

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS**

**MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO
NEUROENDÓCRINA NO CARCINOMA PROSTÁTICO
RESISTENTE À CASTRAÇÃO**

MARCELO PIMENTEL

ORIENTADOR: PROF. DR. WALTER J. KOFF

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS**

**MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO
NEUROENDÓCRINA NO CARCINOMA PROSTÁTICO
RESISTENTE À CASTRAÇÃO**

MARCELO PIMENTEL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Walter José Koff

Porto Alegre

2011

Ao meu amor Sílvia
Pelo amor, carinho, incentivo e compreensão.

Ao meu irmão Maurício
Pelo grande estímulo e entusiasmo.

Aos meus pais Luís e Zonilse
Pelo exemplo de vida e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Deliu-Victor Matei, exemplo de médico e caráter, pelo inestimável auxílio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ottávio De Cobelli, pelo incentivo e confiança.

Ao Serviço de Patologia do Istituto Europeo di Oncologia, pelo apoio técnico e laboratorial.

Ao Dr. Edoardo Botteri, pelo auxílio na análise estatística e elaboração dos gráficos.

Ao Prof. Dr. Walter J. Koff, pelo ensinamento urológico, orientação e oportunidade de realizar o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Brasil da Silva Neto, pela amizade, disponibilidade, auxílio e estímulo à realização do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Milton Berger, pelo incentivo à realização do Mestrado.

Ao Dr. Cláudio Morales, pelo apoio e cuidado aos meus pacientes durante minhas ausências.

Às secretárias Estela Maris Araripe e Norma da Silva, pela disponibilidade, atenção e eficiência.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela minha formação médica.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Câncer de próstata.....	10
1.1.1 <i>Epidemiologia</i>	10
1.1.2 <i>Tratamento</i>	11
1.1.3 <i>Câncer de próstata resistente à castração</i>	12
1.2 Componente neuroendócrino na próstata normal.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Diferenciação neuroendócrina no câncer de próstata.....	17
2.1.1 <i>Introdução</i>	17
2.1.2 <i>Metodologia</i>	18
2.1.3 <i>Origem e características das células neuroendócrinas</i>	18
2.1.4 <i>Detecção da diferenciação neuroendócrina</i>	19
2.1.5 <i>Relação entre diferenciação neuroendócrina e características clínicas</i>	21
2.1.6 <i>Valor prognóstico da diferenciação neuroendócrina</i>	23
2.1.7 <i>Possibilidades terapêuticas</i>	24
2.1.8 <i>Conclusão</i>	25
3 OBJETIVOS	27
4 REFERÊNCIAS	28
5 ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS	39
6 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

BA	Bloqueio androgênico
CaP	Câncer de próstata
CgA	Cromogranina A
COX 2	Cicloxigenase 2
CaPRC	Câncer de próstata resistente à castração
DNE	Diferenciação neuroendócrina
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
IH	Imunohistoquímica
keV	Quilo elétron-volt
LHRH	Hormônio luteinizante
MBq	Mega becquerel
NE	Neuroendócrina

PET/CT	Tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada
PR	Prostatectomia radical
PSA	Antígeno prostático específico
RA	Receptor androgênico
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único
SST	Somatostatina
SSTR	Receptor para somatostatina
s-CgA	Cromogranina A sérica
t-CgA	Cromogranina A tecidual

LISTA DE FIGURAS

Artigo em português

Figura 1: CgA sérica e presença do receptor androgênico nas células neoplásicas.....	65
Figura 2: Sobrevida global após o diagnóstico de CaPRC de acordo com a CgA sérica.....	66
Figura 3: Sobrevida global após o diagnóstico de CaPRC de acordo com a presença de células neoplásicas positivas para CgA.....	67
Figura 4: Sobrevida global após o diagnóstico de CaPRC de acordo com a presença de células neoplásicas positivas para SSTR2.....	68

Artigo em inglês

Figure 1: Serum CgA and androgen receptor in neoplastic cells.....	93
Figure 2: Overall survival after CRPCa diagnosis according to serum CgA levels.....	94
Figure 3: Overall survival after CRPCa diagnosis according to presence of CgA positive neoplastic cells.....	95
Figure 4: Overall survival after CRPCa diagnosis according to presence of SSTR2 positive neoplastic cells.....	96

LISTA DE TABELAS

Artigo em português

Tabela 1: Características dos pacientes estudados..	62
Tabela 2: Características clínicas e sua relação com análise sérica e imunohistoquímica de DNE ..	63
Tabela 3: Cromogranina A sérica e parâmetros imunohistoquímicos.....	64

Artigo em inglês

Table 1: Patients characteristics..	90
Table 2: Clinical characteristics and relation with serum and immunohistochemical NED analysis ..	91
Table 3: Serum CgA and immunohistochemical parameters ..	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Próstata

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de próstata (CaP) é reconhecido atualmente como um dos problemas de saúde mais importantes que afetam a população masculina. A incidência do CaP tem aumentado na maioria dos países ocidentais durante os últimos quinze anos (1). Dentre os fatores responsáveis por esse aumento estão o grande número de biópsias prostáticas realizadas, o aumento do número de fragmentos coletados em cada biópsia, o aumento da expectativa de vida da população e o uso do antígeno prostático específico (PSA) como forma de rastreamento de tumores assintomáticos (2).

No mundo, o CaP é a segundo câncer mais diagnosticado em homens, com cerca de 903.000 novos casos e 258.000 mortes por ano (3). Nos Estados Unidos da América são estimados 217.000 novos casos de CaP em 2010, sendo responsável por 32.000 mortes. O CaP é a neoplasia sólida mais comum em homens, excetuando-se tumores de pele não-melanoma, e a segunda causa de morte por câncer, estando atrás somente do câncer de

pulmão (4). Considerando-se os casos detectados entre 1999 e 2005, cerca de 90% dos casos de CaP são diagnosticados em estágios locais ou regionais, e somente 10% apresentam lesões à distância (4). No Brasil, são estimados 52.000 novos casos de CaP para o ano de 2010, o que corresponde a um risco estimado de 54 casos novos a cada 100 mil homens. Excluindo-se os tumores de pele não-melanoma é o câncer com a maior incidência em homens. O CaP é a segunda causa de mortalidade por câncer no país, sendo superado somente pelo câncer de pulmão (5).

1.1.2 Tratamento

O tratamento do CaP depende do grau de extensão da neoplasia, sendo diferenciado para pacientes com doença localizada ou avançada. Em pacientes com CaP localizado as alternativas de tratamento são vigilância ativa, prostatectomia radical, radioterapia externa e braquiterapia. Em uma coorte recente em que foram estudados 7.538 homens, a prostatectomia radical (PR) foi associada a uma significativa diminuição da mortalidade quando comparada à radioterapia externa (6). Além disso, a PR é o único tratamento para CaP localizado que demonstrou benefício na sobrevida câncer-específica quando comparada ao manejo conservador em ensaio clínico prospectivo randomizado (7). Entretanto, não é possível afirmar categoricamente que uma terapia é claramente superior à outra, visto que não foram publicados estudos contemporâneos com pacientes randomizados para as diferentes modalidades terapêuticas existentes.

Tumores que apresentam clinicamente invasão extracapsular apresentam um risco maior de metástases linfonodais, margens cirúrgicas positivas e recidiva de doença após o tratamento inicial (8). Embora ainda tema de discussão, evidências recentes têm demonstrado que a PR apresenta bons resultados mesmo em pacientes com doença localmente avançada, quando inserida como parte de uma estratégia terapêutica multimodal, com sobrevida câncer-específica de 95%, 90% e 79% aos 5, 10 e 15 anos, respectivamente (9, 10).

Para pacientes que apresentam CaP avançado ou metastático o tratamento é baseado na deprivação ou bloqueio androgênico (BA). O BA pode ser obtido através da orquiectomia bilateral, análogos do agonista de liberação do hormônio luteinizante (LHRH), anti-androgênicos esteróides e não esteróides ou estrogênios. Apesar de apresentar resultados iniciais satisfatórios, com considerável período de remissão, a grande maioria dos pacientes tratados com BA acaba progredindo para um estágio de resistência ao tratamento hormonal, denominado câncer de próstata resistente à castração (11, 12).

1.1.3 Câncer de próstata resistente à castração

O termo câncer de próstata resistente à castração (CaPRC) tem sido utilizado como sinônimo de câncer de próstata andrógeno-independente e câncer de próstata hormônio-refratário. Atualmente a denominação CaPRC é preferida pelo fato de alguns pacientes

nesse estágio de doença ainda responderem a tratamentos que bloqueiam o crescimento tumoral estimulado por andrógenos (11, 13). O CaPRC é definido pela presença de três ou mais aumentos sucessivos do PSA sobre o seu nadir, com testosterona em níveis de castração e após suspensão do anti-androgênico por pelo menos quatro semanas, e/ou progressão radiológica (14).

Conforme recente revisão de Bonkhoff (13), os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do CaPRC são multifatoriais e heterogêneos, podendo-se citar dentre eles:

- aumento da expressão e da sensibilidade do receptor androgênico (RA) nas células prostáticas tumorais, mantendo assim a atividade do RA mesmo com baixas concentrações de andrógenos durante o BA;
- ativação do RA por testosterona e dihidrotestosterona produzidas pelas próprias células tumorais a partir do colesterol;
- mutações no RA permitindo sua ativação através de esteróides como estrógenos e progestágenos; essas mutações permitiriam inclusive a conversão de antagonistas, como bicalutamida e flutamida, em agonistas, constituindo a base molecular que justifica a melhora clínica observada em alguns pacientes com a retirada dos anti-androgênicos;
- aumento contínuo da população de células neoplásicas, mesmo durante o BA, pela ação de células-tronco prostáticas;
- ação de mecanismos de sobrevivência e proliferação celular independentes da atividade do RA, como o aumento da expressão da proteína BCL-2, ação de agentes promotores da inflamação, como a enzima cicloxigenase 2 (COX-2), diferenciação neuroendócrina, entre outros.

As alternativas terapêuticas nos casos de CaPRC são limitadas. Mitoxantrona (15), isótopos radioativos (16) e ácido zoledrônico (17) têm sido utilizados para melhora sintomática. Apenas o quimioterápico docetaxel demonstrou melhora na sobrevida nesses pacientes, com um aumento mediano de 2,4 meses em comparação com a mitoxantrona (18, 19). Mais recentemente, o emprego de imunoterapia celular autóloga também demonstrou pequeno aumento (4,1 meses) na sobrevida mediana de pacientes com CaPRC (20).

Desse modo, torna-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para pacientes nesse estágio avançado de doença. Dentre as terapias em estudo estão os agentes direcionados a combater a diferenciação neuroendócrina (DNE), destacando-se os análogos da somatostatina e os agentes citotóxicos conjugados à somatostatina (21-23). Entretanto, um pré-requisito essencial para a ação de terapias direcionadas a receptores específicos é a própria presença desses receptores no tecido alvo, tornando-se necessária a sua detecção no tecido tumoral prostático do paciente.

1.2 Componente neuroendócrino na próstata normal

A glândula prostática apresenta um epitélio glandular rodeado por estroma fibromuscular. O epitélio glandular pode ser subdividido em células secretoras e células basais. Um terceiro tipo de célula epitelial foi descrito inicialmente por Pretl em 1944, caracterizada por apresentar propriedades de células endócrinas e neurônios, sendo

denominada de célula neuroendócrina (NE) (24). A origem das células NE na próstata ainda não está completamente estabelecida. Alguns estudos sugerem que as células secretoras, basais e NE se originariam a partir de uma célula-tronco endodérmica comum (25), enquanto outros mostraram evidências de que as células NE representariam uma linhagem própria, de origem neurogênica e distinta das células secretoras e basais (26).

