um doente onde a presença de invasão das vesículas seminais foi

detetada, tem um risco estimado de ocorrência de RBQ cerca de 3,4 vezes superior, ao de um doente onde esta não exista.

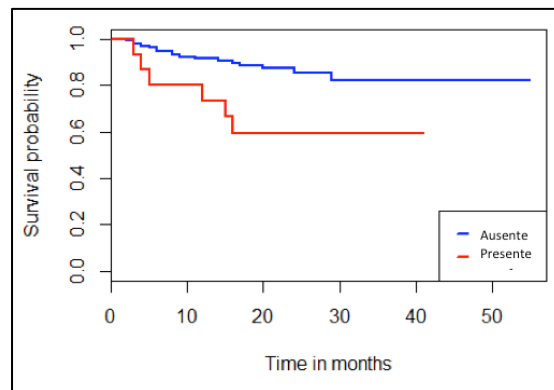


Figura 33. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem invasão das vesículas seminais.

Na população que constitui este projeto de investigação documentou-se uma relação, estatisticamente significativa ($HR=1,06$, $p=0,01$), entre o **número de gânglios isolados**, em doentes submetidos a linfadenectomia, e o tempo até à ocorrência de RBQ. Por cada gânglio isolado adicionalmente, o risco de RBQ aumenta cerca de 6,2%.

Não se detetou uma associação estatisticamente significativa entre o **número de gânglios linfáticos com invasão tumoral** e o tempo até à ocorrência de RBQ ($HR=1,10$, $p=0,09$). No entanto, é preciso lembrar que foram apenas 8, os doentes em que ocorreu disseminação ganglionar e que o valor de p , não está muito distante de atingir a significância estatística, para o α que adotamos (0,05). Do mesmo modo, quando se avaliou o **estádio patológico "N"** (figura 34), este também não atingiu significância estatística ($HR=2,07$, $p=0,30$).

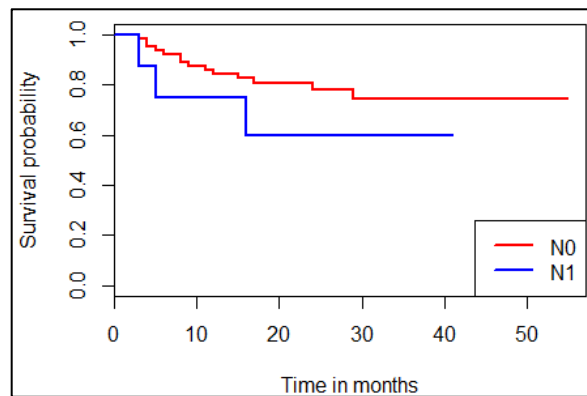


Figura 34. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, em casos com e sem existência de metastização ganglionar.

O **estádio patológico “T”** (figura 35) como seria expectável, associou-se de modo estatisticamente significativo ($p=0,02$), ao risco de RBQ (HR= 2,15 e 4,73). Tendo os doentes com estádios patológicos “pT3a” e “pT3b”, riscos estimados de ocorrência de RBQ cerca de 2,2 e 4,7 vezes superior, respetivamente, ao de doentes com doença confinada à próstata (“pT2”).

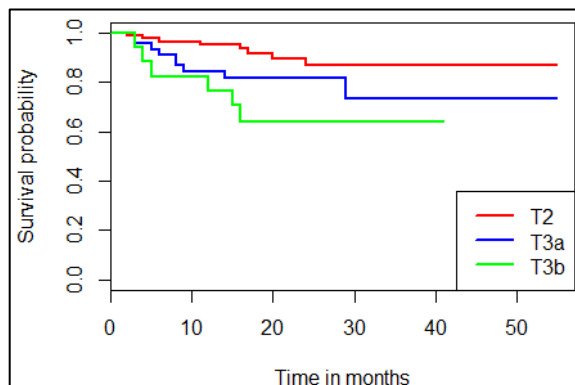


Figura 35. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, entre os vários estádios patológicos referentes ao tumor primário.

4.2.3. Variáveis moleculares

No quadro 22 resume-se o resultado dos modelos de regressão de Cox para as variáveis moleculares, à exceção de SOX2, OCT4, caderina N, MSH2 e marcadores de potencial estaminal. A decisão de excluir estes marcadores, prende-se com o facto de terem registado uma taxa de positividade baixíssima (quadro 15).

Quadro 22. Resultado de modelos de regressão de Cox referente às variáveis moleculares.

Variáveis moleculares	Categorias	Estimativa HR (IC 95%*)	Valor p	p***
SOX2	1 - <10% (n=61) 2-10 e 50% (n=1) 3 - > 50% (n=0)	- ¹	-	-
OCT4	1 - <10% (n=61) 2-10 e 50% (n=1) 3 - > 50% (n=0)	- ¹	-	-
Caderina E	0 - ≥ 70% (n=55)** 1 - < 70% (n=7)	7,524 (2,743; 20,672)	<0,001	<0,001
Caderina N	0 - < 5% (n=62) 1 - ≥ 5% (n=0)	- ¹	-	-
Vimentina	0 - 0% (n=37)** 1 - > 0% (n=25)	0,545 (0,193; 1,535)	0,256	0,300
ERG	0 - ≤ 90% (n=42)** 1 - > 90% (n=20)	0,802 (0,285; 2,259)	0,677	0,700
p53	0 - ≤ 10% (n=45)** 1 - > 10% (n=17)	1,031 (0,367; 2,893)	0,954	1
Ki67	0 - ≤ 2% (n=31)** 1-3 a 25% (n=25) 2-26 a 50% (n=6) 3-51 a 75% (n=0) 4 - ≥ 76% (n=0)	- 1,654 (0,599; 4,569) 2,958 (0,758; 11,547) - -	- 0,332 0,119	0,300
PTEN	0 - > 90% (n=44)** 1 - ≤ 90% (n=18)	0,625 (0,206; 1,90)	0,407	0,400
PMS2	0 - 100% (n=57)** 1 - < 100% (n=5)	1,823 (0,415; 8,003)	0,426	0,400
MSH6	0 - 100% (n=57)** 1 - < 100% (n=5)	0,891 (0,118; 6,73)	0,911	0,900
MLH1	0 - 100% (n=58)** 1 - < 100% (n=4)	1,080 (0,143; 8,165)	0,941	0,900
MSH2	0 - 100% (n=61) 1 - < 100% (n=1)	- ¹	-	-
Marcadores de potencial estaminal	0 (n=60) 1 (n=2)	- ¹	-	-
Marcadores de TEM	0 (n=39)** 1 (n=23)	0,781 (0,29; 2,102)	0,624	0,600
Marcadores de reparação de ADN	0 (n=50)** 1 (n=12)	1,093 (0,313; 3,808)	0,889	0,900
SCHLAP1 em tecido tumoral	-	1,065 (0,734; 1,545)	0,741	0,700
SCHLAP1 em tecido normal	-	1,319 (0,714; 2,437)	0,376	0,400

* IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR.

** Categoria de referência/denominador da comparação na análise de regressão de Cox.

*** Teste de Wald

¹Excluída da análise de regressão de Cox.

Em relação à **caderina E**, registou-se uma associação, estatisticamente significativa (HR=7,52, $p < 0,001$), entre a perda de expressão deste marcador e a ocorrência de RBQ (figura 36). Os casos em que ocorreu a perda de expressão deste biomarcador, apresentam um aumento do risco estimado de ocorrência de RBQ, avaliado em mais de 7 vezes. No entanto, dever-se-á considerar a grande amplitude do IC a 95% (2,74; 20,67).

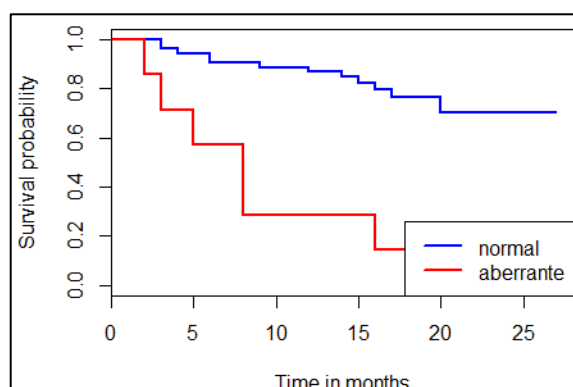


Figura 36. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, entre casos com expressão normal e aberrante de caderina E.

Nos restantes biomarcadores analisados não foram encontradas associações, estatisticamente significativas, com o tempo até à ocorrência de RBQ. Em seguida apresentam-se as estimativas das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier das seguintes variáveis moleculares: Vimentina, ERG, p53, Ki67, PTEN, TEM, MSH6, MLH1 e PMS2 (figura 37).

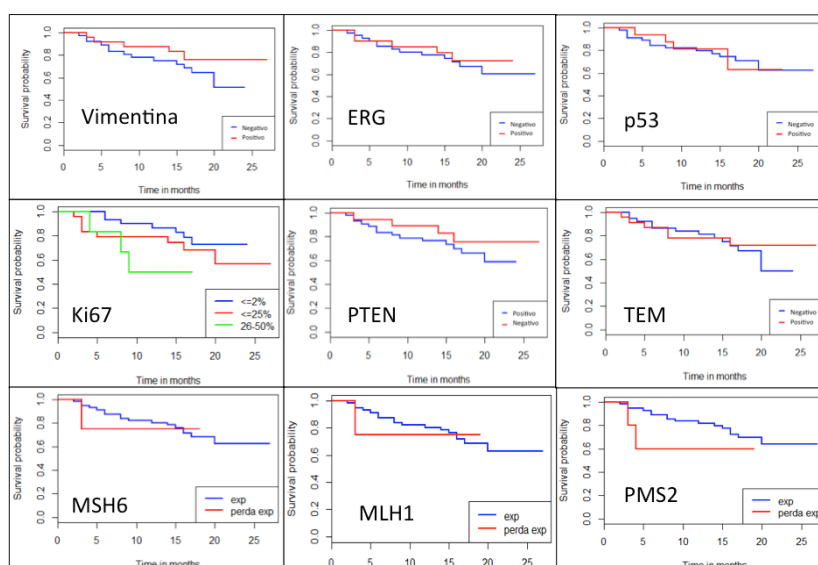


Figura 37. Estimativa das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos marcadores não relacionados com RBQ

4.3. Análise multivariável

Em face dos resultados anteriores, selecionaram-se para análise multivariável as variáveis enumeradas no quadro 23. De acordo com Hosmer e colaboradores⁴⁰⁷ foi usado um $p < 0,200$, para selecionar as variáveis a incluir num primeiro modelo multivariável, visto se a escolha recaísse sobre $p < 0,05$ iríamos excluir muitas variáveis que poderiam ser relevantes. Considerámos que não existia nenhuma variável com $p > 0,200$ que, pela sua implicação clínica, justificasse inclusão no modelo multivariável, no entanto todas foram testadas para inclusão em modelos multivariáveis.

Quadro 23. Variáveis selecionadas para análise multivariável (continua).

Variáveis	P
PSA pré-operatório	0,021
Tipo de cirurgia	0,014
Score de Gleason (biópsia)	0,004
Classificação de Epstein (biópsia)	0,005
Nº de fragmentos invadidos por neoplasia (biópsia)	0,05
Extensão máxima do envolvimento neoplásico nos fragmento (biópsia)	0,01
% máxima de envolvimento neoplásico nos fragmentos (biópsia)	0,02
Subtipo histológico (peça)	0,003
Percentagem de intraductal (numérica)	0,07
Percentagem de intraductal (categórica)	<0,001
Score de Gleason (peça)	0,2
Classificação de Epstein (peça)	0,006
Presença de padrão terciário (peça)	<0,001
Score de Gleason da lesão índice	<0,001
Classificação de Epstein da lesão índice	<0,001
Extensão máxima da lesão índice	0,005
Estado da margem cirúrgica	0,05
Extensão extraprostática (peça)	0,02
Dimensão da extensão extra-prostática (peça)	0,06

Quadro 23. Variáveis selecionadas para análise multivariável (continuação).

Invasão vascular (peça)	0,002
Invasão vesículas seminais (peça)	0,01
Número de gânglios linfáticos isolados	0,01
Número de gânglios linfáticos positivos	0,09
Estádio patológico "T"	0,02
caderina E	<0,001

Após a seleção das variáveis, aplicaram-se as técnicas estatísticas multivariáveis de modo a colocar em evidência os factores que poderão estar associados ao tempo até à ocorrência de recorrência bioquímica. Os resultados seguintes emergem de modelos finais otimizados, com o intuito de abarcarem o maior número de factores preditivos. Pretende-se que a análise multivariável funcione como um último filtro que nos permita identificar quais os factores relacionados, de modo mais robusto, com a variável dependente, quando outras variáveis são também ajustadas ao modelo. A seleção das variáveis a incluir nos modelos finais, foi realizada através de uma metodologia "stepwise" do tipo "backward".

As variáveis que atingiram significado estatístico na análise multivariável foram: o subtipo histológico observado na peça operatória, a classificação de Epstein observada na lesão índice, a existência de invasão vascular na peça operatória, o número de gânglios linfáticos isolados em doentes submetidos a linfadenectomia e a perda de expressão de caderina E. Os resultados globais da análise multivariável estão resumidos no quadro 24.

Quadro 24. Resultados globais da análise multivariável (continua).

Variáveis anatomopatológicas	Categorias	Estimativa HR (IC 95%*)	Valor p
Subtipo histológico (peça)	1- acinar (n=100)**	-	0,011
	3- intraductal (n=42)	3,882 (1,359; 11,089)	
	5-mucinoso (n=1)	- ¹	
	6-neuroendocino (n=1)	- ¹	

Quadro 24. Resultados globais da análise multivariável (continuação).

Classificação de Epstein da lesão índice	"1"- (n=0)	-	-
	"2"- (n=78)**	-	-
	"3"- (n=45)	2,970 (0,895; 9,847)	0,075
	"4"- (n=10)	2,565 (0,505; 13,016)	0,255
	"5"- (n=4)	35,553 (6,800; 185,88)	<0,001
Invasão vascular (peça)	0- ausente (n=140)** 1- presente (n=7)	7,544(1,339; 42,989)	0,028
Número de gânglios linfáticos isolados	-	1,056(1,003; 1,114)	0,048
Caderina E	0 - ≥ 70% (n=55)** 1- < 70% (n=7)	- 8,121 (2,118; 31,130)	0,002

*IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR.

** Categoria de referência

¹Por constrangimentos estatísticos, decorrentes da dimensão mínima das categorias "3-mucinoso" e "5-neuroendócrino", estas foram retiradas da análise.

No primeiro modelo obtiveram-se resultados estatisticamente significativos em relação ao subtipo histológico, à classificação de Epstein da lesão índice e à invasão vascular. Doentes em que tenha sido registada uma área de diferenciação intraductal, têm um risco estimado de RBQ cerca de 4 vezes superior (HR=3,88, p=0,011), quando comparados com doentes com diferenciação exclusivamente acinar. Isto, considerando doentes com a mesma classificação de Epstein e a mesma situação em termos de ocorrência, ou não, de invasão vascular.

Doentes em que tenha ocorrido invasão vascular têm um risco estimado de RBQ, cerca de sete vezes e meia superior (p=0,028), em relação aos doentes em que não ocorreu invasão vascular. Isto, considerando doentes com o mesmo subtipo histológico e a mesma classificação de Epstein.

Quando se considera a categoria de risco 5 da classificação de Epstein da lesão índice, esta acarreta um aumento do risco de RBQ, em mais de 30 vezes (p<0,001), quando comparado com a categoria de risco 2. Isto, levando em linha de conta doentes com o mesmo subtipo histológico e a mesma situação em termos de ocorrência, ou não, de invasão vascular. Neste modelo multivariável, o resultado da classificação de Epstein obteve um "Hazard Ratio" muito elevado assim como, uma amplitude muito grande para o intervalo de confiança correspondente. Dado que estes valores mostram que não se obteve uma precisão minimamente satisfatória para estas estimativas, decidiu-se construir um segundo modelo em que se juntaram

as categorias de risco 4 e 5 da Classificação de Epstein, para assim aumentar assim o numero de doentes e tentar obter mais precisão nas estimativas do modelo de regressão de Cox. Não obstante, esta estratégia estatística, é questionável do ponto de vista clínico. Os resultados deste segundo modelo estão resumidos no quadro 25.

Quadro 25. Resultados da análise multivariável para modelo alternativo.

Variáveis anatomopatológicas	Categorias	Estimativa HR (IC 95%*)	Valor p
Subtipo histológico (peça)	1- acinar (n=100)**	-	0,009
	3- intraductal (n=42)	3,985 (1,408; 11,276)	
	5-mucinoso (n=1)	- ¹	
	6-neuroendocino (n=1)	- ¹	
Classificação de Epstein da lesão índice	"1"- (n=0)	-	-
	"2"- (n=78)**	-	-
	"3"- (n=45)	2,923 (0,882; 9,684)	0,079
	"4 e 5"- (n=14)	5,456 (1,417; 21,004)	0,013
Invasão vascular (peça)	0- ausente (n=140)**	4,707 (0,863, 25,989)	0,073
	1- presente (n=7)		

*IC(95%) – Intervalo de Confiança a 95% para o HR.

** Categoria de referência

¹Por constrangimentos estatísticos, decorrentes da dimensão mínima das categorias "3-mucinoso" e "5-neuroendócrino", estas foram retiradas da análise.

Em termos do resultado da classificação de Epstein, o aumento do risco de recorrência bioquímica continua a ser estatisticamente mais elevado para a categoria mais alta, tendo-se conseguido obter valores de HR e da amplitude do IC 95% mais fiáveis, no que diz respeito à precisão. Neste segundo modelo o subtipo histológico manteve a significância estatística, mas a invasão vascular perdeu-a, embora o valor de HR esteja dentro de uma margem de tendência.

Por fim, apresentam-se os resultados referentes a um outro modelo. A razão para o recurso a um terceiro modelo distinto, passa pelo facto dos dados referentes ao "contexto ganglionar", só estarem disponíveis para 73 dos 147 doentes que constituem a nossa amostra. Isto porque foram 73 os casos em que os doentes foram tratados com linfadenectomia. A avaliação dos parâmetros "ganglionares" no modelo geral, iria diminuir a sua robustez. O resultado deste modelo mostrou que, por cada gânglio linfático isolado adicionalmente, existe um aumento estimado em

cerca de 5,6%, do risco de RBQ, considerando doentes com o mesmo pN e com mesmo número de gânglios metastizados.

Em todos os modelos que ajustamos, foram verificadas as proporcionalidades das funções de risco, através dos resíduos de Schoenfeld, não se tendo obtido valores significativos. Os valores de p referentes à análise dos resíduos de Schoenfeld (considerando o coeficiente de regressão $\beta=0$ com sendo a hipótese nula) obtido dos três modelos foram respetivamente 0,922, 0,850 e 0,299.

Uma última alusão, para o resultado da análise multivariável, referente à perda de expressão da caderina E. Quando esta variável foi introduzida no primeiro modelo, obteve-se um resultado estatisticamente significativo ($p=0,002$). No entanto devido ao reduzido número de doentes em que esta variável foi avaliada ($n=62$), considerou-se que a precisão das estimativas é limitada. Como tal do ponto de vista clínico optou-se por não valorizar, o resultado da análise multivariável, relativa à perda de expressão da caderina E.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo validam, na nossa amostra populacional, o interesse preditivo, em termos de ocorrência de RBQ, de vários factores clínicos, anatomopatológicos e um dos moleculares. Este trabalho também sugere, que algumas variáveis anatomopatológicas poderão ser factores preditivos independentes para a ocorrência de RBQ. Por fim, os nossos resultados apontam para uma possível relação entre o fenómeno de TEM e a RBQ. Contudo os nossos resultados não permitiram estabelecer uma relação entre as restantes variáveis moleculares e a ocorrência de RBQ.

Na discussão optou-se por seguir uma ordem de apresentação das diferentes variáveis, similar à que se utilizou nos capítulos anteriores desta tese.

5.1. – Variável dependente

A recorrência bioquímica, na nossa população, ocorreu em 23 doentes (15,6%). A escolha da RBQ enquanto “endpoint”, que serviu de variável dependente, foi ditada por constrangimentos práticos. A nossa amostra populacional foi composta, exclusivamente, por doentes tratados na Fundação Champalimaud. Esta instituição tem uma história relativamente recente e os primeiros doentes com TP começaram a ser tratados em 2012. Consequentemente a mediana de seguimento de toda a amostra populacional foi pequena (20 meses). Este facto associado à história natural prolongada dos TP, tornou impossível a utilização de outros “endpoints” mais robustos, como a mortalidade específica por TP ou a sobrevivência livre de metastização. A RBQ, enquanto “endpoint” clínico intermédio, apresenta defeitos. A história natural longa e variável, faz com que doentes com RBQ nunca cheguem a desenvolver doença clinicamente significativa ou venham a morrer de outra causa. No entanto, a sua utilização é apelativa. A sua frequência relativamente elevada implica utilização de amostras mais pequenas. A sua maior precocidade implica a necessidade de seguimentos menos prolongados. Por fim, não é afetada pelas opções terapêuticas que virão a ser tomadas após o estabelecimento de doença clinicamente significativa³⁶. Uma resposta definitiva, quanto à validade da RBQ como “endpoint” clínico intermédio, deverá ser aportada pelos resultado do estudo ICECaP³⁵.