As células NE são pós-mitóticas e não apresentam atividade proliferativa, sendo, portanto, negativas ao antígeno de proliferação celular Ki-67. Além disso, não expressam receptor androgênico, indicando que são células insensíveis aos andrógenos (23, 27). No citoplasma das células NE prostáticas são encontrados grânulos de armazenagem de hormônios peptídeos e pró-hormônios. Dentre esses produtos estão a cromogranina A (CgA), enolase neurônio-específica, cromogranina B e somatostatina. O papel fisiológico das células NE na próstata ainda não é completamente conhecido. Estudos apontam que essas células estariam envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação celular, homeostasia e secreção prostática (28). Sua atividade seria exercida através da ação parácrina, autócrina e endócrina de seus produtos.

O principal produto das células NE prostáticas é a CgA, proteína ácida encontrada em grânulos secretórios de uma grande variedade de células endócrinas e neurônios (28). O papel fisiológico da CgA ainda não é completamente conhecido, podendo agir como um precursor de peptídeos ativos como vasostatina, pancreastina e cromostatina ou também como um agente regulatório dos processos de secreção desses produtos. A CgA é fisiologicamente liberada por exocitose, podendo ser detectada e dosada no sangue por imunoensaio (29-31).

Outro produto das células NE é a somatostatina (SST), peptídeo composto por 14 ou 28 aminoácidos, descrito inicialmente como um hormônio hipotalâmico (32) e posteriormente detectado também no sistema nervoso periférico, pâncreas, tireóide, adrenais, fígado, cólon, intestino delgado, estômago e próstata. A SST inibe a secreção de vários hormônios, glândulas exócrinas e a motilidade intestinal. Na célula prostática a SST apresenta efeito antiproliferativo, induzindo a parada no ciclo de reprodução celular e apoptose (33). A ação da SST nos diferentes órgãos e tecidos ocorre através da ativação de receptores específicos divididos em cinco subtipos (SSTR1-5) (34), sendo que a presença desses receptores foi detectada no tecido prostático normal e neoplásico (35).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diferenciação neuroendócrina no câncer de próstata

2.1.1 Introdução

A diferenciação neuroendócrina (DNE) no câncer de próstata (CaP) vem atraindo atenção em função do seu potencial papel como marcador diagnóstico, prognóstico e também como possível alvo para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Ainda não existe um conceito plenamente aceito sobre a DNE no CaP. Normalmente a DNE é caracterizada pela presença de grupamentos de células apresentando características NE dispersas em uma população predominante de células típicas do adenocarcinoma prostático (23). Essa situação se diferencia do tumor carcinóide e do carcinoma de pequenas células da próstata (carcinoma neuroendócrino), tumores raros e de alta

agressividade, nos quais a quase totalidade das células tumorais apresenta características NE (36).

2.1.2 Metodologia

Foi realizado levantamento bibliográfico não-sistemático no Medline de artigos publicados em língua inglesa de 1990 até 2010.

2.1.3 Origem e características das células neuroendócrinas no câncer de próstata

Assim como na próstata normal, a origem das células com DNE no CaP ainda não está claramente determinada. As células NE no CaP são morfologicamente diferentes das encontradas no tecido prostático benigno e algumas vezes apresentam co-expressão de marcadores epiteliais (PSA) e neuroendócrinos (CgA) (24). Desse modo, acredita-se que as células com DNE no CaP sejam originadas a partir da transdiferenciação de células epiteliais malignas, que passam a apresentar o fenótipo de células NE, e não a partir da transformação maligna de células NE do tecido prostático normal (37).

As células NE apresentam algumas características que poderiam contribuir para uma maior agressividade ao tumor apresentando DNE. Expressam potentes neuropeptídeos que atuam como mediadores em diversos processos biológicos, como crescimento celular, diferenciação, transformação e invasão. Jongasma (38) demonstrou que a proliferação de linhagens celulares de CaP em condições de privação androgênica pode ser modulada por

neuropeptídeos produzidos por células NE. O marcador de células-tronco CD44 é encontrado nas células NE do CaP, indicando que essas células apresentam também algumas das características presentes nas células-tronco (39). Além disso, as células NE apresentam a capacidade de escapar à morte celular programada (apoptose), representando uma população de células neoplásicas potencialmente mais resistentes (40). Como não apresentam receptor androgênico, podem servir como fonte de fatores parácrinos envolvidos no crescimento e progressão do CaP mesmo durante o BA, contribuindo para o desenvolvimento do CaPRC (41).

2.1.4 Detecção da diferenciação neuroendócrina

As células malignas com DNE podem ser detectadas através de análise imunohistoquímica (IH) no tecido prostático tumoral utilizando-se anticorpos específicos contra seus produtos. Além disso, alguns desses produtos são liberados na corrente sanguínea, permitindo sua dosagem sérica por imunoensaio (28). A cromogranina A (CgA) é o principal produto das células NE e tem sido utilizada como marcador da DNE no CaP através da sua detecção no tecido tumoral prostático por IH (t-CgA) ou dosagem sérica (s-CgA) (23, 24, 28). O uso de marcador sérico ou tecidual para caracterizar a DNE ainda é objeto de discussão na literatura. A detecção IH dos produtos NE indicaria depósito, mas não necessariamente produção ou secreção desses produtos. Além disso, existe a dificuldade em se obter amostra tecidual que represente adequadamente todo o tecido neoplásico, especialmente em pacientes previamente submetidos à prostatectomia radical.

Por outro lado, a utilização de marcadores séricos poderia representar melhor a DNE de todo o tumor e também de suas metástases. Entretanto, a presença de produtos NE na corrente sanguínea pode não representar exatamente a atividade NE, visto que para a ação desses produtos é necessária a presença de receptores específicos no tecido prostático (28, 42).

Uma modalidade relativamente nova utilizada na detecção *in vivo* de tumores com DNE é a cintilografia para receptores da somatostatina (Octreoscan), que utiliza o análogo da somatostatina octreotide marcado com índio-111 (43, 44). Através desse método, a presença de DNE tanto na próstata como em possíveis metástases poderia ser detectada. São poucos os estudos avaliando o uso do Octreoscan no CaPRC. Nilsson (45) encontrou resultados positivos em 94% de 31 pacientes, mas somente 37% das metástases ósseas detectadas na cintilografia convencional apresentaram captação ao Octreoscan. Novos estudos apresentaram um percentual menor de positividade ao Octreoscan: 85% em uma série de 20 pacientes, todos com baixa captação (46), e apenas 37% de 20 casos (47). Mais recentemente, a tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada (PET/CT) utilizando o fármaco DOTATOC, que apresenta afinidade ao receptor tipo 2 da somatostatina, foi avaliada em um pequeno grupo de pacientes com CaP metastático, apresentando resultados iniciais pouco promissores (48).

A prevalência de DNE no CaP relatada na literatura varia de 10 a 100%, dependendo da definição para DNE utilizada, método e população estudada (49-59). Analisando tecido prostático obtido por biópsia em uma população de pacientes com CaP predominantemente localizado ou localmente avançado, Berruti relatou a presença de t-CgA em 46% dos casos. Ishida (60) detectou a presença de células com DNE em 36% dos

pacientes analisando tecido obtido em prostatectomia radical. Considerando somente pacientes com CaPRC, Cabrespine (58) e Berruti (61) encontraram um aumento da s-CgA em 45% e 43% dos pacientes, respectivamente; enquanto que examinando tecido de autópsia em um subgrupo de 15 pacientes, Casella (50) demonstrou a presença de células positivas para CgA no tecido prostático tumoral em 80% dos casos.

2.1.5 Relação entre diferenciação neuroendócrina e características clínicas

Alguns estudos investigaram a associação de marcadores séricos e teciduais de DNE entre si e com variáveis clínicas no CaP. Angelsen (51) relatou associação positiva entre a s-CgA e o número de células positivas para t-CgA ao exame IH. Entretanto, nessa série estudou-se um número limitado de pacientes, apenas 22, sendo que apenas nove pacientes estavam em tratamento hormonal. Além disso, a amostra de tecido prostático analisada foi obtida através de ressecção transuretral, e não biópsia prostática. Do mesmo modo, em uma série maior de pacientes com CaP em diferentes estágios, Bollito (56) encontrou uma relação positiva entre a s-CgA e o achado IH de t-CgA em tecido de biópsia prostática. Nesse mesmo estudo, encontrou-se também uma associação entre a presença de t-CgA e um escore de Gleason mais elevado. Sciarra (53) também relatou associação positiva entre a s-CgA e o escore de Gleason em pacientes com CaP localizado ou metastático. Analisando tecido de biópsia prostática de pacientes com CaP recém-diagnosticado em diferentes estágios, Berruti (59) encontrou associação positiva entre t-CgA, escore de Gleason e estágio de doença, não sendo encontrada relação entre t-CgA e PSA. Por outro

lado, estudo conduzido por Yamada (62), avaliando biópsia prostática de pacientes com CaP metastático, não encontrou relação entre a presença de t-CgA e escore de Gleason ou PSA. Sasaki (63) também não encontrou relação entre s-CgA e PSA, demonstrando em seu estudo que durante o bloqueio androgênico (BA) elevação da s-CgA antecede a elevação do PSA. Considerando a relação entre DNE e BA, Hirano (52) comparou a presença de t-CgA em tecido prostático obtido em necropsia de pacientes apresentando CaPRC com tecido obtido em prostatectomia radical de pacientes com CaP localizado. A prevalência de DNE, representada pela t-CgA, foi significativamente maior nos pacientes com CaPRC e com maior tempo de BA. Achados semelhantes foram relatados por Sasaki (63) em uma coorte de pacientes com CaP metastático em tratamento com BA. Nesse estudo, a s-CgA foi utilizada como marcador da DNE, verificando-se um aumento significativo em seus níveis à medida que o tempo de BA se tornava mais longo, principalmente quando o paciente chegava ao estágio de CaPRC. Além do tempo, a modalidade de BA utilizado também parece estar relacionada ao surgimento de DNE. Sciarra (64) verificou que em pacientes com recidiva bioquímica de CaP pós-prostatectomia radical, a elevação da s-CgA foi significativamente maior nos pacientes tratados com castração química quando comparados aos pacientes tratados com o anti-andrógeno não-esteróide bicalutamida. Deve-se salientar que nesse estudo não foram incluídos pacientes com CaPRC. Em outro estudo conduzido por Sciarra (65) verificou-se que a elevação da s-CgA foi menor no grupo de pacientes tratado com BA total intermitente em comparação ao grupo tratado com BA total contínuo, contribuindo com mais uma evidência da influência do BA no desenvolvimento da DNE.

2.1.6 Valor prognóstico da diferenciação neuroendócrina

Dados relatados na literatura apresentam resultados conflitantes em relação ao valor prognóstico da DNE. Estudando pacientes com CaPRC, Taplin (66) verificou que níveis elevados de s-CgA estavam associados a uma redução significativa da sobrevida global. Do mesmo modo, estudos conduzidos por Berruti (61, 67) também relacionaram níveis elevados de s-CgA a um pior prognóstico nesses pacientes. Por outro lado, Cabrespine (58) não encontrou associação entre a s-CgA e pior prognóstico examinando pacientes com CaPRC.

Enquanto s-CgA tem sido associada a um pior prognóstico na maioria dos estudos, o valor prognóstico do marcador tecidual (t-CgA) apresenta resultados mais discordantes. Berruti (59) examinou a expressão de t-CgA, avaliada em biópsia prostática, em pacientes com CaP recém-diagnosticado em diferentes estágios, apontando uma relação direta entre a t-CgA e uma menor sobrevida. Também avaliando biópsia prostática, mas somente em pacientes com CaP metastático, Kokubo (57) relatou um menor tempo para recorrência nos pacientes que apresentavam uma maior expressão de t-CgA. Em contraste, examinando tecido obtido em prostatectomia radical, Ishida (60), Veltri (68) e Ahlgren (69) não encontraram associação entre a presença de t-CgA e pior prognóstico. Do mesmo modo, mas examinando tecido obtido a partir de biópsia prostática, Casella (50) e Yamada (62) não associaram a presença de t-CgA a um pior prognóstico em pacientes com CaP sem tratamento ou metastático, respectivamente. Esses resultados conflitantes em relação ao uso do marcador tecidual da DNE podem ser explicados, em parte, pelas populações heterogêneas de pacientes estudados, diferentes métodos de coleta do tecido prostático,

amostra limitada de tecido tumoral e a distribuição desigual das células NE no tecido prostático (24). Cabe ressaltar ainda que nenhum dos estudos publicados avaliando a t-CgA como marcador prognóstico examinou apenas pacientes com CaPRC, população para a qual esses resultados podem ter maior valor e aplicabilidade.

2.1.7 Possibilidades terapêuticas

A partir do momento em que se verifica a associação da DNE com o desenvolvimento do CaPRC surge inevitavelmente o questionamento da possibilidade do emprego de terapia direcionada à DNE no CaP. Como as células apresentando DNE podem expressar receptores para somatostatina, uma das possibilidades seria o emprego de seus análogos, como octreotide e lanreotide. Os análogos da somatostatina exerceriam sua atividade através de um efeito citotóxico direto e também indiretamente, pela inibição da liberação de fatores envolvidos no crescimento tumoral (70, 71). Estudo *in vitro*, utilizando células neoplásicas prostáticas positivas para SSTR2, demonstrou uma inibição da migração e capacidade de invasão celular com o uso de octreotide (72). Entretanto, estudos clínicos iniciais considerando o uso de análogos da somatostatina como monoterapia no CaPRC não obtiveram bons resultados (73). Estudos utilizando terapia combinada apresentam melhores resultados. Avaliando o uso de octreotide em conjunto com dexametasona, Koutsilieris (74) relatou declínio do PSA igual ou maior que 50% em 60% dos pacientes, além de melhora sintomática, com poucos efeitos adversos. Utilizando lanreotide em conjunto com etinilestradiol, Di Silverio relatou redução do PSA e melhora

sintomática em 90% dos pacientes (75). Em estudo utilizando linhagens de células tumorais hormônio-refratárias, Erten (76) relatou que a combinação de docetaxel com octreotide resultou em uma significativa ação sinérgica em relação a efeitos citotóxicos e indução de apoptose, efeito atribuído não somente pela inibição direta da proliferação celular, mas também pela inibição da secreção de fatores de crescimento. Os receptores para somatostatina presentes nas células neoplásicas também podem servir como alvo de análogos associados a agentes citotóxicos (21). Utilizando esse princípio, Nagy (77) associou o análogo da somatostatina RC-121 ao derivado da doxorrubicina AN-201, criando o agente citotóxico com afinidade para os receptores da somatostatina AN-238. Utilizado em estudos experimentais em animais com CaPRC, o AN-238 apresentou uma importante inibição do crescimento e redução do volume tumoral (77). Como os receptores da somatostatina são encontrados especialmente em células com rápida proliferação do trato gastrointestinal, alguns efeitos colaterais com o tratamento utilizando análogos citotóxicos podem ocorrer. Entretanto, no estudo experimental acima mencionado não foram relatados efeitos colaterais graves, indicando que o possível dano causado pelo AN-238 aos tecidos normais expressando receptores para somatostatina possa ser limitado.

2.1.8 Conclusão

A diferenciação neuroendócrina (DNE) é um dos fatores envolvidos no desenvolvimento do CaPRC. A DNE pode ser detectada através de marcadores séricos e teciduais, sendo que a cromogranina A sérica (s-CgA) e tissular (t-CgA) são os marcadores

mais utilizados. Como não existe uma definição precisa da DNE, sua prevalência na literatura em pacientes com CaP apresenta grande variabilidade. Na maioria dos estudos, a presença de DNE está associada a tumores mais agressivos e de pior prognóstico, entretanto alguns resultados ainda são conflitantes, principalmente em relação ao seu marcador tecidual (t-CgA). Novas modalidades terapêuticas para pacientes com CaPRC, direcionadas à DNE, estão em desenvolvimento e apresentam resultados iniciais animadores. Mais estudos ainda são necessários, objetivando definir de uma maneira mais precisa a presença e o papel da DNE, especialmente em pacientes com CaPRC, onde o desenvolvimento de novas terapias é essencial.

3 OBJETIVOS:

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a presença de diferenciação neuroendócrina em uma população de pacientes com câncer de próstata resistente à castração, determinada pela cromogranina A sérica, expressão imunohistoquímica da cromogranina A e receptor para somatostatina subtipo 2 e cintilografia para receptores da somatostatina.

Os objetivos secundários deste estudo foram avaliar a associação entre os marcadores de diferenciação neuroendócrina com características clínicas; o valor prognóstico desses marcadores; a expressão imunohistoquímica do receptor androgênico e do índice de proliferação celular Ki-67.

4 REFERÊNCIAS

1. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part II: individual countries. *BJU Int.* 2002 Jul;90(2):174-84.
2. Rietbergen JB, Hoedemaeker RF, Kruger AE, Kirkels WJ, Schroder FH. The changing pattern of prostate cancer at the time of diagnosis: characteristics of screen detected prostate cancer in a population based screening study. *J Urol.* 1999 Apr;161(4):1192-8.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010 Jun 17.
4. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
5. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2010 Incidência de Câncer no Brasil. 2010 [acesso em Setembro 2010]; Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>.

6. Cooperberg MR, Vickers AJ, Broering JM, Carroll PR. Comparative risk-adjusted mortality outcomes after primary surgery, radiotherapy, or androgen-deprivation therapy for localized prostate cancer. *Cancer*. 2010 Aug 5.
7. Bill-Axelsson A, Holmberg L, Ruutu M, Haggman M, Andersson SO, Bratell S, et al. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med*. 2005 May 12;352(19):1977-84.
8. Swindle P, Eastham JA, Ohori M, Kattan MW, Wheeler T, Maru N, et al. Do margins matter? The prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol*. 2008 May;179(5 Suppl):S47-51.
9. Ward JF, Slezak JM, Blute ML, Bergstralh EJ, Zincke H. Radical prostatectomy for clinically advanced (cT3) prostate cancer since the advent of prostate-specific antigen testing: 15-year outcome. *BJU Int*. 2005 Apr;95(6):751-6.
10. Thompson IM, Tangen CM, Paradelo J, Lucia MS, Miller G, Troyer D, et al. Adjuvant radiotherapy for pathological T3N0M0 prostate cancer significantly reduces risk of metastases and improves survival: long-term followup of a randomized clinical trial. *J Urol*. 2009 Mar;181(3):956-62.
11. Chi KN, Bjartell A, Dearnaley D, Saad F, Schroder FH, Sternberg C, et al. Castration-resistant prostate cancer: from new pathophysiology to new treatment targets. *Eur Urol*. 2009 Oct;56(4):594-605.
12. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001 Oct;1(1):34-45.
13. Bonkhoff H, Berges R. From pathogenesis to prevention of castration resistant prostate cancer. *Prostate*. 2010 Jan 1;70(1):100-12.

14. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, et al. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol.* 2008 Jan;53(1):68-80.
15. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol.* 1996 Jun;14(6):1756-64.
16. Oosterhof GO, Roberts JT, de Reijke TM, Engelholm SA, Horenblas S, von der Maase H, et al. Strontium(89) chloride versus palliative local field radiotherapy in patients with hormonal escaped prostate cancer: a phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Genitourinary Group. *Eur Urol.* 2003 Nov;44(5):519-26.
17. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Oct 2;94(19):1458-68.
18. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004 Oct 7;351(15):1502-12.
19. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004 Oct 7;351(15):1513-20.
20. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010 Jul 29;363(5):411-22.

21. Stangelberger A, Schally AV, Djavan B. New treatment approaches for prostate cancer based on peptide analogues. *Eur Urol.* 2008 May;53(5):890-900.
22. Sciarra A, Cardi A, Dattilo C, Mariotti G, Di Monaco F, Di Silverio F. New perspective in the management of neuroendocrine differentiation in prostate adenocarcinoma. *Int J Clin Pract.* 2006 Apr;60(4):462-70.
23. Komiya A, Suzuki H, Imamoto T, Kamiya N, Nihei N, Naya Y, et al. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *Int J Urol.* 2009 Jan;16(1):37-44.
24. Vashchenko N, Abrahamsson PA. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *Eur Urol.* 2005 Feb;47(2):147-55.
25. Huss WJ, Gray DR, Werdin ES, Funkhouser WK, Jr., Smith GJ. Evidence of pluripotent human prostate stem cells in a human prostate primary xenograft model. *Prostate.* 2004 Jul 1;60(2):77-90.
26. Aumuller G, Leonhardt M, Janssen M, Konrad L, Bjartell A, Abrahamsson PA. Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology.* 1999 May;53(5):1041-8.
27. Huang J, Yao JL, di Sant'Agnesse PA, Yang Q, Bourne PA, Na Y. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. *Prostate.* 2006 Sep 15;66(13):1399-406.
28. Sciarra A, Mariotti G, Gentile V, Voria G, Pastore A, Monti S, et al. Neuroendocrine differentiation in human prostate tissue: is it detectable and treatable? *BJU Int.* 2003 Mar;91(5):438-45.

29. Koshimizu H, Kim T, Cawley NX, Loh YP. Chromogranin A: a new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis. *Regul Pept.* 2010 Feb 25;160(1-3):153-9.
30. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med.* 2003 Mar 20;348(12):1134-49.
31. Glinicki P, Jeske W. Chromogranin A (CgA)--the influence of various factors in vivo and in vitro, and existing disorders on it's concentration in blood. *Endokrynol Pol.* 2010 Jul-Aug;61(4):384-7.
32. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science.* 1973 Jan 5;179(68):77-9.
33. Brevini TA, Bianchi R, Motta M. Direct inhibitory effect of somatostatin on the growth of the human prostatic cancer cell line LNCaP: possible mechanism of action. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Sep;77(3):626-31.
34. Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family. *Life Sci.* 1995;57(13):1249-65.
35. Morichetti D, Mazzucchelli R, Santinelli A, Stramazzotti D, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, et al. Immunohistochemical expression and localization of somatostatin receptor subtypes in prostate cancer with neuroendocrine differentiation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010 Apr-Jun;23(2):511-22.
36. Mazzucchelli R, Morichetti D, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, et al. Neuroendocrine tumours of the urinary system and male genital organs: clinical significance. *BJU Int.* 2009 Jun;103(11):1464-70.

37. Yuan TC, Veeramani S, Lin MF. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Sep;14(3):531-47.
38. Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, Romijn JC, van Der Kwast TH, Schroder FH, et al. Androgen-independent growth is induced by neuropeptides in human prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2000 Jan;42(1):34-44.
39. Palapattu GS, Wu C, Silvers CR, Martin HB, Williams K, Salamone L, et al. Selective expression of CD44, a putative prostate cancer stem cell marker, in neuroendocrine tumor cells of human prostate cancer. *Prostate*. 2009 May 15;69(7):787-98.
40. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 2002 Oct 1;53(2):118-23.
41. Nelson EC, Cambio AJ, Yang JC, Ok JH, Lara PN, Jr., Evans CP. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2007;10(1):6-14.
42. Cohen MK, Arber DA, Coffield KS, Keegan GT, McClintock J, Speights VO, Jr. Neuroendocrine differentiation in prostatic adenocarcinoma and its relationship to tumor progression. *Cancer*. 1994 Oct 1;74(7):1899-903.
43. Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY, et al. Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]- and [¹²³I-Tyr³]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med*. 1993 Aug;20(8):716-31.
44. Reubi JC, Maecke HR. Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med*. 2008 Nov;49(11):1735-8.