Não obstante a falta de validação e as insuficiências, a RBQ é usada frequentemente como “endpoint” clínico intermédio. As séries mais representativas apontam para que a frequência da RBQ se situe entre 15 e 30%²⁸⁻³². Embora associados a durações de seguimento distintas, estes resultados estão alinhados com os que obtivemos.

Uma das insuficiências apontadas à RBQ passa pelo facto de nem todos os doentes com RBQ virem a desenvolver doença clinicamente significativa^{40,41}. Esta insuficiência poder-se-á esbater consoante a altura em que ocorre a RBQ. Existem dados que sugerem que RBQ mais precoce, a que ocorre nos primeiros 2 a 3 anos após a cirurgia, está associada a pior prognóstico^{30,40,79-83}. Na nossa população a totalidade das RBQ ocorreram precocemente. A mais tardia ocorreu 30 meses após a cirurgia. Uma outra possibilidade para mitigar esta limitação passaria pela inclusão de doentes de outras instituições. No entanto, considerou-se que variações na abordagem dos doentes, poderiam conduzir a heterogeneidade da amostra.

5.2. Variáveis demográfica e clínicas

Na nossa amostra, e utilizando a análise univariável, registou-se uma relação, estatisticamente significativa ($p=0,02$) entre o valor do PSA pré-operatório e a ocorrência de RBQ. O HR obtido diz-nos que, por cada aumento de uma ng/mL ocorre um aumento de 8,2% na probabilidade de ocorrência de RBQ. Na análise multivariável esta variável não atingiu significância estatística.

Os nossos resultados estão alinhados com a maioria dos dados publicados. Estes assumem o nível de PSA pré-operatório como um factor clínico com importância prognóstica^{29,32,408,409}. No entanto existem alguns estudos que questionam a importância prognóstica do PSA^{410,411}. Mesmo aceitando a sua importância prognóstica, a sua robustez não é suficiente para que seja utilizado isoladamente. Contudo, é utilizado na maioria dos esquemas de estratificação de risco, nomeadamente nos da AUA⁹¹ da NCCN⁷⁵ e no CAPRA⁹².

O tipo de cirurgia efetuado também se relacionou com a ocorrência de RBQ. Na análise univariável atingiu significância estatística ($p=0,01$), mas não na análise multivariável. Esta associação na nossa amostra tem, a nosso ver, pouco significado. Consideramos que a associação estatística resulta em grande medida de um viés de seleção. A decisão de realizar prostatectomia com ou sem linfadenectomia

associada, depende do risco de metastização ganglionar. Na nossa instituição, este risco é calculado através do nomograma de Briganti³⁶⁷. Doentes com maior probabilidade de metastização ganglionar, serão submetidos a prostatectomia com linfadenectomia. Ou seja os doentes submetidos a linfadenectomia, terão uma maior probabilidade de recorrência da doença. Este facto confirmou-se na nossa amostra. Os doentes submetidos a linfadenectomia, em análise univariável, tiveram um aumento do risco de ocorrência de RBQ de quase três vezes e meia, em relação aos doentes que não realizaram linfadenectomia. No limite poder-se-á especular que a seleção de doentes, para realização de linfadenectomia, está a ser efetuada corretamente.

A idade e o intervalo de tempo entre a biópsia e a cirurgia não estão associados, na nossa amostra, à ocorrência da RBQ. A média das idades, foram similares nos doentes em que ocorreu RBQ (60,8 anos) e nos que não ocorreu RBQ (61,5 anos). Este achado é concordante com os dados publicados, em que a idade não parece ser um factor de risco para RBQ⁹⁸⁻¹⁰⁰. A duração do intervalo de tempo entre a realização da biópsia e a cirurgia, não está associada ao aumento do risco de ocorrência de RBQ. A duração deste intervalo foi ligeiramente mais curta nos doentes em que ocorreu RBQ (mediana de 10 semanas) do que nos doentes sem RBQ (mediana de 11 semanas). Este resultado, poderá ter a ver com um viés de seleção. Doentes com doença de maior risco tenderão a esperar menos tempo pela realização de cirurgia. Do ponto de vista conceptual um aumento do tempo entre a biópsia e a cirurgia, poderá justificar um aumento da probabilidade de recorrência da doença. As soluções de continuidade, ao nível da cápsula prostática, resultantes da biópsia poderiam facilitar a migração de células neoplásicas. Os dados da literatura são escassos e não concordantes. Um estudo recente sugere a possibilidade deste intervalo poder ter algum impacto em termos prognósticos¹⁰⁸. Outros excluem a existência de relação entre este intervalo e a ocorrência de RBQ^{109,110}.

5.3. Variáveis anatomopatológicas

O Score de Gleason enquanto factor preditivo, teve um comportamento diferente consoante o contexto em que foi avaliado. Na análise univariável, o score de Gleason

da biópsia ($p=0,004$) e da lesão índice ($<0,001$), foram ambos factores preditivos de RBQ. No entanto, o score de Gleason obtido na totalidade da peça operatória não foi factor preditivo ($p=0,2$). Na análise multivariável, nenhum dos scores de Gleason foi factor preditivo de RBQ. Os nossos resultados estão alinhados com a extensa lista de estudos que demonstraram a capacidade prognóstica e preditiva do SG. O SG é preditivo da ocorrência de outros factores anatomopatológicos de mau prognóstico, da RBQ, da recorrência local e a distância, em doentes não tratados bem como em doentes que foram tratados com PR, com radioterapia e com outras terapêuticas¹¹⁵. A elevada robustez do SG tem tornado difícil a sua melhoria. No entanto ao longo das últimas 4 décadas, foram-se acumulando muitos dados que colocaram em evidência algumas das suas limitações, nomeadamente o que sucede em casos com SG de 7. Existe uma grande quantidade de evidência científica que suporta o facto destes doentes poderem ter prognósticos dispares. Os doentes com SG de “3+4” têm muito melhor prognóstico do que os com SG “4+3”¹¹⁷. Para responder a esta e a outras limitações do SG, foi criada a classificação de Epstein¹¹⁸. Esta coloca em categorias diferentes, os casos “3+4” (Grupo prognóstico II) e os “4+3” (Grupo prognóstico III). Os dados da nossa amostra, confirmam um melhor desempenho preditivo da classificação de Epstein em relação ao SG. A CE, em análise univariável, é preditiva de RBQ nos 3 contextos em que foi avaliada, a saber na biópsia ($p=0,005$), na totalidade da peça ($p=0,006$) e na lesão índice ($p<0,001$). A sua robustez preditiva, é ainda confirmada pelo facto de, em análise multivariável, a CE referente à lesão índice estar, estatisticamente, associado à ocorrência de RBQ. O facto de usarmos estas duas escalas de diferenciação celular, e de modo a não duplicar os resultados, levou-nos a não efetuar a subanálise da categoria 7 (“3+4” e “4+3”) do SG.

Para avaliarmos a extensão do envolvimento tumoral na biópsia, utilizámos 3 parâmetros: o número de fragmentos envolvidos por neoplasia, a extensão máxima do envolvimento neoplásico nos fragmentos positivos e a percentagem máxima de envolvimento neoplásico dos fragmentos positivos. Todos os três parâmetros, na nossa amostra, atingiram significância estatística em análise univariável. O p para os três parâmetros foi respetivamente de 0,05, 0,01 e 0,02. Na análise multivariável, nenhuma destas variáveis atingiu a significância estatística. A literatura aponta para que nem todos os parâmetros de quantificação de extensão do envolvimento

tumoral na biópsia, tenham mesma importância prognóstica¹⁴³. Por outro lado, seria impraticável quantificá-los a todos. No entanto, um factor que atesta a sua importância, é a sua inclusão em esquemas de estratificação de risco contemporâneos, como o da AUA⁹¹, do NCCN⁷⁵ e o score CAPRA⁹⁴. Por exemplo a EAU sugere, que em todas as biopsias positivas, seja quantificada a extensão de tumor, em milímetros ou em percentagem⁶⁵. No nosso trabalho, por cada fragmento adicional envolvido por tumor, registou-se um aumento do risco de RBQ de 10,1%. Do ponto de vista conceptual, poder-se-ia especular que um aumento do número de fragmentos positivos acarretaria um maior número de soluções de continuidade, por onde as células neoplásicas poderiam migrar. Existem pouquíssimos dados que exploram esta associação e os disponíveis não suportam a sua existência^{144,145}.

A maioria dos tumores da nossa amostra foram do subtipo acinar (n=141; 95,9%). Destes, 100 foram classificados como exclusivamente acinares e, nos restantes 41 (27,9%), também coexistia uma área de diferenciação intraductal, cuja extensão variou entre os 10 e os 80%. Um caso adicional apresentava diferenciação exclusivamente intraductal. Estes valores de frequência relativa estão de acordo com os dados disponíveis na literatura, em que a maioria dos tumores são acinares (acima de 95%) e em que áreas de diferenciação intraductal ocorrem em menos de 5% das biopsias¹³¹ mas entre 20 a 40% das peças operatórias¹³². A presença de diferenciação intraductal, na nossa amostra, assumiu-se como um factor preditivo de ocorrência de RBQ, quer na análise univariável (p=0,003), quer na análise multivariável (p=0,01). Este achado também é concordante com os dados disponíveis^{134,136,137,412}. Um aspeto muito pouco referenciado na literatura diz respeito ao impacto preditivo de uma percentagem crescente de área de diferenciação intraductal. No nosso trabalho, em termos percentuais, a área de diferenciação intraductal, variou entre os 10 e os 100%. Quando esta variável foi assumida como numérica, na análise univariável, obteve-se um resultado numa margem de tendência (p=0,07). Quando esta variável foi categorizada, assumindo como ponto de corte os 20%, obteve-se um resultado altamente significativo, em análise univariável. Em doentes com uma área de intraductal superior a 20%, ocorreu um aumento do risco estimado de RBQ, superior a 4 vezes (HR=4.71, p=<0,001), quando comparados com os doentes da categoria de referência (ausência

de diferenciação intraductal). Em análise multivariável, nenhum destes dois parâmetros atingiu significância estatística. Considerados em conjunto, os dados que obtivemos relativamente ao “intraductal”, consubstanciam a nossa observação clínica quotidiana, de que doentes com áreas de carcinoma intraductal, tendem a ter com maior frequência progressão da doença.

A presença de um padrão terciário foi descrita em 5 doentes (3,4%) e associou-se de modo significativo, em análise univariável, ao risco de ocorrência de RBQ ($p < 0,001$). Em análise multivariável, não atingiu significância estatística. Em termos de frequência, a literatura é relativamente díspar. A identificação de presença de padrão terciário vai desde 10 a mais de 50%, em vários trabalhos⁴¹³⁻⁴¹⁸. Provavelmente esta variabilidade deverá decrescer à medida que se adotam os refinamentos progressivos decorrentes dos vários consensos da ISUP. Esta mesma evolução metodológica poderá explicar, pelo menos em parte, a discrepância entre os nossos resultados e os que estão publicados. Em termos de prognóstico, os dados disponíveis na literatura são mais concordantes e suportam os nossos achados. A identificação de padrão terciário, na maioria dos estudos, está associada a um pior prognóstico^{116,117,128,414-419}.

O conceito de lesão índice é deveras interessante e o reconhecimento da sua importância tem sido crescente, nos últimos anos. Ao nível da lesão índice, e de acordo com a análise univariável, quer o SG ($p < 0,001$), quer a CE ($p < 0,001$), foram factores preditivos de RBQ. Contudo, quando se considerou a análise multivariável, foi apenas a CE, e não o score de Gleason, que atingiu a significância estatística. Ou seja, na nossa população a diferenciação determinada na LI parece ser superior, enquanto factor preditivo de RBQ, à mensurada, quer na biópsia quer na peça. De acordo com o nosso conhecimento, e considerando a literatura publicada, o nosso trabalho é o primeiro a sugerir que a CE, aplicada à LI, é um factor preditivo de RBQ. Importa ressaltar a grande amplitude do intervalo de confiança e o valor elevado do “Hazard Ratio”, associados à análise multivariável. Estes poderão suscitar reservas e, na nossa opinião, representam uma limitação do presente estudo. A nosso ver, este resultado deve-se à dimensão muito reduzida da categoria 5, constituída, apenas, por 4 observações e ainda pelo facto de em todos estes 4 doentes ter ocorrido RBQ. Por outro lado, importa recordar o facto de a população total ser constituída apenas

por 147 indivíduos. Na tentativa de avaliar o “comportamento” dos dados, construiu-se um segundo modelo de análise multivariável, em que se juntaram as categorias de risco 4 e 5 da CE. Também este outro modelo permitiu mostrar que a existência de menor diferenciação, está associada a um maior risco de RBQ. Doentes com uma categoria de risco 4 ou 5, apresentam um aumento do risco estimado de RBQ de quase cinco vezes e meia, quando comparados com doentes de categoria de risco 2 (categoria de referência). Ou seja, não obstante as limitações, enumeradas acima, pensamos que os nossos resultados sugerem, com consistência, a existência de uma associação entre a CE da LI e a ocorrência de RBQ.

Na nossa amostra, a importância preditiva da LI também foi sugerida pelos resultados do SG. Este quando foi avaliado na LI ($p < 0,001$), teve uma capacidade preditiva superior à encontrada na peça ($p = 0,2$) e na biópsia ($p = 0,004$). Considerados em conjunto, os dados referentes à diferenciação da LI, confirmam a sua importância preditiva, demonstrando a sua superioridade em relação à utilização da totalidade da peça operatória. Aliás, quer os resultados da CE quer os do SG, são estatisticamente diferentes (ambos com $p < 0,001$), quando se compara a totalidade da peça com a lesão índice.

Existem estudos, disponíveis na literatura, que suportam a importância preditiva da lesão índice^{157,420}. No entanto, esta poderá não ser igual para todos os TP. Dados recentes sugerem que a importância prognóstica da LI poderá ser maior em lesões de baixo risco e menor em lesões de alto risco⁴²¹. A dimensão reduzida da nossa amostra, não nos permitiu a exploração estatística desta possibilidade.

Para além da diferenciação, também foi avaliada a dimensão da LI, com recurso a dois parâmetros: a extensão máxima e o volume. Na análise univariável, obtivemos resultados diferentes para estes dois parâmetros. A extensão máxima está associada à ocorrência de RBQ ($p = 0,005$), o mesmo não sucedendo com o volume ($p = 0,3$). Em análise multivariável nenhum dos dois atingiu significância estatística. A mediana do volume da LI foi de $1,2 \text{ cm}^3$. Este valor é inferior ao resultado obtido num outro estudo (média de $2,42$)⁴²². Esta diferença em relação aos nossos dados poderá ser explicada pelo facto deste outro trabalho ter incluído doentes antes da generalização do rastreio com PSA. A avaliação do volume tumoral nos TP associa-se a várias questões. Uma delas é metodológica, já que diferentes métodos de

quantificar o volume tumoral podem influir no impacto preditivo deste parâmetro¹⁸⁸. Colocando de lado a metodologia, a literatura diverge quanto à existência^{189-191,423}, ou não^{192,193}, de impacto preditivo deste parâmetro. De realçar, que, muitos destes dados, dizem respeito ao volume do tumor e não ao volume da LI. Embora em tumores multifocais, a LI pareça representar a grande maioria - quase 90%, do volume tumoral total⁴²⁴.

A dimensão tumoral é um factor de prognóstico estabelecido em muitas neoplasias, mas não nos TP. A maior parte dos dados que avalia a extensão da LI, são obtidos por RM e não por anatomopatologia. Parece haver uma razoável concordância entre ambos os métodos^{425,426}. Num estudo, muito recente, a dimensão da LI medida por RM foi similar à encontrada na nossa amostra⁴²⁷. Os dados que relacionam a extensão da LI, medida na peça, com o risco de desenvolvimento de RBQ são escassos. Mizuno e colaboradores mostraram que a extensão da LI foi um factor preditivo independente para a ocorrência de RBQ. Reportaram que a média do valor da extensão da LI foi de 20 mm⁴²⁸, um valor sobreponível ao obtido na nossa amostra (19,74 mm).

Uma das razões que explica o interesse crescente no conceito da LI, são as suas prováveis implicações práticas. Os TP são, com frequência, multifocais e heterogêneos do ponto de vista histológico¹⁴⁶ e genético¹⁴⁷. Este facto poderá acarretar dificuldades no momento de caracterizar anatomopatologicamente a peça operatória. Se a LI traduzisse fidedignamente a lesão com o SG e o estágio patológico mais elevados, poderia permitir ultrapassar esta dificuldade. No entanto, esta relação, entre LI e o foco tumoral com características anatomopatológicas mais agressivas, é suportada por alguns trabalhos^{151,429}, mas questionada por vários outros¹⁵²⁻¹⁵⁵. Outro aspecto muito atractivo, passa pela possibilidade de tratamento focal. Se aceitarmos que a LI pode ditar o comportamento biológico e a letalidade dos TP, então a destruição seletiva desta lesão poderia ser curativa, ao mesmo tempo que limitava a toxicidade e os custos¹⁵⁸. Acresce ainda, o facto de a LI poder ser facilmente identificável por RM^{430,431}.

Na nossa população, a maior parte dos casos (76,9%), apresentavam tumores multifocais. A existência de multifocalidade não se associou a um aumento do risco de ocorrência de RBQ ($p=0,2$). A nossa frequência relativa de casos multifocais é

concordante com a literatura, em que a multifocalidade ocorre ente 60 e 90% dos casos¹⁴⁸. Quanto ao impacto prognóstico, os dados são mais dispares. Existem trabalhos que sugerem um aumento do risco de RBQ, associado à multifocalidade⁴³², enquanto que outros o contrariam⁴³³. Por outro lado, existe literatura que sugere o facto da doença unifocal poder estar associada a um pior prognóstico⁴³⁴, o que, aliás, parece ser sugerido pelos nossos dados, embora sem atingir significado estatístico (figura 28).

Na nossa amostra, a invasão perineural, quer na biópsia quer na peça operatória, não se associou à ocorrência de RBQ. No entanto, os números não são exatamente iguais. Ao contrário da invasão perineural na biópsia ($p=0,3$), a existência de invasão perineural na peça atingiu, um resultado numa margem de tendência ($p=0,08$). Nenhum destes parâmetros atingiu significância estatística na análise multivariável. Merece a pena ressaltar que, em nenhum dos 18 casos sem invasão perineural na peça, ocorreu RBQ. Em termos de frequência, a invasão perineural, na biópsia ocorreu em 47,3% dos casos e na peça em 87,8% dos casos. Estes valores estão alinhados com outros já publicados^{172,435}. A importância prognóstica da invasão perineural não é consensual, nem na biópsia^{173,175,435}, nem na peça¹⁷⁵. Embora não seja inequivocamente um factor preditivo independente e robusto, a invasão perineural poderá ter importância preditiva. Um melhor entendimento da sua fisiopatologia poderá ajudar a clarificá-la. Num trabalho recente, a invasão perineural associou-se a aumento da angiogénese tumoral, mas não da proliferação celular, nem da apoptose¹⁷⁵. Parece existir interação entre fibras nervosas, células tumorais e células do estroma. Várias neurotrofinas (NGF, BDNF e NT-3), EGFR e CD74, podem funcionar como facilitadores da invasão perineural^{176,177}, aparentando, também, estar associadas à TEM¹⁷⁸⁻¹⁸².

A existência de margem cirúrgica positiva foi documentada em 20,4% dos casos, e representa, na nossa população, um factor preditivo estatisticamente significativo ($p=0,05$) para RBQ. Este resultado não foi confirmado na análise multivariável. A nossa frequência de MCP está de acordo com os dados já publicados, nos quais varia entre 10 e 35%¹⁶¹⁻¹⁶⁶. Enquanto factor preditivo, a importância da MCP está estabelecida e são vários os trabalhos que a suportam¹⁶¹⁻¹⁶⁶. Dos vários factores que podem influenciar a importância da MCP (extensão, local e unifocalidade versus

multifocalidade), neste trabalho, apenas avaliamos a extensão. Esta, ao contrário do que seria expectável, não se associou à ocorrência de RBQ ($p=0,4$). Este resultado manteve-se mesmo quando se excluíram da análise dois “outliers”. A ausência de importância preditiva da extensão da MCP, poderá ter a ver com o baixo número de MCP (30 casos) e o valor relativamente baixo da extensão da mesma (mediana de 2 mm). Os vários estudos disponíveis não são completamente concordantes, mas sugerem a existência de pior prognóstico associado a MCP superiores a 3 mm¹⁶⁰.