45. Nilsson S, Reubi JC, Kalkner KM, Laissue JA, Horisberger U, Olerud C, et al. Metastatic hormone-refractory prostatic adenocarcinoma expresses somatostatin receptors and is visualized in vivo by [¹¹¹In]-labeled DTPA-D-[Phe¹]-octreotide scintigraphy. *Cancer Res.* 1995 Dec 1;55(23 Suppl):5805s-10s.
46. Kalkner KM, Acosta S, Thorsson O, Frederiksen H, Nilsson A, Gustavsson B, et al. Octreotide scintigraphy and Chromogranin A do not predict clinical response in patients with octreotide acetate-treated hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2006;9(1):92-8.
47. Mencobonii M, Tredici S, Rebella L, Bergaglio M, Galbusera V, Manzara A, et al. Effect of chemotherapy on somatostatin receptor detection with octreotide scintigraphy in hormone-refractory prostate cancer patients. *Anticancer Res.* 2006 May-Jun;26(3B):2233-5.
48. Luboldt W, Zophel K, Wunderlich G, Abramyuk A, Luboldt HJ, Kotzerke J. Visualization of somatostatin receptors in prostate cancer and its bone metastases with Ga-68-DOTATOC PET/CT. *Mol Imaging Biol.* 2010 Jan-Feb;12(1):78-84.
49. Abrahamsson PA. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate.* 1999 May;39(2):135-48.
50. Casella R, Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC. Focal neuroendocrine differentiation lacks prognostic significance in prostate core needle biopsies. *J Urol.* 1998 Aug;160(2):406-10.
51. Angelsen A, Syversen U, Haugen OA, Stridsberg M, Mjølnerod OK, Waldum HL. Neuroendocrine differentiation in carcinomas of the prostate: do neuroendocrine serum markers reflect immunohistochemical findings? *Prostate.* 1997 Jan 1;30(1):1-6.

52. Hirano D, Okada Y, Minei S, Takimoto Y, Nemoto N. Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *Eur Urol.* 2004 May;45(5):586-92; discussion 92.
53. Sciarra A, Di Silverio F, Autran AM, Salciccia S, Gentilucci A, Alfarone A, et al. Distribution of high chromogranin A serum levels in patients with nonmetastatic and metastatic prostate adenocarcinoma. *Urol Int.* 2009;82(2):147-51.
54. Theodoropoulos VE, Tsigka A, Mihalopoulou A, Tsoukala V, Lazaris AC, Patsouris E, et al. Evaluation of neuroendocrine staining and androgen receptor expression in incidental prostatic adenocarcinoma: prognostic implications. *Urology.* 2005 Oct;66(4):897-902.
55. di Sant'Agnese PA. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: an update on recent developments. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 2:S135-40.
56. Bollito E, Berruti A, Bellina M, Mosca A, Leonardo E, Tarabuzzi R, et al. Relationship between neuroendocrine features and prognostic parameters in human prostate adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 2:S159-64.
57. Kokubo H, Yamada Y, Nishio Y, Fukatsu H, Honda N, Nakagawa A, et al. Immunohistochemical study of chromogranin A in Stage D2 prostate cancer. *Urology.* 2005 Jul;66(1):135-40.
58. Cabrespine A, Guy L, Gachon F, Cure H, Chollet P, Bay JO. Circulating chromogranin a and hormone refractory prostate cancer chemotherapy. *J Urol.* 2006 Apr;175(4):1347-52.
59. Berruti A, Bollito E, Cracco CM, Volante M, Ciccone G, Porpiglia F, et al. The prognostic role of immunohistochemical chromogranin a expression in prostate cancer

patients is significantly modified by androgen-deprivation therapy. *Prostate*. 2010 May 15;70(7):718-26.

60. Ishida E, Nakamura M, Shimada K, Tasaki M, Konishi N. Immunohistochemical analysis of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Pathobiology*. 2009;76(1):30-8.

61. Berruti A, Mosca A, Tucci M, Terrone C, Torta M, Tarabuzzi R, et al. Independent prognostic role of circulating chromogranin A in prostate cancer patients with hormone-refractory disease. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Mar;12(1):109-17.

62. Yamada Y, Nakamura K, Aoki S, Taki T, Naruse K, Matsubara H, et al. An immunohistochemical study of chromogranin A and human epidermal growth factor-2 expression using initial prostate biopsy specimens from patients with bone metastatic prostate cancer. *BJU Int*. 2007 Jan;99(1):189-95.

63. Sasaki T, Komiya A, Suzuki H, Shimbo M, Ueda T, Akakura K, et al. Changes in chromogranin a serum levels during endocrine therapy in metastatic prostate cancer patients. *Eur Urol*. 2005 Aug;48(2):224-9; discussion 9-30.

64. Sciarra A, Di Silverio F. Effect of nonsteroidal antiandrogen monotherapy versus castration therapy on neuroendocrine differentiation in prostate carcinoma. *Urology*. 2004 Mar;63(3):523-7.

65. Sciarra A, Monti S, Gentile V, Mariotti G, Cardi A, Voria G, et al. Variation in chromogranin A serum levels during intermittent versus continuous androgen deprivation therapy for prostate adenocarcinoma. *Prostate*. 2003 May 15;55(3):168-79.

66. Taplin ME, George DJ, Halabi S, Sanford B, Febbo PG, Hennessy KT, et al. Prognostic significance of plasma chromogranin a levels in patients with hormone-

refractory prostate cancer treated in Cancer and Leukemia Group B 9480 study. *Urology*. 2005 Aug;66(2):386-91.

67. Berruti A, Dogliotti L, Mosca A, Bellina M, Mari M, Torta M, et al. Circulating neuroendocrine markers in patients with prostate carcinoma. *Cancer*. 2000 Jun 1;88(11):2590-7.

68. Veltri RW, Isharwal S, Miller MC, Epstein JI, Mangold LA, Humphreys E, et al. Long-term assessment of prostate cancer progression free survival: evaluation of pathological parameters, nuclear shape and molecular biomarkers of pathogenesis. *Prostate*. 2008 Dec 1;68(16):1806-15.

69. Ahlegren G, Pedersen K, Lundberg S, Aus G, Hugosson J, Abrahamsson P. Neuroendocrine differentiation is not prognostic of failure after radical prostatectomy but correlates with tumor volume. *Urology*. 2000 Dec 20;56(6):1011-5.

70. Liu Y. Radiolabelled somatostatin analog therapy in prostate cancer: current status and future directions. *Cancer Lett*. 2006 Jul 28;239(1):21-6.

71. Friedlander TW, Weinberg VK, Small EJ, Sharibb SJ, Harzstark AL, Lin AM, et al. Effect of the somatostatin analog octreotide acetate on circulating insulin-like growth factor-1 and related peptides in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer: Results of a phase II study. *Urol Oncol*. 2010 Sep 28.

72. Tang X, Takekoshi S, Itoh J, Umemura S, Shoji S, Terachi T, et al. Somatostatin analogue inhibits the mobility of prostate carcinoma cells: a new therapeutic method for advanced prostate carcinoma. *Int J Oncol*. 2010 Nov;37(5):1077-83.

73. Maulard C, Richaud P, Droz JP, Jessueld D, Dufour-Esquerre F, Housset M. Phase I-II study of the somatostatin analogue lanreotide in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;36(3):259-62.
74. Koutsilieris M, Mitsiades CS, Bogdanos J, Dimopoulos T, Karamanolakis D, Milathianakis C, et al. Combination of somatostatin analog, dexamethasone, and standard androgen ablation therapy in stage D3 prostate cancer patients with bone metastases. *Clin Cancer Res.* 2004 Jul 1;10(13):4398-405.
75. Di Silverio F, Sciarra A. Combination therapy of ethinylestradiol and somatostatin analogue reintroduces objective clinical responses and decreases chromogranin a in patients with androgen ablation refractory prostate cancer. *J Urol.* 2003 Nov;170(5):1812-6.
76. Erten C, Karaca B, Kucukzeybek Y, Gorumlu G, Cengiz E, Gul MK, et al. Regulation of growth factors in hormone- and drug-resistant prostate cancer cells by synergistic combination of docetaxel and octreotide. *BJU Int.* 2009 Jul;104(1):107-14.
77. Nagy A, Schally AV. Targeting cytotoxic conjugates of somatostatin, luteinizing hormone-releasing hormone and bombesin to cancers expressing their receptors: a "smarter" chemotherapy. *Curr Pharm Des.* 2005;11(9):1167-80.

5 ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO NEUROENDÓCRINA NO CÂNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE À CASTRAÇÃO: ABORDAGEM DIAGNÓSTICA SISTEMÁTICA

Marcelo Pimentel^{a,b}, Deliu-Victor Matei^a, Giuseppe Renne^a, Maria Teresa Sandri^a, Edoardo Botteri^a, Concetta de Cicco^a, Walter Jose Koff^b, Ottavio de Cobelli^a

^a Instituto Europeu de Oncologia, Milão, Itália

^b Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

RESUMO ESTRUTURADO

INTRODUÇÃO: a diferenciação neuroendócrina (DNE) tem sido associada com o desenvolvimento do câncer de próstata resistente à castração (CaPRC). Estudos prévios tentando caracterizar a DNE no CaPRC apresentaram resultados controversos. O objetivo desse estudo foi melhor estabelecer a presença e o significado prognóstico da DNE no CaPRC.

MÉTODOS: quarenta e sete pacientes com CaPRC participaram do estudo. A expressão tecidual de CgA (t-CgA), índice de proliferação celular Ki-67, receptor androgênico (RA) e receptor da somatostatina subtipo 2 (SSTR2) foi avaliada por análise imunohistoquímica em biópsias prostáticas. A CgA sérica (s-CgA) foi avaliada por imunoensaio. Vinte e seis pacientes foram submetidos à cintilografia para receptores da somatostatina (Octreoscan).

RESULTADOS: s-CgA estava elevada em 25 (54%) pacientes, t-CgA presente em 26 (67% dos pacientes com biópsia positiva) e SSTR2 em 22 (58% dos pacientes com biópsia positiva). Octreoscan foi positiva em 4 (15%) pacientes. O RA foi positivo em 20 (51%) dos pacientes. Houve uma tendência de associação entre t-CgA e s-CgA elevada ($p=0.09$). Cromogranina A sérica foi associada com PSA elevado no momento da avaliação da DNE ($p=0.04$) e t-CgA com o escore de Gleason inicial ($p=0.03$). A presença de SSTR2 não foi associada com nenhum dos parâmetros estudados. Em análise multivariada, $s\text{-CgA} \geq 36$ U/l foi associada a uma redução na sobrevida global (HR 1.8, 95% IC 1.3-2.5, $P=0.004$). CgA tecidual foi associada com uma redução na sobrevida sem significância estatística ($p=0.31$), enquanto que o SSTR2 foi associado a uma melhor sobrevida, também sem significância estatística (HR 0.69, 95% IC 0.3-1.52).

CONCLUSÕES: Foi encontrada uma prevalência elevada de DNE nessa população de pacientes com CaPRC. Em nossa série os marcadores de DNE foram associados com um PSA elevado, escore de Gleason elevado e uma diminuição na sobrevida global. Esses achados necessitam ser confirmados em estudos com maior número de pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: câncer de próstata resistente à castração; diferenciação neuroendócrina; cromogranina A; detecção; prognóstico

Introdução: O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia sólida diagnosticada com maior frequência entre homens nos Estados Unidos da América e Europa Ocidental (1, 2). Embora terapias locais apresentem alta eficácia no tratamento do CaP localizado e o bloqueio androgênico (BA) produza resultados iniciais satisfatórios em casos de doença avançada, a neoplasia prostática pode progredir para um estágio de resistência à castração. A diferenciação neuroendócrina (DNE) e a hiperativação das células neuroendócrinas (NE) poderiam estar envolvidas na patogênese do CaPRC através da produção e secreção de neuropeptídeos bioativos (3), tornando as possíveis implicações prognósticas e terapêuticas da DNE no CaP temas importantes e atuais.

As células NE apresentam-se geralmente distribuídas focalmente em uma população de células predominantemente de adenocarcinoma, sendo que níveis séricos ou teciduais de produtos neuroendócrinos poderiam refletir sua atividade (4, 5). A cromogranina A (CgA) é o principal produto das células NE e o marcador sérico e tecidual de DNE mais utilizado (6). A prevalência de DNE em pacientes com CaP reportada na literatura varia de 10 a 100%, dependendo da definição, método e população estudada (7-12). Considerando somente pacientes com câncer de próstata resistente à castração (CaPRC), Cabrespine (13) relatou a presença de CgA elevada em 45% dos casos, já Casella (14) demonstrou a presença de CgA tecidual em 80% dos casos examinando tecido de necropsia em um subgrupo de 15 pacientes.

Como o tratamento quimioterápico (15) ou imunológico (16) proporciona apenas uma pequena melhora na sobrevida dos pacientes com CaPRC, existe um grande interesse no desenvolvimento de novas terapias. Agentes terapêuticos baseados em análogos da somatostatina isolados ou associados a agentes citotóxicos estão em desenvolvimento (17-

19). Desse modo, a cuidadosa determinação da presença de DNE, com a identificação de subgrupos potencialmente responsivos à determinada terapia, apresenta-se como objetivo importante.

A utilização de marcadores de DNE como indicadores de prognóstico no CaP apresenta resultados controversos. Alguns autores encontraram associação entre a presença de DNE e pior prognóstico (20-22), enquanto outros não encontraram essa relação (13, 23). Os estudos previamente realizados para caracterizar a DNE em CaP geralmente apresentam algumas limitações metodológicas, como inclusão de pacientes em estágios diferentes de doença, diferentes métodos de coleta do material prostático (ressecção transuretral, biópsia, prostatectomia radical, necropsia) e uso de diferentes marcadores de DNE. Desse modo, seus resultados não podem ser plenamente aplicados para pacientes com CaPRC. O objetivo deste estudo foi melhor estabelecer a presença e o significado prognóstico da DNE no CaPRC utilizando análise imunohistoquímica de biópsia prostática, nível sérico de CgA e cintilografia para receptores da somatostatina (Octreoscan) em um grupo homogêneo de pacientes com CaPRC.

Pacientes e métodos: Entre janeiro de 2003 e dezembro de 2006, 47 pacientes apresentando CaPRC e sem história pregressa de prostatectomia radical, acompanhados no Instituto Europeu de Oncologia, Milão, Itália, foram submetidos à biópsia prostática transperineal guiada por ecografia e coleta de amostra de sangue. O CaPRC foi definido pela presença de três ou mais aumentos sucessivos do PSA sobre o seu nadir, com testosterona em níveis de castração e após suspensão do anti-androgênico por pelo menos quatro semanas, e/ou progressão radiológica (24). Todos os pacientes foram mantidos em

deprivação androgênica com análogos do agonista de liberação do hormônio luteinizante (LHRH) e, à exceção de três pacientes, todos os demais estavam em tratamento oral com estramustina e etoposide no início do estudo como parte de um estudo de fase 2 (25). Vinte e seis pacientes foram submetidos à cintilografia para receptores da somatostatina (Octreoscan). Após a realização dos exames, um subgrupo de 16 pacientes apresentando progressão bioquímica e/ou clínica iniciou tratamento com análogo da somatostatina associado a estrógeno via oral. **Laboratório:** a CgA sérica foi medida utilizando teste imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) (DAKO SA, Dinamarca). **Patologia:** a amostra de tecido prostático foi obtida com agulha de biópsia tipo “tru-cut” de 16 gauge, fixada em formalina e embebida em parafina. Para cada caso, lâminas coradas com hematoxilina e eosina e blocos de parafina arquivados foram recuperados. Hematoxilina e eosina foram utilizadas para determinar a presença de células tumorais, tipo histológico e escore de Gleason. **Imunohistoquímica:** a análise imunohistoquímica foi realizada em tecidos de biópsias positivas embebidos em parafina. Foi utilizado um painel de anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente: cromogranina A (Laboratórios Signet, Dedham, EUA), antígeno Ki-67 (MIB-1) (Immunotech, Marselha, França), receptor androgênico (Oncogene Science, Cambridge, EUA) e receptor da somatostatina (Bio Trend, Koln, Alemanha). Após bloquear a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 5% por 12 minutos, secções desparafinadas foram colocadas em contato com os anticorpos primários por 30 minutos em temperatura ambiente utilizando-se imunomarcador automático (Dako Autostainer, Glostrup, Dinamarca). A seguir, foram incubadas com *kit* de detecção de alta sensibilidade de acordo com as instruções do fabricante (Dako En Vision Plus-HRP, Glostrup, Dinamarca). A especificidade de todas as imunorreações foi controlada

duplamente substituindo-se o anticorpo primário por uma imunoglobulina de camundongo isotópica em uma diluição comparável ou com soro normal. Controles internos apropriados também foram verificados em todas as reações. A porcentagem de células tumorais positivas para cada imunomarcador foi avaliada de maneira independente, contando-se (quando presente) pelo menos 1000 células tumorais em campos representativos de imunorreação utilizando-se microscópio óptico convencional. A avaliação imunohistoquímica foi realizada de maneira independente por dois patologistas cegados para os casos, contando cada amostra três vezes, assim o escore mais alto para cada anticorpo entre os dois observadores foi relatado. Cromogranina estromal foi reportada como ausente ou presente. A presença da cromogranina citoplasmática nas células neoplásicas foi reportada como: 0 células positivas, 1 – 5 células positivas e > 5 células positivas. A porcentagem de células positivas também foi avaliada de maneira semi-quantitativa em uma escala de 0 a 3, onde 0 corresponde a imunorreação ausente ou observada em menos de 5% das células tumorais, 1 imunorreação em 5 a 25%, 2 imunorreação em 26 a 50% e 3 imunorreação em mais de 50% das células tumorais. O receptor da somatostatina subtipo 2 (SSTR2) foi reportado como positivo nos casos em que foi verificada imunorreação no citoplasma ou membrana de células tumorais e a porcentagem de células positivas foi reportada com um ponto de corte de 10%. Também foi verificada a imunorreação para SSTR2 na área estromal. **Cintilografia para receptores da somatostatina:** cintilografia com ¹¹¹In-DTPA-octreotide (Octreoscan) foi realizada em 26 pacientes (55%). A preparação do marcador foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Mallinckrodt, Petten, Holanda). Imagens de corpo inteiro foram obtidas 4 e 24 horas após a aplicação de 110 a 150 MBq de pentetreotida de índio (¹¹¹In-DTPA-

octreotide). Foi utilizada câmara gama equipada com colimador de média energia (Infinia, GE Healthcare). A coleta de dados para as imagens de tomografia por emissão de fóton único (SPECT) foi realizada através de 64 rotações de 360°, com energia de 171 e 245 keV + 20%. O tempo de coleta para cada ângulo foi de 60 segundos, com um montante de 40.000 contagens/ângulo. Para a reconstrução das imagens SPECT um filtro Butterworth foi aplicado aos dados originais.

O estudo foi aprovado pelo comitê revisor do hospital e todos os pacientes forneceram consentimento informado por escrito.

Estatística: Os testes qui-quadrado, exato de Fisher ou qui-quadrado de Mantel-Haenszel para variáveis ordinais foram usados para comparar porcentagens entre grupos. As comparações entre medianas foram realizadas com testes não-paramétricos. Quando apropriado, foi realizada transformação logarítmica dos valores nos modelos de regressão linear. Sobrevida global foi definida como o intervalo entre o diagnóstico de CaPRC e morte por qualquer causa e foi calculada utilizando o método de Kaplan-Meier. Pacientes vivos foram censurados na última consulta de seguimento ambulatorial. O teste log rank foi utilizado para calcular diferenças de sobrevida entre grupos na análise univariada. Modelos multivariados de regressão de Cox foram usados para identificar características clínico-patológicas independentes associadas com sobrevida. Todos os testes foram bicaudais. As análises foram realizadas utilizando o programa SAS (SAS Institute, Cary, EUA).

Resultados: As características clínicas dos pacientes estão apresentadas na Tabela I. A mediana da duração do período de resposta ao tratamento hormonal foi de 16,5 meses e o

tempo mediano entre o diagnóstico de CaPRC e a análise da DNE 8 meses. A biópsia prostática demonstrou células tumorais em 39 pacientes (83%).

Prevalência: vinte cinco pacientes (54%) foram considerados como apresentando DNE considerando-se apenas a s-Cga. Com relação aos resultados da análise imunohistoquímica, 26 pacientes (67% dos pacientes com biópsia positiva) apresentaram células tumorais positivas para CgA (t-CgA), enquanto 22 (58% dos pacientes com biópsia positiva) demonstraram presença tecidual do SSTR2. O receptor androgênico foi positivo nas células tumorais em 20 pacientes (51% dos pacientes com biópsia positiva) e a mediana do índice de proliferação celular Ki-67 foi 10% (intervalo 1-80).

Relação entre marcadores de DNE e parâmetros clínicos: como demonstrado na Tabela II, cromogranina A sérica (s-CgA) elevada foi associada com maior valor de PSA no momento da avaliação da DNE, com um PSA mediano de 25ng/ml para s-CgA \leq 20 U/l e 50ng/ml para s-CgA $>$ 20 U/l ($p=0.04$). Entretanto, a s-Cga não foi associada ao PSA ou escore de Gleason no momento do diagnóstico do CaP, tratamento inicial utilizado, presença de metástases ou duração do bloqueio androgênico (BA). A presença de CgA no citoplasma de células tumorais (t-CgA) foi associada a um escore de Gleason mais elevado no momento do diagnóstico do CaP, 50% dos pacientes com t-CgA positiva tinham um escore de Gleason \geq 8, versus 11% no grupo com t-CgA negativa ($p=0.03$). A mediana da duração do BA foi de 36 meses nos pacientes que não apresentavam células positivas para t-CgA, 18 nos pacientes com 1-5 células positivas e 23 nos pacientes que apresentavam mais que 5 células positivas ($p=0.02$ comparando nenhuma célula positiva com \geq 1 célula positiva). A mediana do intervalo entre o diagnóstico de CaPRC até a avaliação da DNE foi de 13 meses para pacientes com ausência de células positivas para t-CgA, 4 para pacientes com 1-

5 células positivas e 7 para aqueles com mais de 5 células positivas ($p=0.05$ comparando nenhuma célula positiva com ≥ 1 célula positiva). A t-CgA não foi associada com o PSA no momento do diagnóstico do CaP, presença de metástases ou PSA atual. A presença de células neoplásicas positivas para SSTR2 não foi associada com nenhum dos parâmetros clínicos avaliados.

Relação entre marcadores séricos e teciduais de DNE: a relação entre s-CgA e parâmetros imunohistoquímicos é apresentada na Tabela III. Houve uma tendência de associação entre a presença de células neoplásicas positivas para t-CgA e s-CgA elevada (≥ 20 U/l) ($p=0.09$). A porcentagem de células positivas para CgA citoplasmática (densidade da CgA citoplasmática) não foi associada com a s-CgA. Do mesmo modo, não foi encontrada associação entre a presença de SSTR2 e s-CgA. Houve uma tendência de associação entre a s-CgA e a presença de células neoplásicas positivas para o receptor androgênico ($p=0.064$) (figura 1).

Relação entre marcadores de DNE e prognóstico: a mediana do período de seguimento foi de 32 meses (5-72) após o diagnóstico de CaPRC. A sobrevida global (SG) em cinco anos foi de 50% se considerada a partir do início do BA e 15% se considerada a partir do CaPRC. Considerando um ponto de corte de 20 U/l para a s-CgA, a diferença na SG de pacientes com s-CgA elevada ou normal não apresentou diferença estatística. Estratificando os pacientes em quartis do seguinte modo Q1: $s\text{-CgA} < 14$; Q2: $14 \leq s\text{-CgA} < 24$; Q3: $24 \leq s\text{-CgA} < 36$; Q4: $s\text{-CgA} \geq 36$, valores de s-CgA ≥ 36 U/l foram associados a uma modesta redução da SG (figura 2), mesmo quando ajustado para idade, PSA, presença de metástases, escore de Gleason e tratamento com análogo da somatostatina (HR Q4 versus os demais 1.8, 95% IC 1.3-2.5). A presença de t-CgA foi associada com redução na SG após o

diagnóstico de CaPRC, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (figura 3). Em análise univariada, a presença de SSTR2 foi associada a uma melhora na SG, entretanto este achado perde sua significância estatística quando os resultados são ajustados para idade, PSA, escore de Gleason e presença de metástases (HR 0.69, 95% CI 0.3-1.52) (figura 4).