A invasão vascular, na peça operatória, foi documentada em muito poucos casos (4,8%). Ainda assim, representa na nossa população, um factor preditivo independente de RBQ ($p=0,02$). De acordo com o valor do “Hazard ratio”, obtido em análise multivariável, a sua existência traduz-se num aumento do risco estimado de RBQ, superior a sete vezes. A frequência da invasão vascular descrita na literatura, varia consoante os trabalhos. Os mais antigos sugerem que poderá chegar a mais de 50%¹⁸³, embora dados mais recentes apontem para valores muito mais baixos, em torno dos 10%¹⁸⁶. Existem vários trabalhos que atestam a importância prognóstica da invasão vascular^{115,174,184,185}, incluindo uma meta-análise recente que avaliou 25 estudos e mais de 9500 doentes. Nesta, a LVI associou-se a RBQ e à presença de outros factores anatomopatológicos de mau prognóstico¹⁸⁶.

No nosso trabalho, ocorreram 57 casos (38,8%) com extensão extra-prostática. Decidiu-se explorar, adicionalmente, a importância deste factor anatomopatológico através da quantificação da sua extensão, em milímetros. A ocorrência, versus a ausência, de EEP foi um factor preditivo para a ocorrência de RBQ ($p=0,02$). No entanto, a sua dimensão, avaliada como variável numérica contínua, não foi factor preditivo para a ocorrência de RBQ, embora o resultado estatístico se encontre numa margem de tendência ($p=0,06$). A ausência marginal de significado estatístico poderá ser explicado pela número relativamente baixo de casos com EEP e pela presença de um número elevado de “outliers”, cuja exclusão não foi metodologicamente possível. Nenhuma destas variáveis atingiu significância estatística em análise multivariável. Os nossos resultados não diferem muito da literatura disponível. A importância preditiva da existência de EEP está bem estabelecida. No entanto nem sempre é clara a separação entre EEP e MCP, quer em termos histológicos quer em termos estatísticos, enquanto factores preditivos¹⁶⁰.

Não obstante, parece que a EEP tem capacidade prognóstica independente da MCP¹⁹⁹. A provar a sua independência, está o facto de ser uma das características que define a categoria pT3a do sistema TNM. A importância da sua dimensão, também é sugerida como factor preditivo, mas com base em dados menos robustos. Uma das dificuldades em relação à dimensão passa pela metodologia usada na sua avaliação. A quantificação pode ser por métodos qualitativos¹⁹⁷ ou quantitativos¹⁹⁸, sendo que, esta última metodologia, parece ser superior¹⁹⁸. Independentemente do método usado, existem dados que associam uma maior dimensão da EEP a maior risco de RBQ^{200,201}.

Na nossa amostra, a invasão das vesículas seminais ocorreu em cerca de um décimo (10,2%) dos casos. Este valor, embora mais elevado, não parece diferir muito dos dados disponíveis na literatura. Estes apontam para valores decrescentes ao longo das últimas décadas, abaixo dos 5%, no decénio 2001 a 2010⁴³⁶. Esta diferença pode ter a ver com um refinamento crescente da técnica cirúrgica, que poderá conduzir o Urologista a ampliar as indicações para PR e, por outro lado, levar o doente a preferi-la, em detrimento de outras opções terapêuticas locais. Uma outra razão possível, passaria por insuficiência dos métodos de estadiamento. A utilização de RM no estadiamento local e regional da maioria dos doentes da nossa amostra, tornam esta hipótese menos plausível. Tal como seria expectável, no nosso trabalho, a IVS foi um factor preditivo ($p=0,01$) de RBQ, mas não atingiu significância estatística na análise multivariável. Este resultado está alinhado com a literatura, sendo múltiplos os estudos que confirmam o mau prognóstico associado a IVS¹⁹⁹.

Como seria expectável, o sistema de estadiamento TNM referente ao tumor primário, na nossa amostra, foi preditivo de recorrência bioquímica ($p=0,02$). Em análise multivariável, não atingiu significância estatística. A frequência de tumor confinado à próstata (“pT2”), na nossa amostra, foi de 57,8%. Estes valores diferem ligeiramente dos apresentados por Tewari, que avaliou mais de 57 mil doentes tratados com PR por via laparoscópica. Nestes os doentes com pT2 representavam 70,9% dos casos¹⁰³. Assumimos como explicação possível os argumentos usados, imediatamente acima, para justificar a diferença da frequência da IVS, entre a nossa amostra e dados publicados.

Em termos do envolvimento ganglionar, para além da existência, ou não, de

metastização ganglionar, resolvemos avaliar a importância do número de gânglios isolados e do número de gânglios com metastização. Procurámos, ainda, avaliar a importância da extensão extracapsular ao nível dos gânglios linfáticos metastizados, o que não foi possível, uma vez que ocorreu em apenas dois doentes. A metastização ganglionar foi documentada em 8 doentes (11%) dos 73 submetidos a linfadenectomia. Este valor está alinhado com os dados publicados que apontam para valores entre 5 e 10%^{205,437} e que têm vindo a aumentar progressivamente nos últimos anos^{206,437}. Ao contrário do que seria expectável, atendendo aos dados publicados^{31,199,206-208}, a existência de metastização ganglionar, na nossa amostra, não foi um factor preditivo para a ocorrência de RBQ ($p=0,3$). A explicação mais provável passa pelo pequeno número de doentes submetidos a linfadenectomia e o, ainda menor, com disseminação ganglionar.

Dado que provavelmente o mau prognóstico associado à metastização ganglionar não é uniforme em todos os doentes²⁰⁹, também avaliámos a importância preditiva do número de gânglios isolados na peça operatória, bem como do número de gânglios com metastização. Como seria de esperar, atendendo ao número baixo de doentes com disseminação ganglionar, o número de gânglios positivos não se associou à ocorrência de RBQ. Não obstante, existem dados que sugerem a importância preditiva de um maior número de gânglios metastizados²⁰⁹⁻²¹². Já o número de gânglios isolados, em todos os doentes submetidos a linfadenectomia, foi um factor preditivo independente de RBQ. Em análise multivariável, por cada gânglio isolado adicionalmente, houve um aumento do risco estimado de RBQ de 5,6%. Existem determinados tumores, como os do cólon, em que o impacto prognóstico positivo de um maior número de gânglios isolados na peça operatória, está bem estabelecido²¹⁴. No que concerne aos TP, os dados são escassos e divergentes^{215,216}.

5.4. Variáveis moleculares

Das múltiplas variáveis moleculares que avaliamos, apenas a caderina E está associada à ocorrência de RBQ, em análise univariável. Em análise multivariável, não obstante a obtenção de um resultado de p estatisticamente significativo (0,002), decidiu-se não o valorizar, dado que a precisão da estimativa se considera limitada. Esta limitação, na nossa opinião, deve-se exclusivamente à dimensão diminuta da

amostra. Nenhuma das restantes variáveis moleculares (SOX2, OCT4, caderina N, vimentina, ERG, p53, Ki67, PTEN, PMS2, MSH6, MLH1 e MSH2), atingiu significância estatística ou um resultado dentro de uma margem de tendência. Existem vários factores que podem explicar os nossos resultados, maioritariamente negativos. Primeiramente, o número relativamente baixo de casos que avaliámos. Também um factor, a duração de seguimento relativamente curta, dos doentes que constituíram a nossa amostra. E, por último, limitações metodológicas próprias do método de IHC, como sejam dificuldades na normalização e a variabilidade¹⁷⁴. Ainda dentro das questões metodológicas, há que considerar a possibilidade de insuficiência do observador, enquanto fonte de erro. Embora possível, parece-nos improvável, já que houve muito cuidado com a definição e execução da estratégia de treino e, por outro lado, houve durante a leitura dos casos, um acompanhamento muito próximo, por parte do Professor Doutor Antonio Lopez-Beltran. Outra possibilidade passa por um possível viés de seleção. Os casos com recorrência bioquímica foram escolhidos de acordo com a disponibilidade de tecido e os casos sem recorrência bioquímica, foram escolhidos de forma aleatória. Ainda dentro da metodologia, procurou-se adaptar estratégias que permitissem mitigar algumas das limitações da IHC. Avaliou-se, de modo combinado, marcadores com função biológica similar, de modo a aumentar a redundância. Não obstante esta estratégia, os marcadores de TEM, de potencial estaminal e de reparação de ADN, mesmo considerados em conjunto continuaram a não estar associados à ocorrência de RBQ. Adicionalmente, no plano de operacionalização de variáveis, teve-se o cuidado de escolher pontos de corte, o mais simples possíveis, desde que suportados por evidência publicada. Por fim, no caso da caderina N repetiu-se todo o procedimento imunohistoquímico e a leitura foi efetuada pelo Professor Doutor Antonio Lopez-Beltran. Os resultados foram iguais aos previamente reportados.

No caso específico da TEM, os resultados positivos da caderina E mas negativos dos restantes marcadores, considerados isoladamente e em conjunto, podem ter uma explicação metodológica e biológica. A explicação metodológica poderá ter a ver com a escolha, relativamente, arbitrária das variáveis a estudar. Na base desta escolha estiveram:

- A pouca literatura referente ao fenómeno de TEM nos TP, que estava disponível à data em que este projeto foi desenvolvido.
- A discussão com investigadores que tinham experiência no estudo, por IHC, do fenómeno de TEM.
- Constrangimentos económicos, que ditaram a utilização de um número limitado de marcadores.

A própria biologia do fenómeno de TEM, também pode contribuir para explicar os resultados que obtivemos. A TEM é um fenómeno biológico muito complexo, em relação ao qual estão descritos múltiplos indutores, facilitadores e inibidores. Estes, em conjunto, influenciam uma multiplicidade de efetores a nível genético que, por sua vez, conduzem a varias mudanças morfo-funcionais, através de variados efetores fenotípicos^{300,301}. A somar a esta complexidade, há ainda que levar em linha de conta a noção de reversibilidade, de parcialidade e de especificidade celular/tecidual que também caracterizam a TEM^{300,301}. Ou seja, pode ocorrer ativação do programa de TEM, sem que sejam expressos, ou são-no descontinuamente, os marcadores que foram avaliados neste projeto. À data atual, faz mais sentido admitir a TEM como um conjunto dinâmico de múltiplos estádios transitórios, entre os fenótipos epitelial e mesenquimatoso³⁰⁹.

Em relação à literatura disponível, os dados não são homogéneos e não divergem muito, dos obtidos na nossa amostra. Aceita-se que a TEM ocorre nos TP, mas desconhece-se o seu verdadeiro impacto na progressão tumoral e enquanto factor prognóstico. Behnsawy e colaboradores avaliaram diversos marcadores de TEM (caderina E, caderina N, catenina- β , catenina- γ , fibronectina, metaloproteinase-2, metaloproteinase-9, “Slug”, “Snail”, “Twist”, vimentina, “ZEB1” e ZEB2). Na análise univariável, apenas a caderina E, o “Snail”, o “Twist” e a vimentina estiveram associados à diminuição da sobrevivência livre de RBQ. Em análise multivariável, apenas o “Twist” e a vimentina mantiveram significância estatística³¹⁴. Os dados do grupo de Huber não são sobreponíveis. Em relação à TEM, este grupo, avaliou a expressão de caderina E, caderina N, NF- κ B e a vimentina. Em análise univariável a caderina E e o NF- κ B, mas não a caderina N e a vimentina, foram factores preditivos. Estes resultados não se confirmaram em análise multivariável. No mesmo trabalho quando a análise multivariável se limitou aos TP com SG 6 e 7, a caderina E e a

caderina N, passaram a ser factores preditivos independentes²¹⁷. Uma meta-análise recente avaliou vários marcadores de TEM (caderina E, caderina N, catenina- α , catenina- β , catenina- γ , fibronectina, metaloproteinase-2, metaloproteinase-9, Vimentina, “Snail”, “Twist”, “Slug”, “ZEB1” e ZEB2). Apenas a caderina N, o “Twist”, a Vimentina e o “Slug” foram factores preditivos para sobrevivência livre de RBQ³¹⁵. Existem vários outros trabalhos que associam os marcadores de TEM, que avaliamos, aos TP (veja “1.6.4.1. Caderina E”, “1.6.4.2 caderina N” e “1.6.4.3 Vimentina”).

Em relação às restantes variáveis moleculares avaliadas por IHC, os dados publicados também são heterogéneos. Tal como se referiu na Introdução (veja “1.6.4. Factores moleculares determinados por imunohistoquímica”), existe uma quantidade muitíssimo grande de trabalhos, que avaliam o impacto preditivo de biomarcadores avaliados por IHC. Muitos sugerem a importância preditiva destes biomarcadores. Contudo, na maioria dos biomarcadores, esta noção de importância não é confirmada pela totalidade dos estudos. Esta heterogeneidade de resultados, também está plasmada em trabalhos com metodologia mais robusta, como análises sistemáticas e meta-análises^{217,218,438}. Ou seja, tomando toda esta informação em conjunto, ficamos com a noção de que os nossos resultados não assumem contornos marcadamente dispare.

No que concerne à positividade do SOX2, existem trabalhos que sugerem que é frequente^{291,292} e outros que o declinam^{374,378}. Alguns trabalhos sugerem que sobreexpressão de SOX2 poderá estar associada a pior prognóstico^{288,291-293}. Outros parecem excluir a sua importância⁴³⁹. A positividade de OCT4 é variável, embora os dados apontem para frequências elevadas^{289,295} e pareçam sugerir um aumento da positividade associado a estádios mais avançados da doença³⁷⁹. Os poucos dados disponíveis parecem sugerir a importância prognóstica deste biomarcador^{289,294,295}. Diferentes isoformas de OCT4, poderão ter impacto prognóstico diferente²⁹⁴.

A proteína ERG é codificada pelo gene ERG e este é um dos proto-oncogenes mais frequentemente sobreexpresso nos TP. Não obstante uma quantidade muito grande de estudos publicados acerca do ERG, os seus significados, clínico e prognóstico, continuam a não estar perfeitamente definidos. Muitos estudos demonstraram um impacto prognóstico negativo enquanto que outros não. Esta disparidade parece persistir, mesmo utilizando metodologias mais evoluídas, que avaliam a expressão

genética. Em parte esta disparidade poderá advir do facto de diferentes rearranjos poderem ter significados biológicos diversos²⁴⁷⁻²⁴⁹.

Também em relação ao p53, os dados publicados são abundantes. A frequência das mutações do p53 aumenta muito, à medida que se avança na história natural da doença. São relativamente raras em tumores primários²⁵², e mais frequentes em formas avançadas da doença²⁵³. São vários os trabalhos que associam alterações do p53 a pior prognóstico^{255,254,256}. No entanto 3 análises sistemáticas não confirmaram o seu interesse enquanto factor prognóstico^{217,218,438}.

O Ki67 é um marcador de proliferação celular utilizado, noutros tumores, como factor prognóstico e, mais pontualmente, como factor preditivo. A literatura que associa o Ki67 aos TP é relativamente abundante e consistente. São vários os trabalhos que associam o Ki67 a um pior prognóstico²⁶³⁻²⁶⁷. Não obstante a quantidade e a relativa consistência dos dados, nas análises mais abrangentes citadas acima, apenas na de Zhao se confirmou que o ki67 era um factor preditivo independente²¹⁸. Tal não aconteceu nem na de Huber²¹⁷ nem na de Rizzardi⁴³⁸.

Tal como acontece com a p53, a perda de PTEN é mais frequente em formas mais avançadas da doença, do que em tumores primários. Nestes poderá ocorrer em até um quarto dos casos^{132,248,272}. A importância prognóstica da perda de PTEN é sugerida por muitos trabalhos^{132,248,272} e por uma metaanálise relativamente recente²⁷³. No entanto, nos trabalhos de Zhao e de Rizzardi, a perda de PTEN não foi um factor preditivo independente^{218,438}.

Cerca de um quinto, dos TP primários apresentam mutações em genes relacionados com a reparação do ADN²⁵². Tal como acontece com outros biomarcadores, a frequência destas alterações parece aumentar ao longo da evolução da história natural dos TP²⁷⁶. As alterações da reparação do ADN em TP, envolvem as diferentes vias de reparação²⁵³. Uma dessas vias é a da reparação de “mismatch”. Nos TP os genes mais frequentemente associados a esta via são o MSH2, o MSH6, o PMS2 e o MLH1^{277,278}. Os dados que associam alterações destes genes a TP são limitados, mas ainda assim suficientes para sugerir alguma importância preditiva^{281,282}. A decisão de incluir estes marcadores no nosso projeto prendeu-se, em grande medida, com o recente reconhecimento da sua importância preditiva associada à terapêutica com inibidores de “checkpoint”. Embora os resultados tenham sido negativos,

registaram-se, em todos os 12 doentes em que ocorreu a perda, de pelo menos 1 destes biomarcadores.

Os nossos resultados, bem como muitos outros que se encontram publicados, confirmam a existência de limitações associadas à utilização de IHC. Como tal, entende-se, com facilidade, que marcadores avaliados por IHC, não representem uma ferramenta preditiva suficientemente robusta para uma utilização clínica quotidiana. Não obstante, a IHC continua a representar um modelo atrativo em termos investigacionais. Para isso contribuem uma metodologia relativamente simples e os custos contidos. Pelo menos, enquanto se espera uma maior democratização de metodologias de maior resolução e débito.

Em termos genéticos, a escolha recaiu sobre o SChLAP1, devido à robustez, e carácter inovador, dos dados que o associam aos TP. São vários os trabalhos (quadro 9), de grande dimensão, que mostram a importância do SChLAP1 enquanto factor prognóstico^{356,361–363,365}. Infelizmente, na nossa amostra, nem o SChLAP1 quantificado no tecido tumoral, nem o SChLAP1 quantificado em tecido não neoplásico, foram factores preditivos de RQB. Contudo o nível de SChLAP1 no tecido tumoral foi, significativamente, mais elevado do que o nível de SChLAP1 em tecido não tumoral. Na nossa opinião a principal razão para este resultado negativo passa pela dimensão muito pequena do subgrupo em que este biomarcador foi avaliado. A confirmá-lo, está o facto de uma análise posterior, em que se incluíram mais 10 doentes, ter mostrado que existe uma relação entre o aumento do nível de SChLAP1 no tecido tumoral e a ocorrência de RBQ (dados não publicados).

6. CONCLUSÕES, LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo teve por finalidade, tentar compreender quais os factores implicados na recorrência do carcinoma da próstata localizado, após tratamento com cirurgia de intuito curativo. De entre os vários factores que podem estar implicados na recorrência, a nosso ver, assumem particular importância teórica os que estão relacionados com a transição epitelial-mesenquimatosa. Este fenómeno biológico complexo, confere às células neoplásicas características que poderiam ajudar a explicar a recorrência e a progressão tumoral.

Numa amostra populacional com 147 doentes, em que se avaliou quase 50 variáveis independentes, este trabalho permitiu chegar às seguintes conclusões, que em seguida se descrevem.

- Vários factores clínicos, anatomopatológicos e um molecular estão associados, de modo estatisticamente significativo, ao aumento do risco de RBQ (PSA pré-operatório, tipo de cirurgia, score de Gleason da biópsia e da lesão índice, classificação de Epstein da biópsia da peça e da lesão índice, número de fragmentos de biópsia envolvidos por tumor, extensão do envolvimento tumoral dos fragmentos de biópsia, em milímetros e percentualmente, presença de diferenciação intraductal, presença de padrão terciário, dimensão linear da lesão índice, margem cirúrgica positiva, existência de extensão extraprostática, invasão vascular, invasão das vesículas seminais, número de gânglios isolados em doentes submetidos a linfadenectomia, estágio patológico referente ao tumor primário e perda de expressão de caderina E).
- Em análise multivariável, o subtipo histológico observado na peça operatória, a classificação de Epstein observada na lesão índice, a existência de invasão vascular na peça operatória e o número de gânglios linfáticos isolados em doentes submetidos a linfadenectomia, mantiveram a significância estatística. O resultado referente à perda da caderina E, embora significativo do ponto de vista estatístico, apresenta uma validade limitada.
- O nosso trabalho permitiu identificar alguns aspetos relativamente inovadores:
 - A relação entre ocorrência de RBQ e a Classificação de Epstein determinada na lesão índice.

- A relação entre ocorrência de RBQ e a existência de diferenciação intraductal na peça operatória.
- A relação entre ocorrência de RBQ e o número de gânglios linfáticos isolados, em doentes submetidos a linfadenectomia.
- Embora apenas em análise univariável, os resultados sugerem a existência de relação entre a extensão linear da lesão índice e a ocorrência de RBQ.

A literatura publicada referente a estes factores preditivos específicos é limitada e nem sempre concordante. Em relação à classificação de Epstein da lesão índice, parece mesmo ser inexistente. Daí a nossa decisão de escrever o artigo intitulado “Grade Group and Other Pathologic Features as Predictors of Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy“, já submetido para publicação.

- Ainda em relação às variáveis anatomopatológicas, o nosso trabalho sugere a superioridade, em termos de impacto preditivo, da diferenciação avaliada na lesão índice em relação à mesma determinada na totalidade da peça operatória.
- De entre as variáveis moleculares associadas a TEM, demonstrou-se que a perda de expressão de caderina E, está associada à ocorrência de RBQ. Este achado sugere que, na nossa população, a TEM poderá estar associada à RBQ. Não obstante, todos os restantes marcadores de TEM (caderina N e Vimentina), quer isoladamente quer em conjunto (“marcadores de TEM”), não terem atingido significado estatístico.
- As restantes variáveis moleculares, determinadas por IHC (SOX2, OCT4, ERG, p53, Ki67, PTEN, PMS2, MSH6, MLH1, MSH2, marcadores de potencial estaminal e marcadores de reparação de ADN), na nossa amostra, não estão relacionadas com a ocorrência de RBQ.
- A quantificação de SCHLAP1, quer no tecido tumoral quer no tecido normal, não está associado a RBQ. Na nossa amostra há uma diferença estatisticamente significativa, entre o nível de SCHLAP1 no tecido tumoral e no tecido normal.

O que foi semeado, como um sonho, acabou por frutificar, após diversas dificuldades, sob o signo de variadas limitações. À semelhança do que se passa com vários outros trabalhos da mesma índole, o presente projeto foi vincado, indelevelmente, por constrangimentos de tempo e de recursos económicos. Em

termos concretos, consideramos que o presente projeto apresenta as limitações que em seguida se descrevem.

- O tamanho da amostra é limitado, quando considerada a literatura publicada acerca de factores preditivos e prognósticos nos TP localizados.
- O seguimento foi limitado. Esta contingência resulta do facto de a Fundação Champalimaud ser uma instituição recente, em que os doentes começaram a ser tratados em 2012.
- A recorrência bioquímica não representa um “endpoint” perfeito. Teria sido preferível ter usar outros “endpoints” mais robustos. No entanto, o seguimento curto não o permitiu. Todavia, deve levar-se em conta que, uma recorrência bioquímica mais precoce, parece estar associada a um pior prognóstico.
- A pequena dimensão da nossa amostra é responsável, a nosso ver, por não se conseguir valorizar, com maior consistência, os resultados da análise multivariável referentes à classificação de Epstein da LI e à perda de expressão da caderina E.
- Os resultados, maioritariamente negativos dos marcadores estudados através de IHC. Este facto poderá ter várias explicações, sendo estas descritas em seguida. O tamanho limitado do subgrupo utilizado para esta análise. A possibilidade de erro que, embora possível, parece-nos improvável, devido ao cuidado colocado no treino e o ao acompanhamento muito próximo por parte do Professor Doutor António Lopez-Beltran. Outras possibilidades passam por limitações intrínsecas à própria IHC e pelo número limitado de marcadores que foram estudados. Por fim, e no que concerne à TEM, há que levar em linha de conta a noção de reversibilidade, de parcialidade e de especificidade celular/tecidual que lhe são inerentes. Ou seja, pode ocorrer ativação do programa de TEM, sem que sejam expressos, ou, são-no descontinuamente, os marcadores que foram avaliados neste projeto.
- Em termos do SCHLAP1 consideramos que os resultados foram negativos, devido à dimensão diminuta do subgrupo em que este parâmetro foi avaliado. A sugerir-lo está o facto de uma análise posterior, em que se incluíram mais 10 doentes,

ter mostrado que existe uma relação entre o aumento do nível de SChLAP1 no tecido tumoral e a ocorrência de RBQ (dados não publicados).

Uma vez terminado este projeto, não se pode deixar de enfatizar, a aprendizagem teórica, metodológica e “social” que o mesmo acarretou. Contudo, um dos aspetos mais atrativos de um projeto multidimensional como o nosso, são as possibilidades e perspectivas que se afiguram num futuro próximo e a médio prazo. Os resultados deste projeto permitem concluir que a nossa população apresenta características similares à de outras séries. Este facto permite validar a qualidade do trabalho clínico desenvolvido na nossa instituição e serve de base consistente para o desenvolvimento de investigações futuras.

Levando em consideração os nossos resultados, juntamente com cuidada revisão teórica, este projeto é terminado com uma noção, em muito reforçada, de que a TEM poderá explicar, pelo menos em parte, a recorrência dos TP. A nosso ver, o futuro imediato deveria passar pela identificação dos “aspetos” da TEM, que estão associados especificamente aos carcinomas da próstata. É impraticável procurar todas as facetas que podem estar associadas à TEM. É redutor tentar demonstrar, de modo avulso, apenas, algumas delas. Só assim será possível estabelecer com segurança a associação entre TEM e agressividade biológica dos TP. É nossa firme intenção, em conjugação com o grupo dos senhores Professores Doutores Alexandra Fernandes e Pedro Viana Baptista (Universidade Nova de Lisboa), avaliar a TEM através de marcadores genéticos, tirando partido da experiência deste grupo no estudo da TEM, em modelos caninos, e utilizando, para o efeito, a mesma população deste estudo, com a vantagem adicional de um maior período de seguimento.

Atendendo à robustez dos dados já publicados, referentes ao SChLAP1, é nossa intenção contribuir para o aumento dos casos a analisar e publicar os resultados. Tal como, idealmente, num futuro não muito longínquo, procurar a interceção entre SChLAP1 e TEM. Por fim, mas não menos importante, as possíveis implicações terapêuticas associadas à lesão índice, ao SChLAP1 e à TEM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. January 2018;a030361. doi:10.1101/cshperspect.a030361.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30. doi:10.3322/caac.21442.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027.
4. Oncológicas D. Portugal. 2014.
5. Wong MCS, Goggins WB, Wang HHX, et al. Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. *Eur Urol*. 2016;70(5):862-874. doi:10.1016/j.eururo.2016.05.043.
6. Financial Burden of Cancer Care | Cancer Trends Progress Report. https://progressreport.cancer.gov/after/economic_burden. Accessed April 22, 2018.
7. Stokes ME, Ishak J, Proskorovsky I, Black LK, Huang Y. Lifetime economic burden of prostate cancer. *BMC Health Serv Res*. 2011;11:349. doi:10.1186/1472-6963-11-349.
8. Grover SA, Coupal L, Zowall H, et al. The economic burden of prostate cancer in Canada: forecasts from the Montreal Prostate Cancer Model. *CMAJ*. 2000;162(7):987-992. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10763396>. Accessed April 21, 2018.
9. Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Sullivan R. Economic burden of cancer across the European Union: A population-based cost analysis. *Lancet Oncol*. 2013;14(12):1165-1174. doi:10.1016/S1470-2045(13)70442-X.
10. Burns RM, Leal J, Wolstenholme J, et al. The Burden of Healthcare Costs Associated with Prostate Cancer in Ireland. *Glob Reg Heal Technol Assess*. 2017;4(1):grhta.5000249. doi:10.5301/grhta.5000249.
11. Restelli U, Ceresoli GL, Croce D, et al. Economic burden of the management of metastatic castrate-resistant prostate cancer in Italy: a cost of illness study. *Cancer Manag Res*. 2017;Volume 9:789-800. doi:10.2147/CMAR.S148323.

12. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, et al. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naive men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(2):152-160. doi:10.1016/S1470-2045(14)71205-7.
13. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, et al. Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2013;368(2):138-148. doi:10.1056/NEJMoa1209096.
14. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1147-1154. doi:10.1016/S0140-6736(10)61389-X.
15. Berthold DR, Pond GR, Soban F, de Wit R, Eisenberger M, Tannock IF. Docetaxel Plus Prednisone or Mitoxantrone Plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer: Updated Survival in the TAX 327 Study. *J Clin Oncol.* 2008;26(2):242-245. doi:10.1200/JCO.2007.12.4008.
16. Scher HI, Fizazi K, Saad F, et al. Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. Cabot RC, Harris NL, Rosenberg ES, et al., eds. *N Engl J Med.* 2012;367(13):1187-1197. doi:10.1056/NEJMoa1207506.
17. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, et al. Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2014;371(5):424-433. doi:10.1056/NEJMoa1405095.
18. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, et al. Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2013;369(3):213-223. doi:10.1056/NEJMoa1213755.
19. Pollard ME, Moskowitz AJ, Diefenbach MA, Hall SJ. Cost-effectiveness analysis of treatments for metastatic castration resistant prostate cancer. *Asian J Urol.* 2017;4(1):37-43. doi:10.1016/j.ajur.2016.11.005.
20. Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol.* 2000;31(5):578-583. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10836297>. Accessed April 22, 2018.

21. Roghmann F, Antczak C, McKay RR, et al. The burden of skeletal-related events in patients with prostate cancer and bone metastasis. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2015;33(1):17.e9-17.e18. doi:10.1016/J.UROLONC.2014.09.010.
22. Satoh T, Ledesma D, Yoshihara N. The Economic Burden of Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer and Skeletal Related Events in Japanese University Hospitals. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(1):21-26. doi:10.22034/APJCP.2018.19.1.21.
23. De Rooij M, Nieuwboer W, Smit RNG, Witjes JA, Barentsz JO, Rovers MM. 630 The high economic burden of urinary incontinence after prostate cancer treatment. *Eur Urol Suppl*. 2015;14(2):e630-e630a. doi:10.1016/S1569-9056(15)60623-6.
24. Mariotto AB, Robin Yabroff K, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML. Projections of the Cost of Cancer Care in the United States: 2010-2020. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2011;103(2):117-128. doi:10.1093/jnci/djq495.
25. Grover SA, Zowall H, Coupal L, Krahn MD. Prostate cancer: 12. The economic burden. <http://www.cmaj.ca/content/cmaj/160/5/685.full.pdf>. Accessed April 21, 2018.
26. Ilic D, Evans SM, Allan CA, Jung JH, Murphy D, Frydenberg M. Laparoscopic and robotic-assisted versus open radical prostatectomy for the treatment of localised prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;9:CD009625. doi:10.1002/14651858.CD009625.pub2.
27. Bill-Axelson A, Holmberg L, Garmo H, et al. Radical Prostatectomy or Watchful Waiting in Early Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2014;370:932-942. doi:10.1056/NEJMoa1311593.
28. Bianco FJ, Scardino PT, Eastham JA. Radical prostatectomy: Long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function (?trifecta?). *Urology*. 2005;66(5):83-94. doi:10.1016/j.urology.2005.06.116.
29. Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC. Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am*. 2001;28(3):555-565. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590814>. Accessed June 17, 2017.

30. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural History of Progression After PSA Elevation Following Radical Prostatectomy. *JAMA*. 1999;281(17):1591. doi:10.1001/jama.281.17.1591.
31. Hull GW, Rabbani F, Abbas F, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT. Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol*. 2002;167(2 Pt 1):528-534. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792912>. Accessed June 17, 2017.
32. ROEHL KA, HAN M, RAMOS CG, ANTENOR JA V., CATALONA WJ. CANCER PROGRESSION AND SURVIVAL RATES FOLLOWING ANATOMICAL RADICAL RETROPUBIC PROSTATECTOMY IN 3,478 CONSECUTIVE PATIENTS: LONG-TERM RESULTS. *J Urol*. 2004;172(3):910-914. doi:10.1097/01.ju.0000134888.22332.bb.
33. Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, et al. Prostate cancer-specific mortality after radical prostatectomy for patients treated in the prostate-specific antigen era. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4300-4305. doi:10.1200/JCO.2008.18.2501.
34. Eggener SE, Scardino PT, Walsh PC, et al. PREDICTING FIFTEEN-YEAR CANCER-SPECIFIC MORTALITY BASED ON THE PATHOLOGICAL FEATURES OF PROSTATE CANCER. *J Urol J Urol*. 2011;185(3):869-875. doi:10.1016/j.juro.2010.10.057.
35. Sweeney C. The Development of Intermediate Clinical Endpoints in Cancer of the Prostate (ICECaP) ICECaP Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(12):261. doi:10.1093/jnci/djv261.
36. Wilson MK, Karakasis K, Oza AM. Outcomes and endpoints in trials of cancer treatment: the past, present, and future. *Lancet Oncol*. 2015;16(1):e32-e42. doi:10.1016/S1470-2045(14)70375-4.
37. Balk SP, Ko Y-J, Bubley GJ. Biology of Prostate-Specific Antigen. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):383-391. doi:10.1200/JCO.2003.02.083.
38. Simmons MN, Stephenson AJ, Klein EA. Natural History of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy: Risk Assessment for Secondary Therapy. 2007. doi:10.1016/j.eururo.2007.01.015.
39. Xie W, Regan MM, Buyse M, et al. Metastasis-Free Survival Is a Strong Surrogate of Overall Survival in Localized Prostate Cancer. *J Clin Oncol*.

- 2017;35(27):3097-3104. doi:10.1200/JCO.2017.73.9987.
40. Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, et al. Risk of Prostate Cancer–Specific Mortality Following Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. *JAMA*. 2005;294(4):433. doi:10.1001/jama.294.4.433.
 41. Antonarakis ES, Chen Y, Elsamanoudi SI, et al. Long-term overall survival and metastasis-free survival for men with prostate-specific antigen-recurrent prostate cancer after prostatectomy: analysis of the Center for Prostate Disease Research National Database. *BJU Int*. 2011;108(3):378-385. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09878.x.
 42. Holmberg L, Bill-Axelson A, Helgesen F, et al. A Randomized Trial Comparing Radical Prostatectomy with Watchful Waiting in Early Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(11):781-789. doi:10.1056/NEJMoa012794.
 43. Leventis AK, Shariat SF, Kattan MW, Butler EB, Wheeler TM, Slawin KM. Prediction of Response to Salvage Radiation Therapy in Patients With Prostate Cancer Recurrence After Radical Prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2001;19(4):1030-1039. doi:10.1200/JCO.2001.19.4.1030.
 44. Naya Y, Okihara K, Evans RB, Babaian RJ. Efficacy of prostatic fossa biopsy in detecting local recurrence after radical prostatectomy. *Urology*. 2005;66(2):350-355. doi:10.1016/j.urology.2005.03.014.
 45. Scattoni V, Montorsi F, Picchio M, et al. Diagnosis of local recurrence after radical prostatectomy. *BJU Int*. 2004;93(5):680-688. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009088>. Accessed November 17, 2017.
 46. Song DY, Thompson TL, Ramakrishnan V, et al. Salvage radiotherapy for rising or persistent PSA after radical prostatectomy. *Urology*. 2002;60(2):281-287. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12137827>. Accessed November 17, 2017.
 47. Oppenheimer DC, Weinberg EP, Hollenberg GM, Meyers SP. Multiparametric Magnetic Resonance Imaging of Recurrent Prostate Cancer. *J Clin Imaging Sci*. 2016;6:18. doi:10.4103/2156-7514.181494.
 48. Sandgren K, Westerlinck P, Jonsson JH, et al. Imaging for the Detection of Locoregional Recurrences in Biochemical Progression After Radical

- Prostatectomy—A Systematic Review. *Eur Urol Focus*. November 2017.
doi:10.1016/j.euf.2017.11.001.
49. Wieder H, Beer AJ, Holzapfel K, et al. 11C-choline PET/CT and whole-body MRI including diffusion-weighted imaging for patients with recurrent prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(39):66516-66527.
doi:10.18632/oncotarget.16227.
 50. Conde-Moreno AJ, Herrando-Parreño G, Muelas-Soria R, et al. Whole-body diffusion-weighted magnetic resonance imaging (WB-DW-MRI) vs choline-positron emission tomography-computed tomography (choline-PET/CT) for selecting treatments in recurrent prostate cancer. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(5):553-561. doi:10.1007/s12094-016-1563-4.
 51. Lindenberg ML, Turkbey B, Mena E, Choyke PL. Imaging Locally Advanced, Recurrent, and Metastatic Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(10):1415.
doi:10.1001/jamaoncol.2016.5840.
 52. Lindenberg L, Ahlman M, Turkbey B, Mena E, Choyke P. Advancement of MR and PET/MR in Prostate Cancer. *Semin Nucl Med*. 2016;46(6):536-543.
doi:10.1053/j.semnuclmed.2016.07.001.
 53. Freedland SJ, Bryan Rumble R, Finelli A, et al. Adjuvant and Salvage Radiotherapy After Prostatectomy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement. 2014.
doi:10.1200/JCO.2014.58.8525.
 54. Stephenson AJ, Scardino PT, Kattan MW, et al. Predicting the Outcome of Salvage Radiation Therapy for Recurrent Prostate Cancer After Radical Prostatectomy. *J Clin Oncol*. 2007;25(15):2035-2041.
doi:10.1200/JCO.2006.08.9607.
 55. Stephenson AJ, Shariat SF, Zelefsky MJ, et al. Salvage Radiotherapy for Recurrent Prostate Cancer After Radical Prostatectomy. *JAMA*. 2004;291(11):1325. doi:10.1001/jama.291.11.1325.
 56. Goenka A, Magsanoc JM, Pei X, et al. Long-Term Outcomes After High-Dose Postprostatectomy Salvage Radiation Treatment. *Int J Radiat Oncol*. 2012;84(1):112-118. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.10.077.
 57. Briganti A, Karnes RJ, Joniau S, et al. Prediction of Outcome Following Early

- Salvage Radiotherapy Among Patients with Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. *Eur Urol*. 2014;66(3):479-486.
doi:10.1016/j.eururo.2013.11.045.
58. Shipley WU, Seiferheld W, Lukka HR, et al. Radiation with or without Antiandrogen Therapy in Recurrent Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2017;376(5):417-428. doi:10.1056/NEJMoa1607529.
59. Pfister D, Bolla M, Briganti A, et al. Early Salvage Radiotherapy Following Radical Prostatectomy. *Eur Urol*. 2014;65(6):1034-1043.
doi:10.1016/j.eururo.2013.08.013.
60. Bartkowiak D, Bottke D, Thamm R, Siegmann A, Hinkelbein W, Wiegel T. The PSA-response to salvage radiotherapy after radical prostatectomy correlates with freedom from progression and overall survival. *Radiother Oncol*. 2016;118(1):131-135. doi:10.1016/j.radonc.2015.10.028.
61. Blanchard P, Bakkour M, De Crevoisier R, et al. Early PSA level decline is an independent predictor of biochemical and clinical control for salvage postprostatectomy radiotherapy. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2015;33(3):108.e15-108.e20. doi:10.1016/j.urolonc.2014.07.020.
62. Turner II RM, Yabes JG, Woldemichael E, et al. Prognostic implications of immediate PSA response to early salvage radiotherapy. *Can J Urol*. 2016;23(6):8568-8575. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995853>. Accessed August 10, 2018.
63. Macdonald OK, Schild SE, Vora SA, et al. Salvage radiotherapy for palpable, locally recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. *Int J Radiat Oncol*. 2004;58(5):1530-1535. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.09.082.
64. Choo R, Hruby G, Hong J, et al. (IN)-efficacy of salvage radiotherapy for rising PSA or clinically isolated local recurrence after radical prostatectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;53(2):269-276.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023129>. Accessed August 10, 2018.
65. Santis D, Henry A, Joniau S, et al. Prostate Cancer EAU -ESTRO -SIOG Guidelines on. 2017. <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Prostate-Cancer-2016.pdf>. Accessed November 25, 2017.
66. Freedland SJ, Rumble RB, Finelli A, et al. Adjuvant and salvage radiotherapy

- after prostatectomy: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. *J Clin Oncol*. 2014;32(34):3892-3898. doi:10.1200/JCO.2014.58.8525.
67. Murchie Thompson I, Valicenti R, Albertsen PC, et al. *American Urological Association (AUA) Guideline ADJUVANT AND SALVAGE RADIOTHERAPY AFTER PROSTATECTOMY: ASTRO/AUA GUIDELINE.*; 2013. https://www.astro.org/uploadedFiles/_MAIN_SITE/Patient_Care/Clinical_Practice_Statements/Content_Pieces/RadiationAfterProstatectomy.pdf. Accessed August 11, 2018.
 68. Messing EM, Manola J, Yao J, et al. Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. *Lancet Oncol*. 2006;7(6):472-479. doi:10.1016/S1470-2045(06)70700-8.
 69. Fakhrejahani F, Madan RA, Dahut WL. Management Options for Biochemically Recurrent Prostate Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(5):26. doi:10.1007/s11864-017-0462-4.
 70. Duchesne GM, Woo HH, Bassett JK, et al. Timing of androgen-deprivation therapy in patients with prostate cancer with a rising PSA (TROG 03.06 and VCOG PR 01-03 [TOAD]): a randomised, multicentre, non-blinded, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):727-737. doi:10.1016/S1470-2045(16)00107-8.
 71. Antonarakis ES, Feng Z, Trock BJ, et al. The natural history of metastatic progression in men with prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy: long-term follow-up. *BJU Int*. 2012;109(1):32-39. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10422.x.
 72. Antonarakis ES, Zahurak ML, Lin J, Keizman D, Carducci MA, Eisenberger MA. Changes in PSA kinetics predict metastasis-free survival in men with PSA-recurrent prostate cancer treated with nonhormonal agents. *Cancer*. 2012;118(6):1533-1542. doi:10.1002/cncr.26437.
 73. Crook JM, O'Callaghan CJ, Duncan G, et al. Intermittent Androgen Suppression for Rising PSA Level after Radiotherapy. *N Engl J Med*. 2012;367(10):895-903. doi:10.1056/NEJMoa1201546.
 74. Cookson MS, Aus G, Burnett AL, et al. Variation in the Definition of