Avaliação in vivo da DNE: dos 26 pacientes submetidos à cintilografia para receptores da somatostatina (Octreoscan), 4 (15%) apresentaram resultados positivos, correspondendo com local de metástase óssea e linfonodal em 3 e 1 paciente, respectivamente. Todos os pacientes com Octreoscan positivo apresentaram expressão imunohistoquímica do SSTR2 no tecido tumoral prostático, com 20, 40, 40 e 90% das células tumorais positivas.

Discussão: A detecção da atividade neuroendócrina e a definição da presença de DNE nos pacientes com CaP ainda é uma questão controversa na literatura. A prevalência de DNE no CaP é resultado direto da definição de DNE utilizada. Como resultado, sua prevalência na literatura varia de 10% a 100% (7-10, 14). Em nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a considerar um painel de exames incluindo amostra sanguínea, biópsia prostática e Octreoscan avaliando a presença de DNE e sua implicação prognóstica em um grupo homogêneo de pacientes com CaPRC. De acordo com esse painel, a prevalência de DNE foi de 54% baseada na presença de s-CgA elevada, 67% considerando a presença de t-CgA e 58% considerando a presença de SSTR2 nas células neoplásicas. Independentemente da definição utilizada, encontramos uma prevalência elevada de DNE nessa população específica de CaPRC. Essa informação pode ser útil no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para esse estágio avançado de doença.

Em nossa série s-CgA elevada foi associada a níveis mais altos de PSA no momento da avaliação da DNE. Estudos prévios com pacientes em diferentes estágios de doença não encontraram essa relação (11, 26). Conforme relatado por Sasaki (27), durante a terapia endócrina a elevação da s-CgA precede o aumento do PSA. Em nosso estudo a s-CgA e o PSA foram dosados em um estágio final de doença, quando o PSA já estava em níveis elevados. Considerando isso, encontramos os dois marcadores elevados ao mesmo tempo, justificando essa relação. Encontramos também uma associação positiva entre a presença de t-CgA e um escore de Gleason inicial mais elevado, confirmando dados de estudos previamente publicados que incluíram pacientes em diferentes estágios de doença (10, 11, 22, 23). Essa relação poderia indicar que tumores exibindo inicialmente um padrão mais agressivo seriam mais propensos a desenvolver DNE no decorrer do seu curso.

A presença da t-CgA não foi associada a um tempo maior de BA ou de doença resistente à castração. Trabalhos anteriores reportaram uma associação positiva entre DNE e terapia hormonal (8, 13, 27, 28). De fato, um período maior de BA poderia induzir à DNE, mas provavelmente não em todos os pacientes. Em pacientes apresentando CaPRC, como é o caso da nossa série, o potencial papel de um período longo de BA na promoção da DNE ainda não é claro. Não é possível diferenciar se o aumento da presença de DNE é atribuído à condição de resistência à castração ou ao BA prolongado (8). Além disso, neoplasias rapidamente progredindo para o estágio de resistência à castração poderiam expressar características de DNE de maneira mais importante e mais precocemente, mesmo com um tempo menor de BA.

Encontramos uma tendência de associação entre a presença de células neoplásicas positivas para t-CgA e s-CgA elevada, não atingindo significância estatística ($p=0.09$).

Angelsen (7) demonstrou associação entre marcadores séricos e teciduais de DNE estudando um pequeno número de pacientes, com menos da metade deles em tratamento com BA. Analisando biópsia prostática de pacientes com CaP de diagnóstico recente, Bollito (11) encontrou uma relação entre s-CgA e t-CgA, particularmente em casos metastáticos. Em nossos pacientes a presença de células neoplásicas positivas para SSTR2 não foi associada aos níveis de s-CgA ou à presença de t-CgA, sugerindo que esses marcadores apontam diferentes células e, provavelmente, revelam aspectos diferentes do fenótipo de DNE no CaP.

As células neuroendócrinas (NE) prostáticas são diferenciadas e pós-mitóticas, sem atividade proliferativa e, portanto, negativas para o Ki-67 (5). Apesar disso, o índice de proliferação celular Ki-67 foi elevado (10%) em nossa série. Como já relatado em prévios estudos (11, 28), o índice de proliferação das células neoplásicas adjacentes a células NE é aumentado. Jongasma (29) demonstrou que a proliferação de linhagens celulares de CaP em condições de privação androgênica pode ser modulada por neuropeptídeos com efeitos mitogênicos produzidos pelas células NE, justificando esse alto índice de proliferação verificado. Grobholz (30) encontrou uma associação positiva entre Ki-67 e a DNE em espécimes de prostatectomia radical. Ao contrário, Ishida (23) e Casella (14) não encontraram tal associação examinando espécimes de prostatectomia radical e biópsia prostática de pacientes sem tratamento, respectivamente.

Estudos imunohistoquímicos demonstram que o receptor androgênico (RA) não é expresso nas células NE prostáticas (31) e assim a DNE tem sido proposta como um dos fatores contribuindo para o desenvolvimento do CaPRC. Adicionalmente, níveis elevados de expressão do RA e o desenvolvimento de receptores com maior sensibilidade também

são reconhecidos como características associadas com o surgimento do CaPRC (3). A prevalência de células positivas para o RA em nossa série foi elevada (53%), corroborando com a teoria da hiperexpressão/hipersensibilidade do RA no CaPRC. De maneira interessante, encontramos uma relação positiva entre a s-CgA e a presença do RA nas células neoplásicas. Isso poderia refletir a ação proliferativa de fatores produzidos pelas células com DNE nas células tumorais exócrinas (positivas para o RA) adjacentes, aliada ao aumento da expressão do RA característica do CaPRC.

Os dados publicados sobre o impacto prognóstico da DNE no CaP são conflitantes. Em pacientes com CaPRC, s-CgA elevada foi associada a um pior prognóstico nos estudos conduzidos por Taplin (20) e Berruti (21, 32). Entretanto, esses achados não foram confirmados por Cabrespine (13). Em nossa série, níveis elevados de s-CgA foram associados a uma modesta redução na sobrevida global dos pacientes. Um curso de doença mais agressivo em pacientes apresentando DNE poderia ser determinado pela capacidade das células com DNE escaparem à apoptose (33), assim essas células poderiam sobreviver e continuar sua ação mesmo em uma situação de privação androgênica (34), produzindo e secretando potentes neuropeptídeos que estimulariam o crescimento, diferenciação, transformação e invasão celular.

O valor prognóstico de marcadores teciduais de DNE é mais controverso. Esses resultados conflitantes podem atribuídos à população heterogênea de pacientes estudada, o volume limitado das amostras de tecido tumoral e a distribuição desigual das células com DNE no parênquima prostático (6). Alguns autores não encontraram associação entre a presença tecidual de CgA e pior prognóstico examinando espécimes de prostatectomia radical (23, 35, 36) ou biópsia prostática em pacientes não tratados (14) ou metastáticos (37).

Ao contrário, outros estudos demonstraram um pior prognóstico associado à presença de t-CgA analisando biópsia prostática de pacientes com CaP metastático (12) ou recém-diagnosticado (22, 28). Em nossos pacientes a presença de t-CgA foi associada a um pior prognóstico, entretanto sem alcançar significância estatística. Por outro lado, a presença tecidual de SSTR2 foi associada a uma maior sobrevida (sem alcançar significância estatística), sugerindo novamente que esses dois marcadores revelam aspectos diferentes do fenótipo da DNE no CaPRC. Nesse sentido, nosso estudo é o primeiro avaliando o impacto prognóstico da t-CgA e do SSTR2 em um grupo composto somente por pacientes com CaPRC.

Imagens cintilográficas com análogos da somatostatina radiomarcados, como o In 111-DTPA octreotide (Octreoscan), são usadas clinicamente para a localização de tumores que expressam receptores para a somatostatina (38). São poucos os estudos avaliando o uso do Octreoscan em pacientes com CaPRC. Nilsson (39) encontrou algum resultado positivo no Octreoscan em 94% de 31 pacientes com CaPRC, mas apenas 37% das metástases detectadas em cintilografia óssea com Tc-99 apresentaram captação ao Octreoscan. Séries mais recentes apresentaram taxas menores de positividade do Octreoscan: 85% de 20 casos, todos com baixa captação (40), e apenas 37% de 20 casos (41). Encontramos uma baixa positividade para o Octreoscan, apenas 15%, ressaltando-se que todos os pacientes com resultado positivo apresentaram uma expressão importante do SSTR2 no tecido tumoral. Esse fato poderia indiretamente indicar que para um Octreoscan positivo seria necessária uma presença elevada de células apresentando o SSTR2.

A expressão imunohistoquímica de produtos NE no tecido tumoral indica armazenagem, mas não necessariamente produção ou secreção desses produtos (4); além

disso, existe a dificuldade em se obter amostras teciduais que adequadamente representem a DNE em toda a próstata (42). Isso é especialmente importante em pacientes previamente submetidos a prostatectomia radical. Por outro lado, níveis séricos de marcadores de DNE (s-CgA) poderiam melhor representar a DNE de todo o tumor e também de suas possíveis metástases. Entretanto, a presença de produtos séricos pode não refletir exatamente a atividade NE na próstata, visto que a presença de receptores teciduais é necessária para que a ação desses produtos aconteça (4). Sendo assim, a análise conjunta de marcadores séricos e teciduais poderia melhor definir o padrão de DNE em uma base individual.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. O número pequeno de pacientes e a limitada amostra de tecido obtido em biópsia prostática fazem com que os resultados obtidos devam ser interpretados com cautela. Diferentes marcadores de DNE, como enolase neurônio-específica, sinaptofisina ou cromogranina B, assim como outros subtipos de receptores da somatostatina, não foram incluídos em nosso painel. Como era necessário tecido prostático para a análise imunohistoquímica, pacientes previamente submetidos a prostatectomia radical não foram incluídos, possivelmente induzindo algum viés de seleção.

Conclusões: Em um grupo homogêneo de pacientes com CaPRC encontramos uma alta prevalência de DNE definida pela presença de marcador sérico ou tecidual. Marcadores de DNE foram associados com PSA elevado, escore de Gleason mais alto e diminuição na sobrevida global. Não foi encontrada relação dos diferentes marcadores entre si, sugerindo que cada marcador reflita um aspecto diferente do fenótipo de DNE. Desse modo, propomos um painel para caracterizar a DNE no CaPRC utilizando a cromogranina A sérica (s-CgA), análise imunohistoquímica da expressão tecidual da cromogranina A (t-

CgA), do receptor da somatostatina subtipo 2 (SSTR2) e do índice de proliferação Ki-67 no tecido tumoral prostático. A cintilografia para receptores da somatostatina (Octreoscan) foi positiva em um pequeno número de pacientes, sendo a sua aplicação nesse cenário questionável. Esses achados necessitam ser confirmados em estudos com maior número de pacientes e podem estabelecer a DNE como um importante fator prognóstico e alvo para o desenvolvimento de novas terapias para pacientes com CaPRC.

BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010 Jun 17.
3. Bonkhoff H, Berges R. From pathogenesis to prevention of castration resistant prostate cancer. *Prostate.* 2010 Jan 1;70(1):100-12.
4. Sciarra A, Mariotti G, Gentile V, Voria G, Pastore A, Monti S, et al. Neuroendocrine differentiation in human prostate tissue: is it detectable and treatable? *BJU Int.* 2003 Mar;91(5):438-45.
5. Komiya A, Suzuki H, Imamoto T, Kamiya N, Nihei N, Naya Y, et al. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *Int J Urol.* 2009 Jan;16(1):37-44.