- Biochemical Recurrence in Patients Treated for Localized Prostate Cancer: The American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel Report and Recommendations for a Standard in the Reporting of Surgical Outcomes. *J Urol*. 2007;177(2):540-545.
doi:10.1016/j.juro.2006.10.097.
75. Lee RJ, Armstrong AJ, Victor AD, et al. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Prostate Cancer*.; 2018.
https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf.
Accessed August 11, 2018.
 76. Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, et al. Defining Biochemical Recurrence of Prostate Cancer After Radical Prostatectomy: A Proposal for a Standardized Definition. *J Clin Oncol*. 2006;24(24):3973-3978.
doi:10.1200/JCO.2005.04.0756.
 77. Mir MC, Li J, Klink JC, Kattan MW, Klein EA, Stephenson AJ. Optimal Definition of Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy Depends on Pathologic Risk Factors: Identifying Candidates for Early Salvage Therapy. *Eur Urol*. 2014;66(2):204-210. doi:10.1016/j.eururo.2013.08.022.
 78. Morgan TM, Meng M V., Cooperberg MR, et al. A risk-adjusted definition of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2014;17(2):174-179. doi:10.1038/pcan.2014.5.
 79. Walz J, Chun FK-H, Klein EA, et al. Nomogram Predicting the Probability of Early Recurrence After Radical Prostatectomy for Prostate Cancer. *J Urol*. 2009;181(2):601-608. doi:10.1016/j.juro.2008.10.033.
 80. Chang SL, Freedland SJ, Terris MK, et al. Freedom From a Detectable Ultrasensitive Prostate-specific Antigen at Two Years After Radical Prostatectomy Predicts a Favorable Clinical Outcome: Analysis of the SEARCH Database. *Urology*. 2010;75(2):439-444. doi:10.1016/j.urology.2009.06.089.
 81. Hanlon AL, Diratzouian H, Hanks GE. Posttreatment prostate-specific antigen nadir highly predictive of distant failure and death from prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;53(2):297-303.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023133>. Accessed August 12, 2018.
 82. Buyyounouski MK, Hanlon AL, Horwitz EM, Pollack A. Interval to Biochemical

- Failure Highly Prognostic for Distant Metastasis and Prostate Cancer-Specific Mortality After Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol*. 2008;70(1):59-66. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.05.047.
83. Bolton DM, Ta A, Bagnato M, et al. Interval to biochemical recurrence following radical prostatectomy does not affect survival in men with low-risk prostate cancer. *World J Urol*. 2014;32(2):431-435. doi:10.1007/s00345-013-1125-0.
84. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*. 1981;2(1):35-49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7279811>. Accessed August 12, 2018.
85. Fine SW, Reuter VE. Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. *Histopathology*. 2012;60(1):142-152. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04004.x.
86. Ayala AG, Ro JY, Babaian R, Troncoso P, Grignon DJ. The prostatic capsule: does it exist? Its importance in the staging and treatment of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1989;13(1):21-27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2909195>. Accessed May 11, 2014.
87. Shariat SF, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Kattan MW. An updated catalog of prostate cancer predictive tools. *Cancer*. 2008;113(11):3075-3099. doi:10.1002/cncr.23908.
88. Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. *Urology*. 2001;58(6):843-848. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744442>. Accessed August 14, 2018.
89. Eifler JB, Feng Z, Lin BM, et al. An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011. *BJU Int*. 2013;111(1):22-29. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11324.x.
90. D'Amico A V, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998;280(11):969-974. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749478>. Accessed March 20, 2014.
91. Sanda MG, Cadeddu JA, Kirkby E, et al. Clinically Localized Prostate Cancer:

- AUA/ASTRO/SUO Guideline. Part I: Risk Stratification, Shared Decision Making, and Care Options. *J Urol*. 2018;199(3):683-690.
doi:10.1016/j.juro.2017.11.095.
92. Cooperberg MR. Clinical risk-stratification for prostate cancer: Where are we, and where do we need to go? *Can Urol Assoc J*. 2017;11(3-4):101-102.
doi:10.5489/cuaj.4520.
 93. Reese AC, Pierorazio PM, Han M, Partin AW. Contemporary Evaluation of the National Comprehensive Cancer Network Prostate Cancer Risk Classification System. *Urology*. 2012;80(5):1075-1079. doi:10.1016/j.urology.2012.07.040.
 94. Brajtbord JS, Leapman MS, Cooperberg MR. The CAPRA Score at 10 Years: Contemporary Perspectives and Analysis of Supporting Studies. *Eur Urol*. 2017;71(5):705-709. doi:10.1016/j.eururo.2016.08.065.
 95. Suardi N, Porter CR, Reuther AM, et al. A nomogram predicting long-term biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Cancer*. 2008;112(6):1254-1263. doi:10.1002/cncr.23293.
 96. Kattan MW, Vickers AJ, Yu C, et al. Preoperative and postoperative nomograms incorporating surgeon experience for clinically localized prostate cancer. *Cancer*. 2009;115(5):1005-1010. doi:10.1002/cncr.24083.
 97. Antenor JA V., Roehl KA, Eggener SE, Kundu SD, Han M, Catalona WJ. Preoperative PSA and progression-free survival after radical prostatectomy for Stage T1c disease. *Urology*. 2005;66(1):156-160.
doi:10.1016/j.urology.2005.01.008.
 98. Ozden C, Aktas BK, Bulut S, et al. Effect of age on biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Kaohsiung J Med Sci*. 2017;33(2):91-95.
doi:10.1016/J.KJMS.2016.11.002.
 99. Gandaglia G, Karakiewicz PI, Abdollah F, et al. The effect of age at diagnosis on prostate cancer mortality: A grade-for-grade and stage-for-stage analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2014;40(12):1706-1715. doi:10.1016/J.EJSO.2014.05.001.
 100. Tan L, Wang LL, Ranasinghe W, et al. Survival outcomes of younger men (. *Prostate Int*. 2018;6(1):31-35. doi:10.1016/J.PRNIL.2017.07.002.
 101. Gandaglia G, Sammon JD, Chang SL, et al. Comparative effectiveness of robot-assisted and open radical prostatectomy in the postdissemination era. *J Clin*

- Oncol.* 2014;32(14):1419-1426. doi:10.1200/JCO.2013.53.5096.
102. Herlemann A, Cowan JE, Carroll PR, Cooperberg MR. Community-based Outcomes of Open versus Robot-assisted Radical Prostatectomy. *Eur Urol.* May 2017. doi:10.1016/j.eururo.2017.04.027.
 103. Tewari A, Sooriakumaran P, Bloch DA, Seshadri-Kreaden U, Hebert AE, Wiklund P. Positive Surgical Margin and Perioperative Complication Rates of Primary Surgical Treatments for Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis Comparing Retropubic, Laparoscopic, and Robotic Prostatectomy. *Eur Urol.* 2012;62(1):1-15. doi:10.1016/j.eururo.2012.02.029.
 104. Sooriakumaran P, John M, Wiklund P, Lee D, Nilsson A, Tewari AK. Learning curve for robotic assisted laparoscopic prostatectomy: a multi-institutional study of 3794 patients. *Minerva Urol Nefrol.* 2011;63(3):191-198. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993317>. Accessed November 17, 2017.
 105. Klein EA, Bianco FJ, Serio AM, et al. Surgeon Experience is Strongly Associated With Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy for All Preoperative Risk Categories. *J Urol.* 2008;179(6):2212-2217. doi:10.1016/j.juro.2008.01.107.
 106. Vickers AJ, Bianco FJ, Serio AM, et al. The Surgical Learning Curve for Prostate Cancer Control After Radical Prostatectomy. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2007;99(15):1171-1177. doi:10.1093/jnci/djm060.
 107. Vickers AJ, Savage CJ, Hruza M, et al. The surgical learning curve for laparoscopic radical prostatectomy: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):475-480. doi:10.1016/S1470-2045(09)70079-8.
 108. Fossati N, Rossi MS, Cucchiara V, et al. Evaluating the effect of time from prostate cancer diagnosis to radical prostatectomy on cancer control: Can surgery be postponed safely? *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2017;35(4):150.e9-150.e15. doi:10.1016/j.urolonc.2016.11.010.
 109. Vickers AJ, Bianco FJ, Boorjian S, Scardino PT, Eastham JA, Eastham JA. Does a delay between diagnosis and radical prostatectomy increase the risk of disease recurrence? *Cancer.* 2006;106(3):576-580. doi:10.1002/cncr.21643.
 110. Boorjian SA, Bianco FJ, Scardino PT, Eastham JA. Urological Oncology. Does

- the time from biopsy to surgery affect biochemical recurrence after radical prostatectomy? *BJU Int.* 2005;96(6):773-776. doi:10.1111/j.1464-410X.2005.05763.x.
111. Eggener SE, Yossepowitch O, Serio AM, Vickers AJ, Scardino PT, Eastham JA. Radical Prostatectomy Shortly After Prostate Biopsy Does Not Affect Operative Difficulty or Efficacy. *Urology.* 2007;69(6):1128-1133. doi:10.1016/j.urology.2007.01.089.
 112. LEE DK, ALLAREDDY V, O'DONNELL MA, WILLIAMS RD, KONETY BR. Does the interval between prostate biopsy and radical prostatectomy affect the immediate postoperative outcome? *BJU Int.* 2006;97(1):48-50. doi:10.1111/j.1464-410X.2006.05861.x.
 113. Gacci M, Russo GI, De Nunzio C, et al. Meta-analysis of metabolic syndrome and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017;20(2):146-155. doi:10.1038/pcan.2017.1.
 114. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* 1992;23(3):273-279. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1555838>. Accessed August 17, 2018.
 115. Santoni M, Scarpelli M, Mazzucchelli R, et al. Current Histopathologic and Molecular Characterisations of Prostate Cancer: Towards Individualised Prognosis and Therapies. *Eur Urol.* 2016;69(2):186-190. doi:10.1016/j.eururo.2015.05.041.
 116. Epstein JI, Amin MB, Reuter VE, Humphrey PA. Contemporary Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(4):e1-e7. doi:10.1097/PAS.0000000000000820.
 117. Matoso A, Epstein JI. Grading of Prostate Cancer: Past, Present, and Future. *Curr Urol Rep.* 2016;17(3):25. doi:10.1007/s11934-016-0576-4.
 118. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int.* 2013;111(5):753-760. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11611.x.
 119. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2016;69(3):428-435. doi:10.1016/j.eururo.2015.06.046.

120. Berney DM, Beltran L, Fisher G, et al. Validation of a contemporary prostate cancer grading system using prostate cancer death as outcome. *Br J Cancer*. 2016;114(10):1078-1083. doi:10.1038/bjc.2016.86.
121. Leapman MS, Cowan JE, Simko J, et al. Application of a Prognostic Gleason Grade Grouping System to Assess Distant Prostate Cancer Outcomes. *Eur Urol*. 2017;71(5):750-759. doi:10.1016/j.eururo.2016.11.032.
122. Dell'Oglio P, Karnes RJ, Gandaglia G, et al. The New Prostate Cancer Grading System Does Not Improve Prediction of Clinical Recurrence After Radical Prostatectomy: Results of a Large, Two-Center Validation Study. *Prostate*. 2017;77(3):263-273. doi:10.1002/pros.23265.
123. Herlemann A, Washington SL, Eapen RS, Cooperberg MR. Whom to Treat. *Urol Clin North Am*. 2017;44(4):547-555. doi:10.1016/j.ucl.2017.07.003.
124. Reese AC, Cowan JE, Brajtbord JS, Harris CR, Carroll PR, Cooperberg MR. The quantitative Gleason score improves prostate cancer risk assessment. *Cancer*. 2012;118(24):6046-6054. doi:10.1002/cncr.27670.
125. Deng F-M, Donin NM, Pe Benito R, et al. Size-adjusted Quantitative Gleason Score as a Predictor of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. *Eur Urol*. 2016;70(2):248-253. doi:10.1016/j.eururo.2015.10.026.
126. Sauter G, Clauditz T, Steurer S, et al. Integrating Tertiary Gleason 5 Patterns into Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. *Eur Urol*. 2018;73(5):674-683. doi:10.1016/j.eururo.2017.01.015.
127. Epstein JI. An Update of the Gleason Grading System. *J Urol*. 2010;183(2):433-440. doi:10.1016/j.juro.2009.10.046.
128. Lucca I, Shariat SF, Briganti A, et al. Validation of tertiary Gleason pattern 5 in Gleason score 7 prostate cancer as an independent predictor of biochemical recurrence and development of a prognostic model. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2015;33(2):71.e21-71.e26. doi:10.1016/j.urolonc.2014.08.011.
129. Kovi J, Jackson MA, Heshmat MY. Ductal spread in prostatic carcinoma. *Cancer*. 1985;56(7):1566-1573.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4027893>. Accessed August 17, 2018.
130. McNeal JE, Yemoto CE. Spread of adenocarcinoma within prostatic ducts and acini. Morphologic and clinical correlations. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(7):802-

814. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8669528>. Accessed August 17, 2018.
131. Watts K, Li J, Magi-Galluzzi C, Zhou M. Incidence and clinicopathological characteristics of intraductal carcinoma detected in prostate biopsies: a prospective cohort study. *Histopathology*. 2013;63(4):n/a-n/a. doi:10.1111/his.12198.
132. Gasparrini S, Cimadamore A, Mazzucchelli R, et al. Pathology and molecular updates in tumors of the prostate: towards a personalized approach. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(8):781-789. doi:10.1080/14737159.2017.1341314.
133. Robinson BD, Epstein JI. Intraductal Carcinoma of the Prostate Without Invasive Carcinoma on Needle Biopsy: Emphasis on Radical Prostatectomy Findings. *J Urol*. 2010;184(4):1328-1333. doi:10.1016/j.juro.2010.06.017.
134. Van der Kwast T, Al Daoud N, Collette L, et al. Biopsy diagnosis of intraductal carcinoma is prognostic in intermediate and high risk prostate cancer patients treated by radiotherapy. *Eur J Cancer*. 2012;48(9):1318-1325. doi:10.1016/j.ejca.2012.02.003.
135. Khani F, Epstein JI. Prostate Biopsy Specimens With Gleason 3+3=6 and Intraductal Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(10):1383-1389. doi:10.1097/PAS.0000000000000465.
136. Kimura K, Tsuzuki T, Kato M, et al. Prognostic value of intraductal carcinoma of the prostate in radical prostatectomy specimens. *Prostate*. 2014;74(6):680-687. doi:10.1002/pros.22786.
137. Chua MLK, Lo W, Pintilie M, et al. A Prostate Cancer “Nimbus”: Genomic Instability and SChLAP1 Dysregulation Underpin Aggression of Intraductal and Cribriform Subpathologies Associate Editor : 2017:1-10.
138. Zhao J, Shen P, Sun G, et al. The prognostic implication of intraductal carcinoma of the prostate in metastatic castration-resistant prostate cancer and its potential predictive value in those treated with docetaxel or abiraterone as first-line therapy. *Oncotarget*. 2017;8(33):55374-55383. doi:10.18632/oncotarget.19520.
139. Aggarwal R, Huang J, Alumkal JJ, et al. Clinical and Genomic Characterization of Treatment-Emergent Small-Cell Neuroendocrine Prostate Cancer: A Multi-

- institutional Prospective Study. *J Clin Oncol*. 2018;36(24):2492-2503.
doi:10.1200/JCO.2017.77.6880.
140. Beltran H, Tagawa ST, Park K, et al. Challenges in Recognizing Treatment-Related Neuroendocrine Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(36):e386-e389. doi:10.1200/JCO.2011.41.5166.
141. Epstein JI, Amin MB, Beltran H, et al. Proposed Morphologic Classification of Prostate Cancer With Neuroendocrine Differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(6):756-767. doi:10.1097/PAS.0000000000000208.
142. Humphrey PA. Tumor amount in prostatic tissues in relation to patient outcome and management. *Am J Clin Pathol*. 2009;131(1):7-10.
doi:10.1309/AJCPAU2KQURY6COY.
143. Harnden P, Shelley MD, Naylor B, Coles B, Mason MD. Does the Extent of Carcinoma in Prostatic Biopsies Predict Prostate-Specific Antigen Recurrence? A Systematic Review. *Eur Urol*. 2008;54(4):728-739.
doi:10.1016/j.eururo.2008.06.068.
144. Kopp RP, Stroup SP, Schroeck FR, et al. Are repeat prostate biopsies safe? A cohort analysis from the SEARCH database. *J Urol*. 2012;187(6):2056-2060.
doi:10.1016/j.juro.2012.01.083.
145. Lopez-Corona E, Ohori M, Wheeler TM, et al. Prostate cancer diagnosed after repeat biopsies have a favorable pathological outcome but similar recurrence rate. *J Urol*. 2006;175(3 Pt 1):923-7; discussion 927-8. doi:10.1016/S0022-5347(05)00350-2.
146. Aihara M, Wheeler TM, Ohori M, Scardino PT. Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology*. 1994;43(1):60-6; discussion 66-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284886>. Accessed November 26, 2017.
147. Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet*. 2015;47(7):736-745.
doi:10.1038/ng.3315.
148. Andreoiu M, Cheng L. Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Hum Pathol*. 2010;41(6):781-793.
doi:10.1016/j.humpath.2010.02.011.

149. Van Der Kwast TH, Amin MB, Billis A, et al. International society of urological pathology (ISUP) consensus conference on handling and staging of radical prostatectomy specimens. working group 2: T2 substaging and prostate cancer volume. *Mod Pathol.* 2011;24(1):16-25.
doi:10.1038/modpathol.2010.156.
150. McNeal JE, Price HM, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Stage A versus stage B adenocarcinoma of the prostate: morphological comparison and biological significance. *J Urol.* 1988;139(1):61-65.
151. Karavitakis M, Winkler M, Abel P, Livni N, Beckley I, Ahmed HU. Histological characteristics of the index lesion in whole-mount radical prostatectomy specimens: implications for focal therapy. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2011;14(1):46-52. doi:10.1038/pcan.2010.16.
152. Matsumoto K, Kanao K, Udo K, Al-ahmadie H, Chen Y, Gopalan A, Tickoo S, Reuter V FS. Characterizing the dominant/index lesion in prostate cancer: implications for grading and staging. *J Urol.* 2014;191(4):e415-e416.
153. RUIJTER ET, VAN DE KAA CA, SCHALKEN JA, DEBRUYNE FM, RUITER DJ. HISTOLOGICAL GRADE HETEROGENEITY IN MULTIFOCAL PROSTATE CANCER. BIOLOGICAL AND CLINICAL IMPLICATIONS. *J Pathol.* 1996;180(3):295-299.
doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199611)180:3<295::AID-PATH663>3.0.CO;2-W.
154. Arora R, Koch MO, Eble JN, Ulbright TM, Li L, Cheng L. Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer.* 2004;100(11):2362-2366. doi:10.1002/cncr.20243.
155. Huang CC, Deng F-M, Kong MX, Ren Q, Melamed J, Zhou M. Re-evaluating the concept of “dominant/index tumor nodule” in multifocal prostate cancer. *Virchows Arch.* 2014;464(5):589-594. doi:10.1007/s00428-014-1557-y.
156. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2015;40(2):1.
doi:10.1097/PAS.0000000000000530.
157. Wise AM, Stamey TA, McNeal JE, Clayton JL. Morphologic and clinical significance of multifocal prostate cancers in radical prostatectomy specimens. *Urology.* 2002;60(2):264-269.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12137824>. Accessed November 26, 2017.
158. Giannarini G, Gandaglia G, Montorsi F, Briganti A. Will focal therapy remain only an attractive illusion for the primary treatment of prostate cancer? *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1299-1301. doi:10.1200/JCO.2013.54.8214.
 159. Volavšek M, Blanca A, Montironi R, et al. Digital versus light microscopy assessment of surgical margin status after radical prostatectomy. *Virchows Arch*. 2018;472(3):451-460. doi:10.1007/s00428-018-2296-2.
 160. Adamis S, Varkarakis IM. Defining prostate cancer risk after radical prostatectomy. *Eur J Surg Oncol*. 2014;40(5):496-504. doi:10.1016/j.ejso.2014.02.221.
 161. Boorjian SA, Karnes RJ, Crispen PL, et al. The Impact of Positive Surgical Margins on Mortality Following Radical Prostatectomy During the Prostate Specific Antigen Era. *J Urol*. 2010;183(3):1003-1009. doi:10.1016/j.juro.2009.11.039.
 162. Chalfin HJ, Dinizo M, Trock BJ, et al. Impact of surgical margin status on prostate-cancer-specific mortality. *BJU Int*. 2012;110(11):1684-1689. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11371.x.
 163. Mauermann J, Fradet V, Lacombe L, et al. Platinum Priority – Prostate Cancer The Impact of Solitary and Multiple Positive Surgical Margins on Hard Clinical End Points in 1712 Adjuvant Treatment–Naive pT2–4 N0 Radical Prostatectomy Patients. 2012;6(1):9-2. doi:10.1016/j.eururo.2012.08.002.
 164. Pfitzenmaier J, Pahernik S, Tremmel T, Haferkamp A, Buse S, Hohenfellner M. Positive surgical margins after radical prostatectomy: do they have an impact on biochemical or clinical progression? *BJU Int*. 2008;0(0):080604043604044-??? doi:10.1111/j.1464-410X.2008.07791.x.
 165. Wright JL, Dalkin BL, True LD, et al. Positive Surgical Margins at Radical Prostatectomy Predict Prostate Cancer Specific Mortality. *J Urol*. 2010;183(6):2213-2218. doi:10.1016/j.juro.2010.02.017.
 166. Alkhateeb S, Alibhai S, Fleshner N, et al. Impact of Positive Surgical Margins After Radical Prostatectomy Differs by Disease Risk Group. *J Urol*. 2010;183(1):145-150. doi:10.1016/j.juro.2009.08.132.

167. Simon MA, Kim S, Soloway MS. Prostate Specific Antigen Recurrence Rates are Low After Radical Retropubic Prostatectomy and Positive Margins. *J Urol.* 2006;175(1):140-144. doi:10.1016/S0022-5347(05)00050-9.
168. Vis AN, Schröder FH, van der Kwast TH. The Actual Value of the Surgical Margin Status as a Predictor of Disease Progression in Men with Early Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2006;50(2):258-265. doi:10.1016/j.eururo.2005.11.030.
169. Sooriakumaran P, Dev HS, Skarecky D, Ahlering T. The importance of surgical margins in prostate cancer. *J Surg Oncol.* 2016;113(3):310-315. doi:10.1002/jso.24109.
170. Özkanlı SŞ, Zemher IE, Yildirim A, et al. Gleason score at the margin can predict biochemical recurrence after radical prostatectomy, in addition to preoperative PSA and surgical margin status. *Turkish J Med Sci.* 2014;44(3):397-403. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558640>. Accessed June 18, 2017.
171. Pennington JW, Prentiss RJ, Howe G. Radical prostatectomy for cancer: significance of perineural lymphatic invasion. *J Urol.* 1967;97(6):1075-1077. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6067543>. Accessed August 18, 2018.
172. Merrilees AD, Bethwaite PB, Russell GL, Robinson RG, Delahunt B. Parameters of perineural invasion in radical prostatectomy specimens lack prognostic significance. *Mod Pathol.* 2008;21(9):1095-1100. doi:10.1038/modpathol.2008.81.
173. Freeman A. Perineural and lymphovascular invasion on prostatic biopsy: Pathological assessment and significance. *Surg Oncol.* 2009;18(3):200-202. doi:10.1016/j.suronc.2009.02.010.
174. Egevad L, Delahunt B, Kristiansen G, Samaratunga H, Varma M. Contemporary prognostic indicators for prostate cancer incorporating International Society of Urological Pathology recommendations. *Pathology.* 2018;50(1):60-73. doi:10.1016/j.pathol.2017.09.008.
175. Zareba P, Flavin R, Isikbay M, et al. Perineural Invasion and Risk of Lethal Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26(5):719-726. doi:10.1158/1055-9965.EPI-16-0237.
176. Liebig C, Ayala G, Wilks J a, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a

- review of the literature. *Cancer*. 2009;115(15):3379-3391.
doi:10.1002/cncr.24396.
177. Fromont G, Godet J, Pires C, Yacoub M, Dore B, Irani J. Biological significance of perineural invasion (PNI) in prostate cancer. *Prostate*. 2012;72(5):542-548.
doi:10.1002/pros.21456.
178. Tomellini E, Touil Y, Lagadec C, et al. Nerve Growth Factor and proNGF Simultaneously Promote Symmetric Self-Renewal, Quiescence, and Epithelial to Mesenchymal Transition to Enlarge the Breast Cancer Stem Cell Compartment. *Stem Cells*. 2015;33(2):342-353. doi:10.1002/stem.1849.
179. Zuo J-H, Zhu W, Li M-Y, et al. Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem*. 2011;112(9):2508-2517. doi:10.1002/jcb.23175.
180. Chatterjee K, Jana S, DasMahapatra P, Swarnakar S. EGFR-mediated matrix metalloproteinase-7 up-regulation promotes epithelial–mesenchymal transition *via* ERK1-AP1 axis during ovarian endometriosis progression. *FASEB J*. 2018;32(8):4560-4572. doi:10.1096/fj.201701382RR.
181. Vizza D, Perri A, Toteda G, et al. Nerve growth factor exposure promotes tubular epithelial–mesenchymal transition *via* TGF- β 1 signaling activation. *Growth Factors*. 2015;33(3):169-180. doi:10.3109/08977194.2015.1054989.
182. Yuan Y, Ye H-Q, Ren Q-C. Upregulation of the BDNF/TrkB pathway promotes epithelial-mesenchymal transition, as well as the migration and invasion of cervical cancer. *Int J Oncol*. 2017;52(2):461-472. doi:10.3892/ijo.2017.4230.
183. Brooks JP, Albert PS, O’Connell J, McLeod DG, Poggi MM. Lymphovascular invasion in prostate cancer. *Cancer*. 2006;106(7):1521-1526.
doi:10.1002/cncr.21774.
184. Shariat SF, Khoddami SM, Saboorian H, et al. Lymphovascular invasion is a pathological feature of biologically aggressive disease in patients treated with radical prostatectomy. *J Urol*. 2004;171(3):1122-1127.
doi:10.1097/01.ju.0000113249.82533.28.
185. May M, Kaufmann O, Hammermann F, Loy V, Siegsmond M. Prognostic impact of lymphovascular invasion in radical prostatectomy specimens. *BJU Int*.

- 2007;99(3):539-544. doi:10.1111/j.1464-410X.2006.06650.x.
186. Huang Y, Huang H, Pan X-W, et al. The prognostic value of lymphovascular invasion in radical prostatectomy: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl.* 2016;18(5):780. doi:10.4103/1008-682X.156636.
187. Yee DS, Shariat SF, Lowrance WT, et al. Prognostic significance of lymphovascular invasion in radical prostatectomy specimens. *BJU Int.* 2011;108(4):502-507. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09848.x.
188. Thompson IM, Salem S, Chang SS, et al. Tumor volume as a predictor of adverse pathologic features and biochemical recurrence (BCR) in radical prostatectomy specimens: A tale of two methods. *World J Urol.* 2011;29(1):15-20. doi:10.1007/s00345-010-0611-x.
189. Kim KH, Lim SK, Shin T-Y, et al. Tumor volume adds prognostic value in patients with organ-confined prostate cancer. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(9):3133-3139. doi:10.1245/s10434-013-3016-4.
190. Billis A, Meirelles LR, Freitas LLL, et al. Prostate total tumor extent versus index tumor extent - Which is predictive of biochemical recurrence following radical prostatectomy? *J Urol.* 2013;189(1):99-104. doi:10.1016/j.juro.2012.08.179.
191. Meyer CP, Hansen J, Boehm K, et al. Tumor volume improves the long-term prediction of biochemical recurrence-free survival after radical prostatectomy for localized prostate cancer with positive surgical margins. *World J Urol.* 2016;im:199-206. doi:10.1007/s00345-016-1861-z.
192. Wolters T, Roobol MJ, van Leeuwen PJ, et al. Should Pathologists Routinely Report Prostate Tumour Volume? The Prognostic Value of Tumour Volume in Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2010;57(5):821-829. doi:10.1016/j.eururo.2009.07.027.
193. Porten SP, Cooperberg MR, Carroll PR. The independent value of tumour volume in a contemporary cohort of men treated with radical prostatectomy for clinically localized disease. *BJU Int.* 2010;105(4):472-475. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08774.x.
194. Castiglione F, Dell'Oglio P, Tosco L, et al. Tumor Volume and Clinical Failure in High-Risk Prostate Cancer Patients Treated With Radical Prostatectomy.

- Prostate*. 2017;77(1):3-9. doi:10.1002/pros.23242.
195. Amin, M.B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershenwald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., Jessup, J.M., Brierley, J.D., Gaspar, L.E., Schilsky, R.L., Balch, C.M. W. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer US; 2017.
 196. Fine SW. Evolution in Prostate Cancer Staging. *Adv Anat Pathol*. 2018;25(5):327-332. doi:10.1097/PAP.000000000000200.
 197. Epstein JI, Carmichael MJ, Pizov G, Walsh PC. Influence of capsular penetration on progression following radical prostatectomy: a study of 196 cases with long-term followup. *J Urol*. 1993;150(1):135-141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685422>. Accessed August 19, 2018.
 198. Sung M-T, Lin H, Koch MO, Davidson DD, Cheng L. Radial Distance of Extraprostatic Extension Measured by Ocular Micrometer is an Independent Predictor of Prostate-specific Antigen Recurrence. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(2):311-318. doi:10.1097/01.pas.0000213359.26003.37.
 199. Swanson GP, Basler JW. Prognostic factors for failure after prostatectomy. *J Cancer*. 2010;2:1-19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21197260>. Accessed August 19, 2018.
 200. Jeong BC, Chalfin HJ, Lee SB, et al. The Relationship Between the Extent of Extraprostatic Extension and Survival Following Radical Prostatectomy. *Eur Urol*. 2015;67(2):342-346. doi:10.1016/j.eururo.2014.06.015.
 201. Ball MW, Partin AW, Epstein JI. Extent of Extraprostatic Extension Independently Influences Biochemical Recurrence-free Survival: Evidence for Further pT3 Subclassification. *Urology*. 2015;85(1):161-164. doi:10.1016/j.urology.2014.08.025.
 202. Ohori M, Scardino PT, Lapin SL, Seale-Hawkins C, Link J, Wheeler TM. The mechanisms and prognostic significance of seminal vesicle involvement by prostate cancer. *Am J Surg Pathol*. 1993;17(12):1252-1261. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238732>. Accessed August 19, 2018.
 203. Ravery V, Boccon-Gibod LA, Meulemans A, Dauge-Geffroy MC, Toubanc M, Boccon-Gibod L. Predictive value of pathological features for progression after radical prostatectomy. *Eur Urol*. 1994;26(3):197-201.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528660>. Accessed July 2, 2017.
204. Epstein JI, Carmichael M, Walsh PC. Adenocarcinoma of the prostate invading the seminal vesicle: definition and relation of tumor volume, grade and margins of resection to prognosis. *J Urol*. 1993;149(5):1040-1045.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8483205>. Accessed July 2, 2017.
205. Abdollah F, Suardi N, Gallina A, et al. Extended pelvic lymph node dissection in prostate cancer: a 20-year audit in a single center. *Ann Oncol*. 2013;24(6):1459-1466. doi:10.1093/annonc/mdt120.
206. Bernstein AN, Shoag JE, Golan R, et al. Contemporary Incidence and Outcomes of Prostate Cancer Lymph Node Metastases. *J Urol*. 2018;199(6):1510-1517. doi:10.1016/j.juro.2017.12.048.
207. Gervasi LA, Mata J, Easley JD, et al. Prognostic significance of lymph nodal metastases in prostate cancer. *J Urol*. 1989;142(2 Pt 1):332-336.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2501518>. Accessed August 20, 2018.
208. Catalona WJ, Smith DS. Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical retropubic prostatectomy for prostate cancer: intermediate-term results. *J Urol*. 1998;160(6 Pt 2):2428-2434.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817397>. Accessed August 20, 2018.
209. Touijer KA, Mazzola CR, Sjoberg DD, Scardino PT, Eastham JA. Long-term Outcomes of Patients with Lymph Node Metastasis Treated with Radical Prostatectomy Without Adjuvant Androgen-deprivation Therapy. *Eur Urol*. 2014;65(1):20-25. doi:10.1016/j.eururo.2013.03.053.
210. Gugliemetti G, Sukhu R, Conca Baenas MA, et al. Número de ganglios linfáticos metastásicos como determinante de los resultados de la prostatectomía radical de rescate en el cáncer de próstata de recidivante tras radioterapia. *Actas Urológicas Españolas*. 2016;40(7):434-439. doi:10.1016/j.acuro.2016.02.008.
211. Carlsson S V., Tafe LJ, Chade DC, et al. Pathological Features of Lymph Node Metastasis for Predicting Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy for Prostate Cancer. *J Urol*. 2013;189(4):1314-1319. doi:10.1016/j.juro.2012.10.027.
212. Moris L, Van den Broeck T, Tosco L, et al. Impact of Lymph Node Burden on

- Survival of High-risk Prostate Cancer Patients Following Radical Prostatectomy and Pelvic Lymph Node Dissection. *Front Surg*. 2016;3:65.
doi:10.3389/fsurg.2016.00065.
213. Luchini C, Fleischmann A, Boormans JL, et al. Extranodal extension of lymph node metastasis influences recurrence in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):2374. doi:10.1038/s41598-017-02577-4.
214. Wong SL. Lymph node counts and survival rates after resection for colon and rectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2009;3(2 Suppl):S33-5.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461921>. Accessed October 6, 2018.
215. Maccio L, Barresi V, Domati F, et al. Clinical significance of pelvic lymph node status in prostate cancer: review of 1690 cases. *Intern Emerg Med*. 2016;11(3):399-404. doi:10.1007/s11739-015-1375-5.
216. Mandel P, Kriegmair MC, Bogdan K, et al. Association between Lymph Node Counts and Oncological Outcomes in Lymph Node Positive Prostate Cancer. *Eur Urol Focus*. 2017;3(2-3):248-255. doi:10.1016/j.euf.2016.02.018.
217. Huber F, Montani M, Sulser T, et al. Comprehensive validation of published immunohistochemical prognostic biomarkers of prostate cancer - What has gone wrong? A blueprint for the way forward in biomarker studies. *Br J Cancer*. 2015;112(1):140-148. doi:10.1038/bjc.2014.588.
218. Zhao L, Yu N, Guo T, et al. Tissue Biomarkers for Prognosis of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(6):1047-1054. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0696.
219. van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):121-134. doi:10.1038/nrc3647.
220. Gall TMH, Frampton AE. Gene of the month: E-cadherin (*CDH1*). *J Clin Pathol*. 2013;66(11):928-932. doi:10.1136/jclinpath-2013-201768.
221. Pernick N. Pathology Outlines - E-cadherin.
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsecadherin.html>. Accessed August 24, 2018.
222. Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, Fecko A, Pienta KJ, Day ML. E-cadherin expression in prostate cancer: A broad survey using high-density tissue microarray technology. *Hum Pathol*. 2001;32(7):690-697.

- doi:10.1053/hupa.2001.25902.
223. Abdelrahman AE, Arafa SA, Ahmed RA. Prognostic value of twist-1, e-cadherin and ezh2 in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Turkish J Pathol.* 2017;1(1):198-210. doi:10.5146/tjpath.2016.01392.
224. De Marzo AM, Knudsen B, Chan-Tack K, Epstein JI. E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. *Urology.* 1999;53(4):707-713.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10197845>. Accessed January 21, 2018.
225. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A Switch from E-Cadherin to N-Cadherin Expression Indicates Epithelial to Mesenchymal Transition and Is of Strong and Independent Importance for the Progress of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(23):7003-7011. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1263.
226. Junior JP, Srougi M, Borra PMA, Dall' Oglia MF, Ribeiro-Filho LA, Leite KRM. E-cadherin and β -catenin Loss of Expression Related to Bone Metastasis in Prostate Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18(2):179-184. doi:10.1097/PAI.0b013e3181640bca.
227. Putzke AP, Ventura AP, Bailey AM, et al. Metastatic Progression of Prostate Cancer and E-Cadherin. *Am J Pathol.* 2011;179(1):400-410. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.028.
228. Wang M, Liu X, Jiang G, Chen H, Guo J, Weng X. Relationship between LSD1 expression and E-cadherin expression in prostate cancer. *Int Urol Nephrol.* 2015;47(3):485-490. doi:10.1007/s11255-015-0915-2.
229. Liu G-L, Yang H-J, Liu T, Lin Y-Z. Expression and significance of E-cadherin, N-cadherin, transforming growth factor- β 1 and Twist in prostate cancer. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(1):76-82. doi:10.1016/S1995-7645(13)60196-0.
230. Luo Y, Yu T, Zhang Q, et al. Upregulated N-cadherin expression is associated with poor prognosis in epithelial-derived solid tumours: A meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(4):e12903. doi:10.1111/eci.12903.
231. Nalla AK, Estes N, Patel J, Rao JS. N-cadherin mediates angiogenesis by regulating monocyte chemoattractant protein-1 expression via PI3K/Akt signaling in prostate cancer cells. *Exp Cell Res.* 2011;317(17):2512-2521.

- doi:10.1016/j.yexcr.2011.07.024.
232. Drivalos A, Chrisofos M, Efstathiou E, et al. Expression of α 5-integrin, α 7-integrin, E-cadherin, and N-cadherin in localized prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2016;34(4):165.e11-165.e18.
doi:10.1016/j.urolonc.2015.10.016.
233. Liu G-L, Yang H-J, Liu T, Lin Y-Z. Expression and significance of E-cadherin, N-cadherin, transforming growth factor- β 1 and Twist in prostate cancer. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(1):76-82. doi:10.1016/S1995-7645(13)60196-0.
234. Jaggi M, Nazemi T, Abrahams NA, et al. N-cadherin switching occurs in high Gleason grade prostate cancer. *Prostate*. 2006;66(2):193-199.
doi:10.1002/pros.20334.
235. Jennbacken K, Tesan T, Wang W, Gustavsson H, Damber JE, Welen K. N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(2):469-479.
doi:10.1677/ERC-10-0015.
236. Tanaka H, Kono E, Tran CP, et al. Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat Med*. 2010;16(12):1414-1420. doi:10.1038/nm.2236.
237. Hol EM, Capetanaki Y. Type III Intermediate Filaments Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin, and Peripherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(12):a021642. doi:10.1101/cshperspect.a021642.
238. Yin S, Chen F, Yang G. Vimentin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: A meta-analysis. *Pathol - Res Pract*. 2018;214(9):1376-1380. doi:10.1016/j.prp.2018.07.014.
239. Wu K, Zeng J, Zhu G, et al. Silibinin inhibits prostate cancer invasion, motility and migration by suppressing vimentin and MMP-2 expression. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30(8):1162-1168. doi:10.1038/aps.2009.94.
240. Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct*. 2008;26(5):571-577.
doi:10.1002/cbf.1478.
241. Wei J, Xu G, Wu M, et al. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. *Anticancer Res*. 28(1A):327-

334. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18383865>. Accessed August 25, 2018.
242. Zhang Q, Helfand BT, Jang TL, et al. Nuclear factor-kappaB-mediated transforming growth factor-beta-induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(10):3557-3567. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1656.
243. Satelli A, Batth I, Brownlee Z, et al. EMT circulating tumor cells detected by cell-surface vimentin are associated with prostate cancer progression. *Oncotarget*. 2017;8(30):49329-49337. doi:10.18632/oncotarget.17632.
244. Burch TC, Watson MT, Nyalwidhe JO. Variable Metastatic Potentials Correlate with Differential Plectin and Vimentin Expression in Syngeneic Androgen Independent Prostate Cancer Cells. Munirathinam G, ed. *PLoS One*. 2013;8(5):e65005. doi:10.1371/journal.pone.0065005.
245. Wu M, Bai X, Xu G, et al. Proteome analysis of human androgen-independent prostate cancer cell lines: Variable metastatic potentials correlated with vimentin expression. *Proteomics*. 2007;7(12):1973-1983. doi:10.1002/pmic.200600643.
246. Lindsay CR, Le Moulec S, Billiot F, et al. Vimentin and Ki67 expression in circulating tumour cells derived from castrate-resistant prostate cancer. *BMC Cancer*. 2016;16(1):168. doi:10.1186/s12885-016-2192-6.
247. Abou-Ouf H, Zhao L, Bismar TA. ERG expression in prostate cancer: biological relevance and clinical implication. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(8):1781-1793. doi:10.1007/s00432-015-2096-x.
248. Ullman D, Dorn D, Rais-Bahrami S, Gordetsky J. Clinical Utility and Biologic Implications of Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) and ETS-related Gene (ERG) in Prostate Cancer. *Urology*. 2018;113:59-70. doi:10.1016/j.urology.2017.11.022.
249. Adamo P, Lodomery MR. The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer. *Oncogene*. 2016;35(4):403-414. doi:10.1038/onc.2015.109.
250. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;18(2):89-102.