6. Vashchenko N, Abrahamsson PA. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *Eur Urol.* 2005 Feb;47(2):147-55.
7. Angelsen A, Syversen U, Haugen OA, Stridsberg M, Mjølnerod OK, Waldum HL. Neuroendocrine differentiation in carcinomas of the prostate: do neuroendocrine serum markers reflect immunohistochemical findings? *Prostate.* 1997 Jan 1;30(1):1-6.
8. Hirano D, Okada Y, Minei S, Takimoto Y, Nemoto N. Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *Eur Urol.* 2004 May;45(5):586-92; discussion 92.
9. Sciarra A, Di Silverio F, Autran AM, Salciccia S, Gentilucci A, Alfarone A, et al. Distribution of high chromogranin A serum levels in patients with nonmetastatic and metastatic prostate adenocarcinoma. *Urol Int.* 2009;82(2):147-51.
10. Theodoropoulos VE, Tsigka A, Mihalopoulou A, Tsoukala V, Lazaris AC, Patsouris E, et al. Evaluation of neuroendocrine staining and androgen receptor expression in incidental prostatic adenocarcinoma: prognostic implications. *Urology.* 2005 Oct;66(4):897-902.
11. Bollito E, Berruti A, Bellina M, Mosca A, Leonardo E, Tarabuzzi R, et al. Relationship between neuroendocrine features and prognostic parameters in human prostate adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 2:S159-64.
12. Kokubo H, Yamada Y, Nishio Y, Fukatsu H, Honda N, Nakagawa A, et al. Immunohistochemical study of chromogranin A in Stage D2 prostate cancer. *Urology.* 2005 Jul;66(1):135-40.

13. Cabrespine A, Guy L, Gachon F, Cure H, Chollet P, Bay JO. Circulating chromogranin a and hormone refractory prostate cancer chemotherapy. *J Urol*. 2006 Apr;175(4):1347-52.
14. Casella R, Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC. Focal neuroendocrine differentiation lacks prognostic significance in prostate core needle biopsies. *J Urol*. 1998 Aug;160(2):406-10.
15. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1502-12.
16. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 29;363(5):411-22.
17. Stangelberger A, Schally AV, Djavan B. New treatment approaches for prostate cancer based on peptide analogues. *Eur Urol*. 2008 May;53(5):890-900.
18. Sciarra A, Cardì A, Dattilo C, Mariotti G, Di Monaco F, Di Silverio F. New perspective in the management of neuroendocrine differentiation in prostate adenocarcinoma. *Int J Clin Pract*. 2006 Apr;60(4):462-70.
19. Sciarra A, Panebianco V, Ciccariello M, Salciccia S, Gentilucci A, Lisi D, et al. Complete response to the combination therapy with androgen blockade and somatostatin analogue in a patient with advanced prostate cancer: magnetic resonance imaging with ¹H-spectroscopy. *Eur Urol*. 2008 Mar;53(3):652-5.
20. Taplin ME, George DJ, Halabi S, Sanford B, Febbo PG, Hennessy KT, et al. Prognostic significance of plasma chromogranin a levels in patients with hormone-

refractory prostate cancer treated in Cancer and Leukemia Group B 9480 study. *Urology*. 2005 Aug;66(2):386-91.

21. Berruti A, Mosca A, Tucci M, Terrone C, Torta M, Tarabuzzi R, et al. Independent prognostic role of circulating chromogranin A in prostate cancer patients with hormone-refractory disease. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Mar;12(1):109-17.

22. Berruti A, Bollito E, Cracco CM, Volante M, Ciccone G, Porpiglia F, et al. The prognostic role of immunohistochemical chromogranin a expression in prostate cancer patients is significantly modified by androgen-deprivation therapy. *Prostate*. 2010 May 15;70(7):718-26.

23. Ishida E, Nakamura M, Shimada K, Tasaki M, Konishi N. Immunohistochemical analysis of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Pathobiology*. 2009;76(1):30-8.

24. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, et al. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol*. 2008 Jan;53(1):68-80.

25. Spitaleri G, Matei DV, Curigliano G, Detti S, Verweij F, Zambito S, et al. Phase II trial of estramustine phosphate and oral etoposide in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Ann Oncol*. 2009 Mar;20(3):498-502.

26. Deftos LJ, Nakada S, Burton DW, di Sant'Agnese PA, Cockett AT, Abrahamsson PA. Immunoassay and immunohistology studies of chromogranin A as a neuroendocrine marker in patients with carcinoma of the prostate. *Urology*. 1996 Jul;48(1):58-62.

27. Sasaki T, Komiya A, Suzuki H, Shimbo M, Ueda T, Akakura K, et al. Changes in chromogranin a serum levels during endocrine therapy in metastatic prostate cancer patients. *Eur Urol*. 2005 Aug;48(2):224-9; discussion 9-30.

28. Berruti A, Mosca A, Porpiglia F, Bollito E, Tucci M, Vana F, et al. Chromogranin A expression in patients with hormone naive prostate cancer predicts the development of hormone refractory disease. *J Urol*. 2007 Sep;178(3 Pt 1):838-43; quiz 1129.
29. Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, Romijn JC, van Der Kwast TH, Schroder FH, et al. Androgen-independent growth is induced by neuropeptides in human prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2000 Jan;42(1):34-44.
30. Grobholz R, Griebel M, Sauer CG, Michel MS, Trojan L, Bleyl U. Influence of neuroendocrine tumor cells on proliferation in prostatic carcinoma. *Hum Pathol*. 2005 May;36(5):562-70.
31. Huang J, Yao JL, di Sant'Agnese PA, Yang Q, Bourne PA, Na Y. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. *Prostate*. 2006 Sep 15;66(13):1399-406.
32. Berruti A, Dogliotti L, Mosca A, Bellina M, Mari M, Torta M, et al. Circulating neuroendocrine markers in patients with prostate carcinoma. *Cancer*. 2000 Jun 1;88(11):2590-7.
33. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 2002 Oct 1;53(2):118-23.
34. Sun Y, Niu J, Huang J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am J Transl Res*. 2009;1(2):148-62.
35. Veltri RW, Isharwal S, Miller MC, Epstein JI, Mangold LA, Humphreys E, et al. Long-term assessment of prostate cancer progression free survival: evaluation of pathological parameters, nuclear shape and molecular biomarkers of pathogenesis. *Prostate*. 2008 Dec 1;68(16):1806-15.

36. Ahlegren G, Pedersen K, Lundberg S, Aus G, Hugosson J, Abrahamsson P. Neuroendocrine differentiation is not prognostic of failure after radical prostatectomy but correlates with tumor volume. *Urology*. 2000 Dec 20;56(6):1011-5.
37. Yamada Y, Nakamura K, Aoki S, Taki T, Naruse K, Matsubara H, et al. An immunohistochemical study of chromogranin A and human epidermal growth factor-2 expression using initial prostate biopsy specimens from patients with bone metastatic prostate cancer. *BJU Int*. 2007 Jan;99(1):189-95.
38. Reubi JC, Maecke HR. Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med*. 2008 Nov;49(11):1735-8.
39. Nilsson S, Reubi JC, Kalkner KM, Laissue JA, Horisberger U, Olerud C, et al. Metastatic hormone-refractory prostatic adenocarcinoma expresses somatostatin receptors and is visualized in vivo by [111In]-labeled DTPA-D-[Phe1]-octreotide scintigraphy. *Cancer Res*. 1995 Dec 1;55(23 Suppl):5805s-10s.
40. Kalkner KM, Acosta S, Thorsson O, Frederiksen H, Nilsson A, Gustavsson B, et al. Octreotide scintigraphy and Chromogranin A do not predict clinical response in patients with octreotide acetate-treated hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2006;9(1):92-8.
41. Mencobonii M, Tredici S, Rebella L, Bergaglio M, Galbusera V, Manzara A, et al. Effect of chemotherapy on somatostatin receptor detection with octreotide scintigraphy in hormone-refractory prostate cancer patients. *Anticancer Res*. 2006 May-Jun;26(3B):2233-5.

42. Cohen MK, Arber DA, Coffield KS, Keegan GT, McClintock J, Speights VO, Jr. Neuroendocrine differentiation in prostatic adenocarcinoma and its relationship to tumor progression. *Cancer*. 1994 Oct 1;74(7):1899-903.

Tabela I. Características dos pacientes estudados

Total (No.)		47
Idade (anos)	Mediana	66
	(intervalo)	(53-87)
PSA inicial (ng/ml)	Mediana	52
	(intervalo)	(4-2.500)
Escore de Gleason ^a	≤6 (%)	11 (31)
	7 (%)	10 (29)
	≥8 (%)	14 (40)
Tratamento inicial	RT+BA (%)	15 (32)
	BA (%)	32 (68)
Duração do BA (meses)	Mediana	29
	(intervalo)	(9-198)
Duração do CaPRC até a avaliação DNE (meses)	Mediana	8
	(intervalo)	(0-37)
Metástases	Sim (%)	41 (87)
PSA atual (ng/ml)	Mediana	36
	(intervalo)	(2-5580)

^a Um ou mais pacientes com dados incompletos; PSA, antígeno prostático específico; RT, radioterapia externa; BA, bloqueio androgênico; CaPRC, câncer de próstata resistente à castração; DNE, diferenciação neuroendócrina.

Tabela II. Características clínicas e sua relação com análise sérica e imunohistoquímica de DNE

Parâmetros clínicos		CgA sérica			Células neoplásicas com CgA citoplasmática positiva ^b				SSTR2 ^{a, b}		
		≤20 U/l	>20 U/l	P	0 células	1-5 células	>5 células	P	-	+	P
PSA inicial (ng/ml)	Mediana (intervalo)	40 (4-1280)	56 (13-2500)	0.17	53 (11-2287)	49 (4-2100)	30 (12-108)	0.90 0.65 ^c	40 (4-2100)	50 (11-2287)	0.74
	Escore de Gleason ^a	≤6 (%)	6 (35)		5 (29)	1.0	5 (56)		1 (9)	3 (33)	
	7 (%)	4 (24)	5 (29)	3 (33)	3 (27)		3 (33)	5 (36)	3 (21)		
	≥8 (%)	7 (41)	7 (41)	1 (11)	7 (64)		3 (33)	5 (36)	6 (43)		
Tratamento inicial	RT+BA (%)	7 (33)	7 (28)	0.70	3 (23)	4 (29)	6 (50)	0.16 0.34 ^c	7 (44)	6 (27)	0.29
	BA (%)	14 (67)	18 (72)		10 (77)	10 (71)	6 (50)		9 (56)	16 (73)	
Duração do BA (meses)	Mediana (intervalo)	28 (13-95)	29 (9-198)	0.87	36 (12-82)	18 (9-95)	23 (11-75)	0.05 0.02 ^c	27 (9-82)	25 (11-95)	0.89
Duração do CaPRC até a avaliação DNE (meses)	Mediana (intervalo)	9 (0-24)	8 (0-37)	0.55	13 (4-37)	4 (0-24)	7 (2-21)	0.14 0.05 ^c	7 (0-25)	8 (0-37)	0.82
Metástases	Sim (%)	19 (90)	22 (88)	1.0	12 (92)	12 (86)	9 (75)	0.24 0.35 ^c	13 (81)	19 (86)	0.67
PSA atual (ng/ml)	Mediana (intervalo)	25 (6-1175)	50 (4-5580)	0.04	37 (8-1175)	31 (10-570)	18 (2-5580)	0.83 0.65 ^c	30 (2-5580)	28 (4-1175)	1.0

^a Um ou mais pacientes com dados incompletos; ^b Calculado nos 39 pacientes com biópsia positiva;

^c 0 células neoplásicas positivas *versus* ≥1 células. DNE, diferenciação neuroendócrina; CgA, cromogranina A; SSTR2, receptor da somatostatina subtipo 2; PSA, antígeno prostático específico; RT, radioterapia externa; BA, bloqueio androgênico; CaPRC, câncer de próstata resistente à castração.