- doi:10.1038/nrc.2017.109.
251. Spees CK, Kelleher KJ, Abaza R, Clinton SK. Prostate Cancer and Li-Fraumeni Syndrome: Implications for Screening and Therapy. *Urol Case Reports*. 2015;3(2):21-23. doi:10.1016/j.eucr.2015.01.002.
 252. Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015;163:1011-1025. doi:10.1016/j.cell.2015.10.025.
 253. Robinson D, Van Allen EM, Wu Y-M, et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell*. 2015;161(5):1215-1228. doi:10.1016/j.cell.2015.05.001.
 254. Guedes LB, Almutairi F, Haffner MC, et al. Analytic, Preanalytic, and Clinical Validation of p53 IHC for Detection of TP53 Missense Mutation in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(16):4693-4703. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0257.
 255. Kudahetti S, Fisher G, Ambroisine L, et al. p53 immunochemistry is an independent prognostic marker for outcome in conservatively treated prostate cancer. *BJU Int*. 2009;104(1):20-24. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08407.x.
 256. Ecke TH, Schlechte HH, Schiemenz K, et al. TP53 gene mutations in prostate cancer progression. *Anticancer Res*. 2010;30(5):1579-1586. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592345>. Accessed August 25, 2018.
 257. Bansal A, Gupta A, Saxena S. 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 J Cancer*. 2015;4(2):88. doi:10.4103/2278-330X.155693.
 258. Wang Y, Zhang YX, Kong CZ, Zhang Z, Zhu YY. Loss of P53 facilitates invasion and metastasis of prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2013;384(1-2):121-127. doi:10.1007/s11010-013-1789-1.
 259. Verma R, Gupta V, Singh J, et al. Significance of p53 and ki-67 expression in prostate cancer. *Urol Ann*. 2015;7(4):488. doi:10.4103/0974-7796.158507.
 260. Eastham JA, Stapleton AM, Gousse AE, et al. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 1995;1(10):1111-1118. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815901>. Accessed August 25, 2018.

261. Miller I, Min M, Yang C, et al. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep.* 2018;24(5):1105-1112.e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.110.
262. Cher ML, Carroll PR, Chew K, Rosenau W. Cellular proliferation in prostatic adenocarcinoma as assessed by bromodeoxyuridine uptake and Ki-67 and PCNA expression. *Prostate.* 1995;26(2):87-93. doi:10.1002/pros.2990260205.
263. Tretiakova MS, Wei W, Boyer HD, et al. Prognostic value of Ki67 in localized prostate carcinoma: a multi-institutional study of >1000 prostatectomies. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2016;19(3):264-270. doi:10.1038/pcan.2016.12.
264. BUBENDORF L, SAUTER G, MOCH H, et al. Ki67 LABELLING INDEX: AN INDEPENDENT PREDICTOR OF PROGRESSION IN PROSTATE CANCER TREATED BY RADICAL PROSTATECTOMY. *J Pathol.* 1996;178(4):437-441. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199604)178:4<437::AID-PATH484>3.0.CO;2-4.
265. Richardsen E, Andersen S, Al-Saad S, et al. Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in a large prostatectomy cohort. Ahmed A, ed. *PLoS One.* 2017;12(11):e0186852. doi:10.1371/journal.pone.0186852.
266. Stattin P, Damber J-E, Karlberg L, Bergh A. Cell Proliferation Assessed by Ki-67 Immunoreactivity on Formalin Fixed Tissues is a Predictive Factor for Survival in Prostate Cancer. *J Urol.* 1997;157(1):219-222. doi:10.1016/S0022-5347(01)65330-8.
267. Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Moul JW. Ki-67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol.* 1996;156(3):1064-1068. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709308>. Accessed August 26, 2018.
268. Tollefson MK, Karnes RJ, Kwon ED, et al. Prostate Cancer Ki-67 (MIB-1) Expression, Perineural Invasion, and Gleason Score as Biopsy-Based Predictors of Prostate Cancer Mortality: The Mayo Model. *Mayo Clin Proc.* 2014;89(3):308-318. doi:10.1016/j.mayocp.2013.12.001.
269. Bubendorf L, Tapia C, Gasser TC, et al. Ki67 labeling index in core needle biopsies independently predicts tumor-specific survival in prostate cancer. *Hum Pathol.* 1998;29(9):949-954. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9744310>. Accessed January 21, 2018.

270. Fisher G, Yang ZH, Kudahetti S, et al. Prognostic value of Ki-67 for prostate cancer death in a conservatively managed cohort. *Br J Cancer*. 2013;108(2):271-277. doi:10.1038/bjc.2012.598.
271. Berlin A, Castro-Mesta JF, Rodriguez-Romo L, et al. Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2017;35(8):499-506. doi:10.1016/j.urolonc.2017.05.004.
272. Jamaspishvili T, Berman DM, Ross AE, et al. Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2018;15(4):222-234. doi:10.1038/nrurol.2018.9.
273. Wang Y, Dai B. PTEN genomic deletion defines favorable prognostic biomarkers in localized prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(4):5430-5437. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26131120>. Accessed August 26, 2018.
274. Ferraldeschi R, Nava Rodrigues D, Riisnaes R, et al. PTEN Protein Loss and Clinical Outcome from Castration-resistant Prostate Cancer Treated with Abiraterone Acetate. *Eur Urol*. 2015;67(4):795-802. doi:10.1016/j.eururo.2014.10.027.
275. Mateo J, Boysen G, Barbieri CE, et al. DNA Repair in Prostate Cancer: Biology and Clinical Implications. *Eur Urol*. 2016:1-9. doi:10.1016/j.eururo.2016.08.037.
276. Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2012;487:239-243. doi:10.1038/nature11125.
277. Pritchard CC, Morrissey C, Kumar A, et al. Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. *Nat Commun*. 2014;5(1):4988. doi:10.1038/ncomms5988.
278. Chen Y, Wang J, Fraig MM, et al. Defects of DNA mismatch repair in human prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61(10):4112-4121. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358834>. Accessed August 26, 2018.
279. Chen Y, Wang J, Fraig MM, et al. Alterations in PMS2, MSH2 and MLH1 expression in human prostate cancer. *Int J Oncol*. 2003;22(5):1033-1043.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684669>. Accessed January 21, 2018.
280. Guedes LB, Antonarakis ES, Schweizer MT, et al. MSH2 Loss in Primary Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(22):6863-6874. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0955.
 281. Norris AM, Gentry M, Peehl DM, D'Agostino R, Scarpinato KD. The Elevated Expression of a Mismatch Repair Protein Is a Predictor for Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(1):57-64. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0377.
 282. Wilczak W, Rashed S, Hube-Magg C, et al. Up-regulation of mismatch repair genes MSH6, PMS2 and MLH1 parallels development of genetic instability and is linked to tumor aggressiveness and early PSA recurrence in prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(1):19-27. doi:10.1093/carcin/bgw116.
 283. Nghiem B, Zhang X, Lam H-M, et al. Mismatch repair enzyme expression in primary and castrate resistant prostate cancer. *Asian J Urol*. 2016;3(4):223-228. doi:10.1016/j.ajur.2016.09.002.
 284. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863(6):1238-1260. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.02.016.
 285. Chen X, Rycaj K, Liu X, Tang DG. New insights into prostate cancer stem cells. *Cell Cycle*. 2013;12(4):579-586. doi:10.4161/cc.23721.
 286. Skvortsov S, Skvortsova I-I, Tang DG, Dubrovskaya A. Prostate Cancer Stem Cells: Current Understanding. *Stem Cells*. 2018:1-23. doi:10.1002/stem.2859.
 287. Adamowicz J, Pakravan K, Bakhshinejad B, Drewa T, Babashah S. Prostate cancer stem cells: from theory to practice. *Scand J Urol*. 2017;51(2):95-106. doi:10.1080/21681805.2017.1283360.
 288. Bae K-M, Dai Y, Vieweg J, Siemann DW. Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation. *Am J Cancer Res*. 2016;6(5):1078-1088. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294000>. Accessed January 15, 2018.
 289. Kosaka T, Mikami S, Yoshimine S, et al. The prognostic significance of OCT4 expression in patients with prostate cancer. *Hum Pathol*. 2016;51:1-8. doi:10.1016/j.humpath.2015.12.008.

290. Le Magnen C, Bubendorf L, Rentsch CA, et al. Characterization and clinical relevance of ALDHbright populations in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):5361-5371. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2857.
291. Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, et al. Sox2 Is an Androgen Receptor-Repressed Gene That Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer. Yu J, ed. *PLoS One.* 2013;8(1):e53701. doi:10.1371/journal.pone.0053701.
292. Matsika A, Srinivasan B, Day C, et al. Cancer stem cell markers in prostate cancer: an immunohistochemical study of ALDH1, SOX2 and EZH2. *Pathology.* 2015;47(7):622-628. doi:10.1097/PAT.0000000000000325.
293. Guzel E, Karatas OF, Duz MB, Solak M, Ittmann M, Ozen M. Differential expression of stem cell markers and ABCG2 in recurrent prostate cancer. *Prostate.* 2014;74(15):1498-1505. doi:10.1002/pros.22867.
294. de Resende MF, Chinen LTD, Vieira S, et al. Prognostication of OCT4 isoform expression in prostate cancer. *Tumor Biol.* 2013;34(5):2665-2673. doi:10.1007/s13277-013-0817-9.
295. MIYAZAWA K, TANAKA T, NAKAI D, MORITA N, SUZUKI K. Immunohistochemical expression of four different stem cell markers in prostate cancer: High expression of NANOG in conjunction with hypoxia-inducible factor-1 α expression is involved in prostate epithelial malignancy. *Oncol Lett.* 2014;8(3):985-992. doi:10.3892/ol.2014.2274.
296. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(6):1238-1260. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.02.016.
297. Barbieri CE, Rubin M a. Genomic rearrangements in prostate cancer. *Curr Opin Urol.* 2015;25:71-76. doi:10.1097/MOU.000000000000129.
298. Attard G, Parker C, Eeles R a., et al. Prostate cancer. *Lancet.* 2016;387(14):70-82. doi:10.1016/S0140-6736(14)61947-4.
299. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel).* 1995;154(1):8-20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8714286>. Accessed September 7, 2018.
300. Weinberg RA. *The Biology of Cancer.*; 2014.
301. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1):21-

45. doi:10.1016/j.cell.2016.06.028.
302. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
303. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 2009;139:871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
304. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-196. doi:10.1038/nrm3758.
305. Goossens S, Vandamme N, Van Vlierberghe P, Berx G. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2017;1868(2):584-591. doi:10.1016/j.bbcan.2017.06.006.
306. Díaz-López A, Moreno-Bueno G, Cano A. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res*. 2014;6:205-216. doi:10.2147/CMAR.S38156.
307. Lo U-G, Lee C-F, Lee M-S, Hsieh J-T. The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2079. doi:10.3390/ijms18102079.
308. Drak Alsibai K, Meseure D. Tumor microenvironment and noncoding RNAs as co-drivers of epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Dev Dyn*. 2018;247(3):405-431. doi:10.1002/dvdy.24548.
309. Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*. 2018;556(7702):463-468. doi:10.1038/s41586-018-0040-3.
310. Montanari M, Rossetti S, Cavaliere C, et al. Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview. *Oncotarget*. 2017;8(21):35376-35389. doi:10.18632/oncotarget.15686.
311. Begemann D, Anastos H, Kyprianou N. Cell death under epithelial-mesenchymal transition control in prostate cancer therapeutic response. *Int J Urol*. 2018;25(4):318-326. doi:10.1111/iju.13505.
312. Nauseef JT, Henry MD. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate

- cancer: paradigm or puzzle? *Nat Rev Urol*. 2011;8(8):428-439.
doi:10.1038/nrurol.2011.85.
313. Tan TZ, Miow QH, Miki Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med*. 2014;6(10):1279-1293.
doi:10.15252/emmm.201404208.
314. Behnsawy HM, Miyake H, Harada K-I, Fujisawa M. Expression patterns of epithelial-mesenchymal transition markers in localized prostate cancer: significance in clinicopathological outcomes following radical prostatectomy. *BJU Int*. 2013;111(1):30-37. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11551.x.
315. Jiang G, Hu Q, Wang H, et al. A Cumulative Analysis of Current Evidence for Association between Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition Markers and Clinicopathological Outcomes in Patients after Radical Prostatectomy. *Ann Clin Lab Sci*. 2018;48(1):18-28.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29530992>. Accessed September 9, 2018.
316. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. doi:10.1038/35057062.
317. Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 2012;489(7414):101-108. doi:10.1038/nature11233.
318. Geisler S, Coller J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(11):699-712.
doi:10.1038/nrm3679.
319. ENCODE Project Consortium TEP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74.
doi:10.1038/nature11247.
320. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet*. 2015;47(3):199-208.
doi:10.1038/ng.3192.
321. Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*. 2012;482(7385):339-346. doi:10.1038/nature10887.
322. Mouraviev V, Lee B, Patel V, et al. Clinical prospects of long noncoding RNAs

- as novel biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2016;19(1):14-20. doi:10.1038/pcan.2015.48.
323. Sanchez Calle A, Kawamura Y, Yamamoto Y, Takeshita F, Ochiya T. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. *Cancer Sci.* 2018;109(7):2093-2100. doi:10.1111/cas.13642.
324. Guo H, Ahmed M, Zhang F, et al. Modulation of long noncoding RNAs by risk SNPs underlying genetic predispositions to prostate cancer. *Nat Genet.* 2016;48(10):1142-1150. doi:10.1038/ng.3637.
325. Pan W, Wu C, Su Z, et al. Genetic polymorphisms of non-coding RNAs associated with increased head and neck cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(37):62508-62523. doi:10.18632/oncotarget.20096.
326. Xu T, Hu X-X, Liu X-X, et al. Association between SNPs in Long Non-coding RNAs and the Risk of Female Breast Cancer in a Chinese Population. *J Cancer.* 2017;8(7):1162-1169. doi:10.7150/jca.18055.
327. Wang B-G, Xu Q, Lv Z, et al. Association of twelve polymorphisms in three onco-lncRNA genes with hepatocellular cancer risk and prognosis: A case-control study. *World J Gastroenterol.* 2018;24(23):2482-2490. doi:10.3748/wjg.v24.i23.2482.
328. Léveillé N, Melo CA, Rooijers K, et al. Genome-wide profiling of p53-regulated enhancer RNAs uncovers a subset of enhancers controlled by a lncRNA. *Nat Commun.* 2015;6(1):6520. doi:10.1038/ncomms7520.
329. Peng W, Wu J, Feng J. LincRNA-p21 predicts favorable clinical outcome and impairs tumorigenesis in diffuse large B cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Clin Exp Med.* 2017;17(1):1-8. doi:10.1007/s10238-015-0396-8.
330. Zhai H, Fesler A, Schee K, Fodstad O, Flatmark K, Ju J. Clinical significance of long intergenic noncoding RNA-p21 in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2013;12(4):261-266. doi:10.1016/j.clcc.2013.06.003.
331. Fox AH, Lamond AI. Paraspeckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(7):a000687-a000687. doi:10.1101/cshperspect.a000687.
332. Gutschner T, Hämmerle M, Diederichs S. MALAT1 — a paradigm for long

- noncoding RNA function in cancer. *J Mol Med*. 2013;91(7):791-801.
doi:10.1007/s00109-013-1028-y.
333. Mitra R, Chen X, Greenawalt EJ, et al. Decoding critical long non-coding RNA in ovarian cancer epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Commun*. 2017;8(1):1604. doi:10.1038/s41467-017-01781-0.
334. Terashima M, Tange S, Ishimura A, Suzuki T. MEG3 Long Noncoding RNA Contributes to the Epigenetic Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cell Lines. *J Biol Chem*. 2017;292(1):82-99.
doi:10.1074/jbc.M116.750950.
335. Jia M, Jiang L, Wang Y-D, Huang J-Z, Yu M, Xue H-Z. lincRNA-p21 inhibits invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma through Notch signaling-induced epithelial-mesenchymal transition. *Hepatol Res*. 2016;46(11):1137-1144. doi:10.1111/hepr.12659.
336. Chen Y, Wei G, Wang L, Yu H, Tang Q, Bi F. Down regulation of lincRNA-p21 contributes to gastric cancer development through Hippo-independent activation of YAP. *Oncotarget*. 2017;8(38):63813-63824.
doi:10.18632/oncotarget.19130.
337. Lu Y, Li T, Wei G, et al. The long non-coding RNA NEAT1 regulates epithelial to mesenchymal transition and radioresistance in through miR-204/ZEB1 axis in nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol*. 2016;37(9):11733-11741.
doi:10.1007/s13277-015-4773-4.
338. Li Y, Cheng C. Long noncoding RNA NEAT1 promotes the metastasis of osteosarcoma via interaction with the G9a-DNMT1-Snail complex. *Am J Cancer Res*. 2018;8(1):81-90.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29416922>. Accessed July 27, 2018.
339. Jin Y, Feng S-J, Qiu S, Shao N, Zheng J-H. LncRNA MALAT1 promotes proliferation and metastasis in epithelial ovarian cancer via the PI3K-AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(14):3176-3184.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28770968>. Accessed July 27, 2018.
340. Battistelli C, Cicchini C, Santangelo L, et al. The Snail repressor recruits EZH2 to specific genomic sites through the enrollment of the lncRNA HOTAIR in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2017;36(7):942-955.

- doi:10.1038/onc.2016.260.
341. Ren Y, Jia H-H, Xu Y-Q, et al. Paracrine and epigenetic control of CAF-induced metastasis: the role of HOTAIR stimulated by TGF- β 1 secretion. *Mol Cancer*. 2018;17(1):5. doi:10.1186/s12943-018-0758-4.
 342. Wu B-Q, Jiang Y, Zhu F, Sun D-L, He X-Z. Long Noncoding RNA PVT1 Promotes EMT and Cell Proliferation and Migration Through Downregulating p21 in Pancreatic Cancer Cells. *Technol Cancer Res Treat*. 2017;16(6):819-827. doi:10.1177/1533034617700559.
 343. Cimadamore A, Gasparrini S, Mazzucchelli R, et al. Long Non-coding RNAs in Prostate Cancer with Emphasis on Second Chromosome Locus Associated with Prostate-1 Expression. *Front Oncol*. 2017;7:305. doi:10.3389/fonc.2017.00305.
 344. Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol*. 2008;179(5):1804-9; discussion 1809-10. doi:10.1016/j.juro.2008.01.013.
 345. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: does PCA3 testing for the diagnosis and management of prostate cancer improve patient health outcomes? *Genet Med*. 2014;16(4):338-346. doi:10.1038/gim.2013.141.
 346. Ren S, Liu Y, Xu W, et al. Long noncoding RNA MALAT-1 is a new potential therapeutic target for castration resistant prostate cancer. *J Urol*. 2013;190(6):2278-2287. doi:10.1016/j.juro.2013.07.001.
 347. Wang F, Ren S, Chen R, et al. Development and prospective multicenter evaluation of the long noncoding RNA MALAT-1 as a diagnostic urinary biomarker for prostate cancer. *Oncotarget*. 2014;5(22):11091-11102. doi:10.18632/oncotarget.2691.
 348. Xue D, Lu H, Xu H-Y, Zhou C-X, He X-Z. Long noncoding RNA MALAT1 enhances the docetaxel resistance of prostate cancer cells via miR-145-5p-mediated regulation of AKAP12. *J Cell Mol Med*. 2018;22(6):3223-3237. doi:10.1111/jcmm.13604.
 349. Wang R, Sun Y, Li L, et al. Preclinical Study using Malat1 Small Interfering RNA

- or Androgen Receptor Splicing Variant 7 Degradation Enhancer ASC-J9[®] to Suppress Enzalutamide-resistant Prostate Cancer Progression. *Eur Urol*. 2017;72(5):835-844. doi:10.1016/j.eururo.2017.04.005.
350. Zhao R, Sun F, Bei X, et al. Upregulation of the long non-coding RNA FALEC promotes proliferation and migration of prostate cancer cell lines and predicts prognosis of PCa patients. *Prostate*. 2017;77(10):1107-1117. doi:10.1002/pros.23367.
351. Wang J, Cheng G, Li X, et al. Overexpression of long non-coding RNA LOC400891 promotes tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. *Tumour Biol*. 2016;37(7):9603-9613. doi:10.1007/s13277-016-4847-y.
352. Zheng J, Zhao S, He X, et al. The up-regulation of long non-coding RNA CCAT2 indicates a poor prognosis for prostate cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;480(4):508-514. doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.120.
353. Prensner JR, Iyer MK, Balbin OA, et al. Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nat Biotechnol*. 2011;29(8):742-749. doi:10.1038/nbt.1914.
354. Huang T, Dong C, Zhou G, et al. A potential panel of four-long noncoding RNA signature in prostate cancer predicts biochemical recurrence-free survival and disease-free survival. *Int Urol Nephrol*. 2017;49(5):825-835. doi:10.1007/s11255-017-1536-8.
355. Ma W, Chen X, Ding L, et al. The prognostic value of long noncoding RNAs in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(34):57755-57765. doi:10.18632/oncotarget.17645.
356. Prensner JR, Iyer MK, Sahu A, et al. The long noncoding RNA SchLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex. *Nat Genet*. 2013;45(11):1392-1398. doi:10.1038/ng.2771.
357. Li Y, Luo H, Xiao N, Duan J, Wang Z, Wang S. Long Noncoding RNA SchLAP1 Accelerates the Proliferation and Metastasis of Prostate Cancer via Targeting miR-198 and Promoting the MAPK1 Pathway. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther*. 2018;26(1):131-143. doi:10.3727/096504017X14944585873631.

358. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, et al. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(2):397-406. doi:10.1074/mcp.M113.035600.
359. Zhang J, Shi Z, Nan Y, Li M. Inhibiting malignant phenotypes of the bladder cancer cells by silencing long noncoding RNA SChLAP1. *Int Urol Nephrol*. 2016;48(5):711-716. doi:10.1007/s11255-016-1230-2.
360. Prensner JR, Zhao S, Erho N, et al. RNA biomarkers associated with metastatic progression in prostate cancer: A multi-institutional high-throughput analysis of SChLAP1. *Lancet Oncol*. 2014;15(13):1469-1480. doi:10.1016/S1470-2045(14)71113-1.
361. Mehra R, Shi Y, Udager AM, et al. A Novel RNA In Situ Hybridization Assay for the Long Noncoding RNA SChLAP1 Predicts Poor Clinical Outcome After Radical Prostatectomy in Clinically Localized Prostate Cancer. *Neoplasia*. 2014;16(12):1121-1127. doi:10.1016/j.neo.2014.11.006.
362. Mehra R, Udager AM, Ahearn TU, et al. Overexpression of the Long Non-coding RNA SChLAP1 Independently Predicts Lethal Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2016;70(4):549-552. doi:10.1016/j.eururo.2015.12.003.
363. Chua MLK, Lo W, Pintilie M, et al. A Prostate Cancer “Nimbusus”: Genomic Instability and SChLAP1 Dysregulation Underpin Aggression of Intraductal and Cribriform Subpathologies. *Eur Urol*. 2017;72(5):665-674. doi:10.1016/j.eururo.2017.04.034.
364. Spratt DE. Convergence of Genomic Instability and SChLAP1: Weathering the Storm of Intraductal Carcinoma of the Prostate. *Eur Urol*. 2017;72(5):675-676. doi:10.1016/j.eururo.2017.05.015.
365. Prensner JR, Zhao S, Erho N, et al. RNA biomarkers associated with metastatic progression in prostate cancer: a multi-institutional high-throughput analysis of SChLAP1. *Lancet Oncol*. 2014;15(13):1469-1480. doi:10.1016/S1470-2045(14)71113-1.
366. Fletcher R. FS. *Clinical Epidemiology : The Essentials*. 4th Editio. Lippincott Williams & Wilkins.; 2005.
367. Briganti A, Larcher A, Abdollah F, et al. Updated Nomogram Predicting Lymph

- Node Invasion in Patients with Prostate Cancer Undergoing Extended Pelvic Lymph Node Dissection: The Essential Importance of Percentage of Positive Cores. *Eur Urol*. 2012;61(3):480-487. doi:10.1016/j.eururo.2011.10.044.
368. Edge, S., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F., Trotti A (Eds. . *AJCC Cancer Staging Handbook*. Springer US; 2010.
369. Delves, PJ. Roitt I. *Encyclopedia of Immunology*. Second edi. Academic Press.; 1998.
370. Vogel U. Overview on Techniques to Construct Tissue Arrays with Special Emphasis on Tissue Microarrays. *Microarrays*. 2014;3(2):103-136. doi:10.3390/microarrays3020103.
371. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014;505(7484):495-501. doi:10.1038/nature12912.
372. Petrie, A. Sabin C. *Medical Statistics at a Glance*. Third edit. Willey-Blackwell; 2009.
373. Adolfsson J, Steineck G. Prognostic and treatment-predictive factors—is there a difference? *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2000;3(4):265-268. doi:10.1038/sj.pcan.4500490.
374. Ugolkov A V., Eisengart LJ, Luan C, Yang XJ. Expression analysis of putative stem cell markers in human benign and malignant prostate. *Prostate*. 2011;71(1):18-25. doi:10.1002/pros.21217.
375. Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct*. 2008;26(5):571-577. doi:10.1002/cbf.1478.
376. Lokman U, Erickson AM, Vasarainen H, Rannikko AS, Mirtti T. PTEN Loss but Not ERG Expression in Diagnostic Biopsies Is Associated with Increased Risk of Progression and Adverse Surgical Findings in Men with Prostate Cancer on Active Surveillance. *Eur Urol Focus*. March 2017. doi:10.1016/j.euf.2017.03.004.
377. Downes MR, Satturwar S, Trudel D, van der Kwast TH. Evaluation of ERG and PTEN protein expression in cribriform architecture prostate carcinomas. *Pathol - Res Pract*. 2017;213(1):34-38. doi:10.1016/j.prp.2016.10.007.

378. Yu X, Cates JM, Morrissey C, et al. SOX2 expression in the developing, adult, as well as, diseased prostate. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2014;17(4):301-309. doi:10.1038/pcan.2014.29.
379. Wang Q, Zhang JG, Wang W. Expression and significance of S100P, CD147, and OCT4 in different prostate cancer tissue TNM stages. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):6844-6851. doi:10.4238/2015.June.18.27.
380. Liu P-F, Kang B-H, Wu Y-M, et al. Vimentin is a potential prognostic factor for tongue squamous cell carcinoma among five epithelial–mesenchymal transition-related proteins. Coleman WB, ed. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178581. doi:10.1371/journal.pone.0178581.
381. Kenda Suster N, Smrkolj S, Virant-Klun I. Putative stem cells and epithelial-mesenchymal transition revealed in sections of ovarian tumor in patients with serous ovarian carcinoma using immunohistochemistry for vimentin and pluripotency-related markers. *J Ovarian Res.* 2017;10(1):11. doi:10.1186/s13048-017-0306-7.
382. Ingels A, Hew M, Algaba F, et al. Vimentin over-expression and carbonic anhydrase IX under-expression are independent predictors of recurrence, specific and overall survival in non-metastatic clear-cell renal carcinoma: a validation study. *World J Urol.* 2017;35(1):81-87. doi:10.1007/s00345-016-1854-y.
383. TANAKA M, KIJIMA H, SHIMADA H, MAKUUCHI H, OZAWA S, INOKUCHI S. Expression of podoplanin and vimentin is correlated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2015;12(3):4029-4036. doi:10.3892/mmr.2015.3966.
384. Rahmani AH, Babiker AY, AlWanian WM, Elsiddig SA, Faragalla HE, Aly SM. Association of Cytokeratin and Vimentin Protein in the Genesis of Transitional Cell Carcinoma of Urinary Bladder Patients. *Dis Markers.* 2015;2015:1-5. doi:10.1155/2015/204759.
385. Balasundaram P, Singh M, Dinda A, Thakar A, Yadav R. Study of β -catenin, E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma with and without lymph node metastases. *Diagn Pathol.* 2014;9(1):145. doi:10.1186/1746-1596-9-145.

386. Suh JH, Park JH, Lee C, Moon KC. Intrafocal heterogeneity of ERG protein expression and gene fusion pattern in prostate cancer. *Prostate*. 2017;77(14):1438-1445. doi:10.1002/pros.23405.
387. Navaei AH, Walter BA, Moreno V, Pack SD, Pinto P, Merino MJ. Correlation between *ERG* Fusion Protein and Androgen Receptor Expression by Immunohistochemistry in Prostate, Possible Role in Diagnosis and Therapy. *J Cancer*. 2017;8(13):2604-2613. doi:10.7150/jca.16751.
388. Lahdensuo K, Erickson A, Saarinen I, et al. Loss of PTEN expression in ERG-negative prostate cancer predicts secondary therapies and leads to shorter disease-specific survival time after radical prostatectomy. *Mod Pathol*. 2016;29(12):1565-1574. doi:10.1038/modpathol.2016.154.
389. Hoogland a M, Jenster G, van Weerden WM, et al. ERG immunohistochemistry is not predictive for PSA recurrence, local recurrence or overall survival after radical prostatectomy for prostate cancer. *Mod Pathol*. 2012;25(3):471-479. doi:10.1038/modpathol.2011.176.
390. Roudier MP, Winters BR, Coleman I, et al. Characterizing the molecular features of ERG-positive tumors in primary and castration resistant prostate cancer. *Prostate*. 2016;76(9):810-822. doi:10.1002/pros.23171.
391. Berg KD, Røder MA, Thomsen FB, et al. The predictive value of ERG protein expression for development of castration-resistant prostate cancer in hormone-naïve advanced prostate cancer treated with primary androgen deprivation therapy. *Prostate*. 2015;75(14):1499-1509. doi:10.1002/pros.23026.
392. Shah RB, Bentley J, Jeffery Z, DeMarzo AM. Heterogeneity of PTEN and ERG expression in prostate cancer on core needle biopsies: implications for cancer risk stratification and biomarker sampling. *Hum Pathol*. 2015;46(5):698-706. doi:10.1016/j.humpath.2015.01.008.
393. Lobo J, Rodrigues Â, Antunes L, et al. High immunoexpression of Ki67, EZH2, and SMYD3 in diagnostic prostate biopsies independently predicts outcome in patients with prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. November 2017. doi:10.1016/j.urolonc.2017.10.028.
394. Pascale M, Aversa C, Barbazza R, et al. The proliferation marker Ki67, but not

- neuroendocrine expression, is an independent factor in the prediction of prognosis of primary prostate cancer patients. *Radiol Oncol*. 2016;50(3):313-320. doi:10.1515/raon-2016-0033.
395. Antonarakis ES, Keizman D, Zhang Z, et al. An immunohistochemical signature comprising PTEN, MYC, and Ki67 predicts progression in prostate cancer patients receiving adjuvant docetaxel after prostatectomy. *Cancer*. 2012;118(24):6063-6071. doi:10.1002/cncr.27689.
396. Zellweger T, Günther S, Zlobec I, et al. Tumour growth fraction measured by immunohistochemical staining of Ki67 is an independent prognostic factor in preoperative prostate biopsies with small-volume or low-grade prostate cancer. *Int J Cancer*. 2009;124(9):2116-2123. doi:10.1002/ijc.24174.
397. Lotan TL, Gurel B, Sutcliffe S, et al. PTEN Protein Loss by Immunostaining: Analytic Validation and Prognostic Indicator for a High Risk Surgical Cohort of Prostate Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2011;17(20):6563-6573. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1244.
398. Picanço-Albuquerque CG, Morais CL, Carvalho FLF, et al. In prostate cancer needle biopsies, detections of PTEN loss by fluorescence in situ hybridization (FISH) and by immunohistochemistry (IHC) are concordant and show consistent association with upgrading. *Virchows Arch*. 2016;468(5):607-617. doi:10.1007/s00428-016-1904-2.
399. Lotan TL, Wei W, Ludkovski O, et al. Analytic validation of a clinical-grade PTEN immunohistochemistry assay in prostate cancer by comparison with PTEN FISH. *Mod Pathol*. 2016;29(8):904-914. doi:10.1038/modpathol.2016.88.
400. Norris AM, Woodruff RD, D'Agostino RB, Clodfelter JE, Scarpinato KD. Elevated levels of the mismatch repair protein PMS2 are associated with prostate cancer. *Prostate*. 2007;67(2):214-225. doi:10.1002/pros.20522.
401. Rosty C, Walsh MD, Lindor NM, et al. High prevalence of mismatch repair deficiency in prostate cancers diagnosed in mismatch repair gene mutation carriers from the colon cancer family registry. *Fam Cancer*. 2014;13(4):573-582. doi:10.1007/s10689-014-9744-1.
402. Orbo A, Nilsen MN, Arnes MS, Pettersen I, Larsen K. Loss of expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PTEN related to endometrial cancer in 68 patients

- with endometrial hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2003;22(2):141-148.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649668>. Accessed January 21, 2018.
403. Berends MJ, Hollema H, Wu Y, et al. MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer. *Int J cancer*. 2001;92(3):398-403.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11291077>. Accessed January 21, 2018.
404. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2018.
405. T T. A Package for Survival Analysis in S_. 2015. <https://cran.r-project.org/package=survival%3E.%0D%0D>.
406. Serrano P. *Redacção e Apresentação de Trabalhos Científicos*. Relógio D'Água; 1996.
407. Hosmer, D.W., Lemeshow, S. and May S. *Applied Survival Analysis: Regression Modeling of Time-to-Event Data*. Second Edi. John Wiley & Sons, Inc.
408. JONES TD, KOCH MO, BUNDE PJ, CHENG L. Is prostate-specific antigen (PSA) density better than the preoperative PSA level in predicting early biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy? *BJU Int*. 2006;97(3):480-484. doi:10.1111/j.1464-410X.2006.06022.x.
409. Han M, Partin AW, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 2003;169(2):517-523. doi:10.1097/01.ju.0000045749.90353.c7.
410. Stamey TA, Johnstone IM, McNeal JE, Lu AY, Yemoto CM. Preoperative serum prostate specific antigen levels between 2 and 22 ng./ml. correlate poorly with post-radical prostatectomy cancer morphology: prostate specific antigen cure rates appear constant between 2 and 9 ng./ml. *J Urol*. 2002;167(1):103-111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743285>. Accessed September 26, 2018.
411. Noguchi M, Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM. Preoperative serum prostate specific antigen does not reflect biochemical failure rates after radical prostatectomy in men with large volume cancers. *J Urol*. 2000;164(5):1596-1600. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11025712>. Accessed September 26, 2018.

412. Divatia MK, Ro JY. Intraductal Carcinoma of the Prostate Gland: Recent Advances. *Yonsei Med J.* 2016;57(5):1054-1062. doi:10.3349/ymj.2016.57.5.1054.
413. Hashine K, Yuasa A, Shinomori K, Shirato A, Ninomiya I, Teramoto N. Tertiary Gleason pattern 5 and oncological outcomes after radical prostatectomy. *Jpn J Clin Oncol.* 2011;41(4):571-576. doi:10.1093/jjco/hyq250.
414. Hattab EM, Koch MO, Eble JN, Lin H, Cheng L. Tertiary Gleason Pattern 5 is a Powerful Predictor of Biochemical Relapse in Patients With Gleason Score 7 Prostatic Adenocarcinoma. *J Urol.* 2006;175(5):1695-1699. doi:10.1016/S0022-5347(05)00998-5.
415. Adam M, Hannah A, Budäus L, et al. A Tertiary Gleason Pattern in the Prostatectomy Specimen and its Association with Adverse Outcome after Radical Prostatectomy. *J Urol.* 2014;192(1):97-102. doi:10.1016/j.juro.2014.01.029.
416. Turker P, Bas E, Bozkurt S, et al. Presence of high grade tertiary Gleason pattern upgrades the Gleason sum score and is inversely associated with biochemical recurrence-free survival. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2013;31(1):93-98. doi:10.1016/j.urolonc.2010.10.009.
417. Trock BJ, Guo CC, Gonzalgo ML, Magheli A, Loeb S, Epstein JI. Tertiary Gleason Patterns and Biochemical Recurrence After Prostatectomy: Proposal for a Modified Gleason Scoring System. *J Urol.* 2009;182(4):1364-1370. doi:10.1016/j.juro.2009.06.048.
418. van Oort IM, Schout BM, Kiemeneijer LALM, Hulsbergen CA, Witjes JA. Does the Tertiary Gleason Pattern Influence the PSA Progression-Free Interval after Retropubic Radical Prostatectomy for Organ-Confined Prostate Cancer? *Eur Urol.* 2005;48(4):572-576. doi:10.1016/j.eururo.2005.06.003.
419. Sim HG, Telesca D, Culp SH, et al. Tertiary Gleason Pattern 5 in Gleason 7 Prostate Cancer Predicts Pathological Stage and Biochemical Recurrence. *J Urol.* 2008;179(5):1775-1779. doi:10.1016/j.juro.2008.01.016.
420. Häggman M, Nordin B, Mattson S, Busch C. Morphometric studies of intraprostatic volume relationships in localized prostatic cancer. *Br J Urol.* 1997;80(4):612-617. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352701>.

Accessed October 2, 2018.

421. Tourinho-Barbosa RR, de la Rosette J, Sanchez-Salas R. Prostate cancer multifocality, the index lesion, and the microenvironment. *Curr Opin Urol*. 2018;28(6):1. doi:10.1097/MOU.0000000000000537.
422. Mouraviev V, Villers A, Bostwick DG, Wheeler TM, Montironi R, Polascik TJ. Understanding the pathological features of focality, grade and tumour volume of early-stage prostate cancer as a foundation for parenchyma-sparing prostate cancer therapies: active surveillance and focal targeted therapy. *BJU Int*. 2011;108(7):1074-1085. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.10039.x.
423. NELSON BA, SHAPPELL SB, CHANG SS, et al. Tumour volume is an independent predictor of prostate-specific antigen recurrence in patients undergoing radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *BJU Int*. 2006;97(6):1169-1172. doi:10.1111/j.1464-410X.2006.06148.x.
424. Hollmann BG, van Triest B, Ghobadi G, et al. Gross tumor volume and clinical target volume in prostate cancer: How do satellites relate to the index lesion. *Radiother Oncol*. 2015;115(1):96-100. doi:10.1016/j.radonc.2015.01.021.
425. Rud E, Klotz D, Rennesund K, et al. Detection of the index tumour and tumour volume in prostate cancer using T2-weighted and diffusion-weighted magnetic resonance imaging (MRI) alone. *BJU Int*. 2014;114(6b):E32-E42. doi:10.1111/bju.12637.
426. Turkbey B, Mani H, Aras O, et al. Correlation of Magnetic Resonance Imaging Tumor Volume with Histopathology. *J Urol*. 2012;188(4):1157-1163. doi:10.1016/j.juro.2012.06.011.
427. Diaz de Leon A, Leyendecker JR, Otero-Muinelo S, et al. Reproducibility of Index Lesion Size and Mean Apparent Diffusion Coefficient Values Measured by Prostate Multiparametric MRI: Correlation With Whole-Mount Sectioning of Specimens. *Am J Roentgenol*. 2018;211(4):783-788. doi:10.2214/AJR.17.19172.
428. Mizuno R, Nakashima J, Mukai M, et al. Tumour length of the largest focus predicts prostate-specific antigen-based recurrence after radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer. *BJU Int*. 2009;104(9):1215-1218. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08548.x.

429. Ahmed HU. The Index Lesion and the Origin of Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(17):1704-1706. doi:10.1056/NEJMcibr0905562.
430. Russo F, Regge D, Armando E, et al. Detection of prostate cancer index lesions with multiparametric magnetic resonance imaging (mp-MRI) using whole-mount histological sections as the reference standard. *BJU Int*. 2016;118(1):84-94. doi:10.1111/bju.13234.
431. Goldman H, Singh N, Harding C, et al. Accuracy of multiparametric magnetic resonance imaging to detect significant prostate cancer and index lesion location. *ANZ J Surg*. September 2018. doi:10.1111/ans.14754.
432. Djavan B, Susani M, Bursa B, Basharkhah A, Simak R, Marberger M. Predictability and significance of multifocal prostate cancer in the radical prostatectomy specimen. *Tech Urol*. 1999;5(3):139-142. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527256>. Accessed October 2, 2018.
433. Masterson TA, Cheng L, Mehan RM, Koch MO. Tumor Focality Does Not Predict Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy in Men With Clinically Localized Prostate Cancer. *J Urol*. 2011;186(2):506-510. doi:10.1016/j.juro.2011.03.106.
434. Rice KR, Furusato B, Chen Y, McLeod DG, Sesterhenn IA, Brassell SA. Clinicopathological Behavior of Single Focus Prostate Adenocarcinoma. *J Urol*. 2009;182(6):2689-2694. doi:10.1016/j.juro.2009.08.055.
435. Harnden P, Shelley MD, Clements H, et al. The prognostic significance of perineural invasion in prostatic cancer biopsies: a systematic review. *Cancer*. 2007;109(1):13-24. doi:10.1002/cncr.22388.
436. Pierorazio PM, Ross AE, Schaeffer EM, et al. A Contemporary Analysis of Outcomes of Adenocarcinoma of the Prostate With Seminal Vesicle Invasion (pT3b) After Radical Prostatectomy. *J Urol*. 2011;185(5):1691-1697. doi:10.1016/j.juro.2010.12.059.
437. Hu JC, Nanus DM, Sedrakyan A. Increase in Prostate Cancer Metastases at Radical Prostatectomy in the United States. *Eur Urol*. 2017;71(1):147-149. doi:10.1016/j.eururo.2016.06.036.
438. Rizzardi AE, Rosener NK, Koopmeiners JS, et al. Evaluation of protein biomarkers of prostate cancer aggressiveness. *BMC Cancer*. 2014;14:244.

doi:10.1186/1471-2407-14-244.

439. Zhong W, Qin G, Dai Q, et al. SOXs in human prostate cancer: implication as progression and prognosis factors. *BMC Cancer*. 2012;12(1):248.

doi:10.1186/1471-2407-12-248.