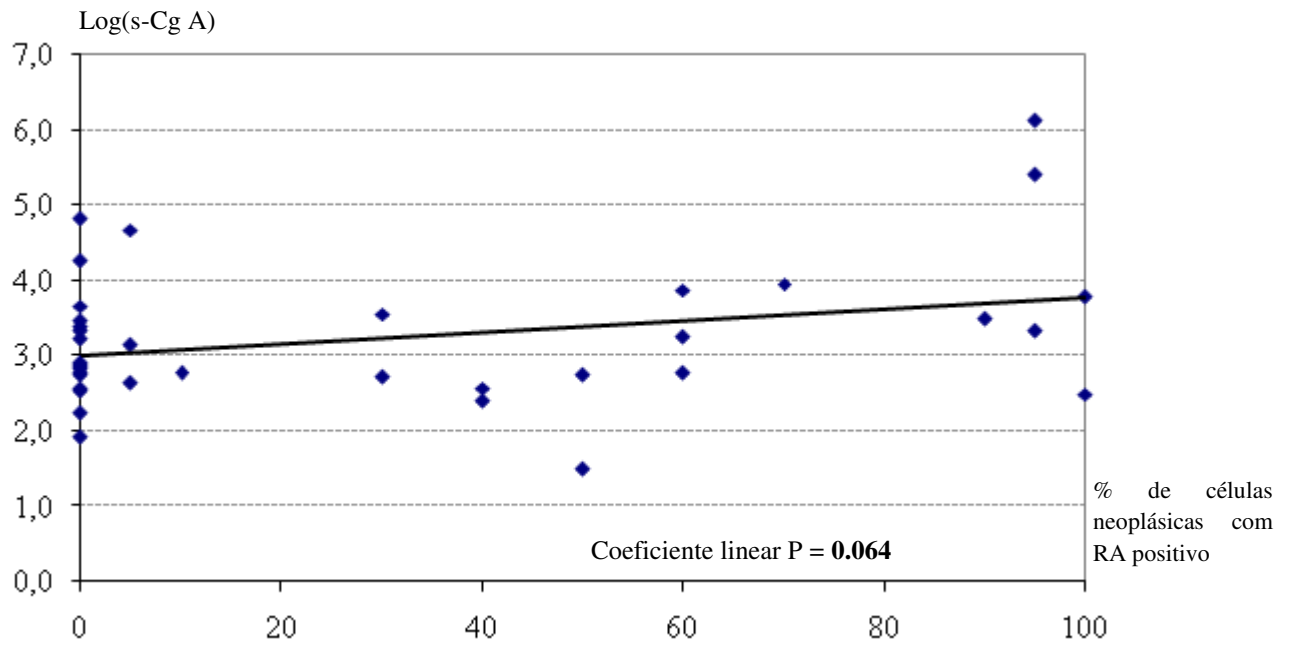
Tabela III. Cromogranina A sérica e parâmetros imunohistoquímicos

Parâmetros imunohistoquímicos		Total N=47	CgA sérica ≤20 U/l N=21	CgA sérica >20 U/l N=25	P
CgA estromal (%)	Ausente	42 (89)	19 (90)	22 (88)	1.0
	Presente	5 (11)	2 (10)	3 (12)	
Células neoplásicas positivas CgA citoplasmática ^b (%)	0 células	13 (33)	9 (47)	4 (21)	0.10 0.09 ^c
	1-5 células	14 (36)	6 (32)	8 (42)	
	>5 células	12 (31)	4 (21)	7 (37)	
Densidade da CgA citoplasmática ^b (%)	0	13 (33)	9 (47)	4 (21)	0.21
	1	17 (44)	5 (26)	11 (58)	
	2	6 (15)	5 (26)	1 (5)	
	3	3 (8)	0 (0)	3 (16)	
SSTR2 ^a (%)	-	16 (42)	7 (37)	8 (44)	0.74
	+	22 (58)	12 (63)	10 (56)	
Células neoplásicas positivas SSTR2 ^a (%)	0	16 (42)	7 (37)	8 (44)	0.42
	<10%	11 (29)	5 (26)	6 (33)	
	>10%	11 (29)	7 (37)	4 (22)	
SSTR2 estromal ^a (%)	-	32 (84)	15 (79)	16 (89)	0.66
	+	6 (16)	4 (21)	2 (11)	
Ki-67 (%)	Mediana (intervalo)	10 (1-80)	10 (1-31)	15 (1-80)	0.75

^a Um ou mais pacientes com dados incompletos; ^b Calculado nos 39 pacientes com biópsia positiva;

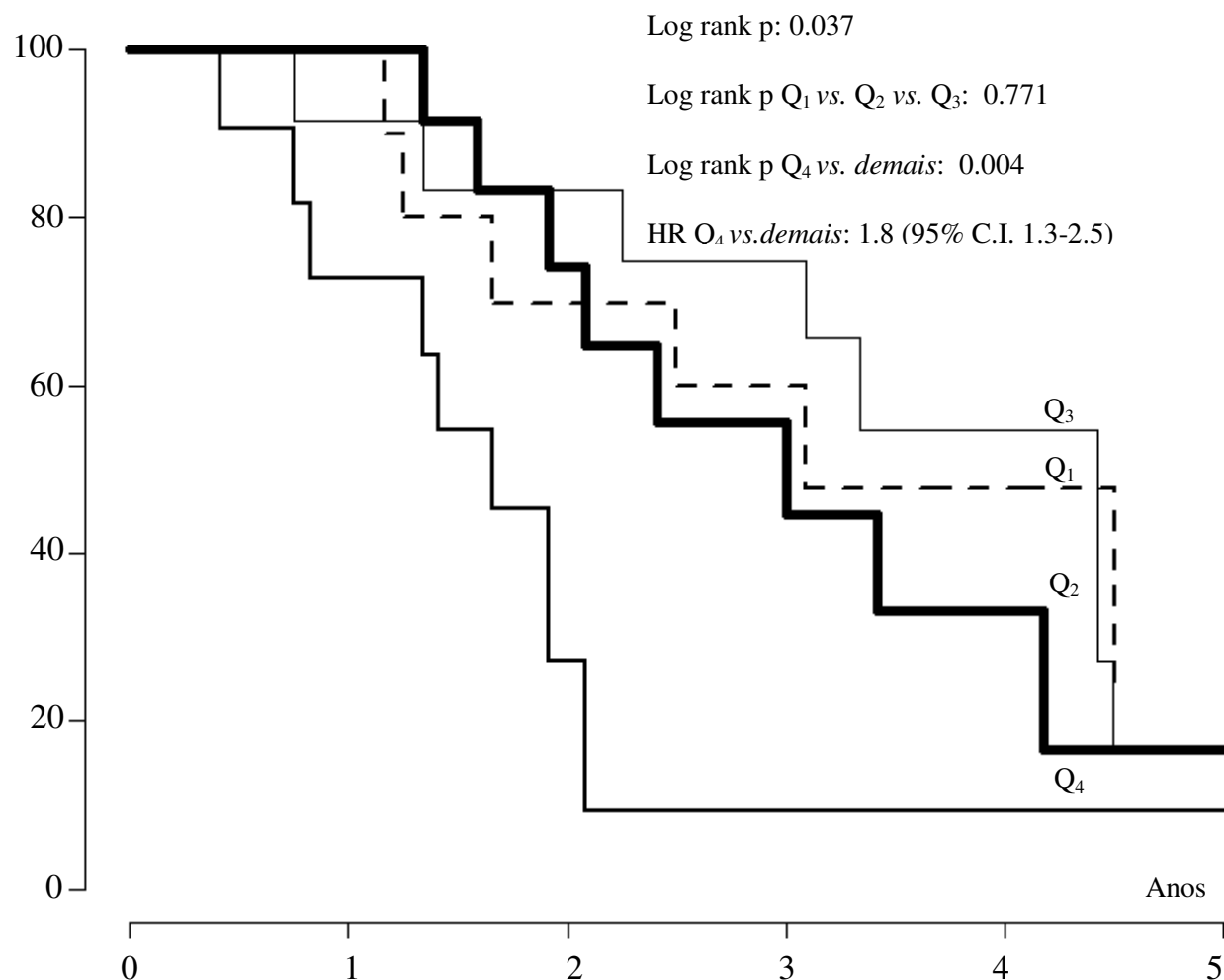
^c Primeira categoria *versus* as demais. CgA, cromogranina A; SSTR2, receptor da somatostatina subtipo 2.

Figura I. CgA sérica e presença do receptor androgênico nas células neoplásicas



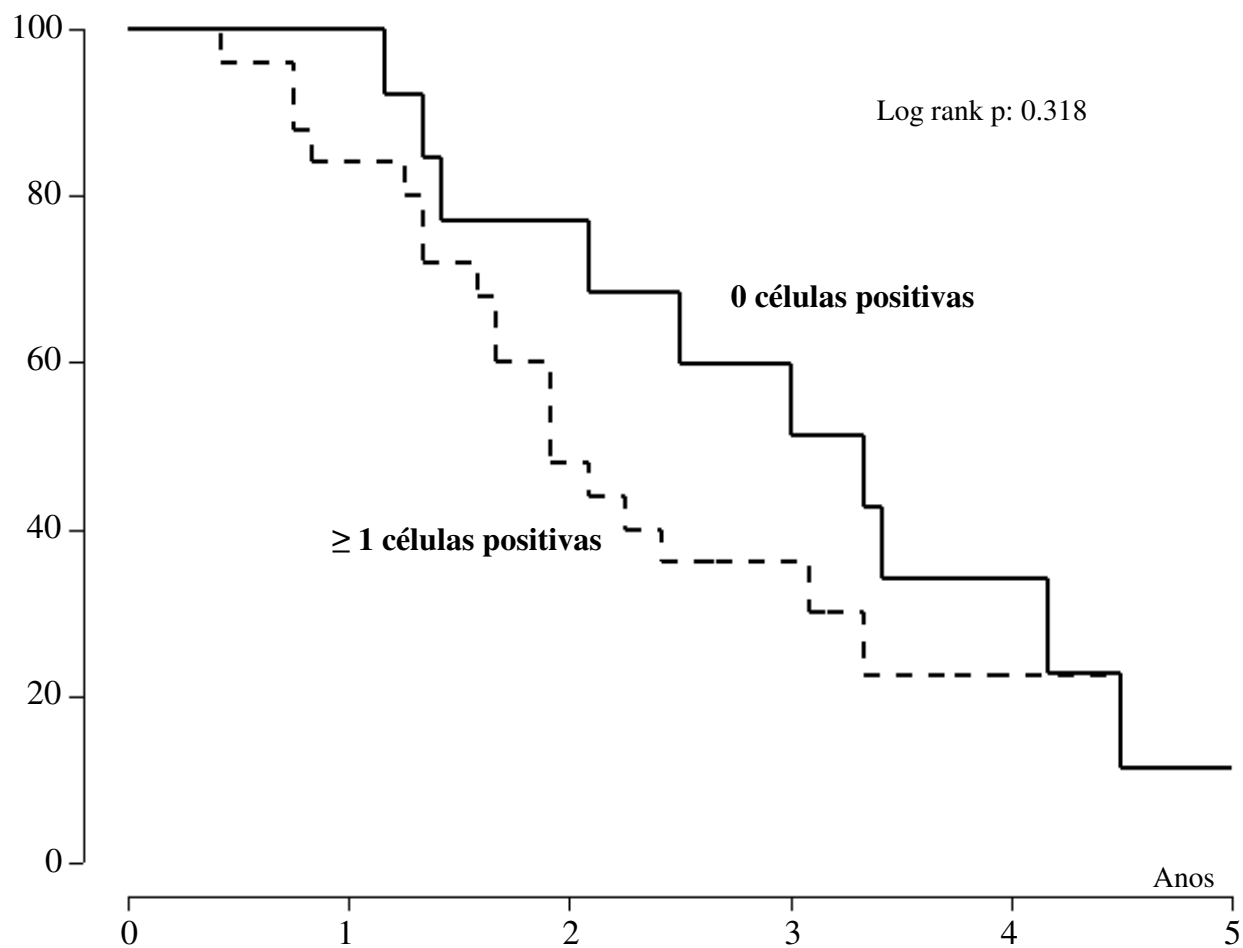
s-CgA, cromogranina A sérica; RA, receptor androgênico.

Figura II. Sobrevida global após o diagnóstico de CaPRC de acordo com a cromogranina A sérica



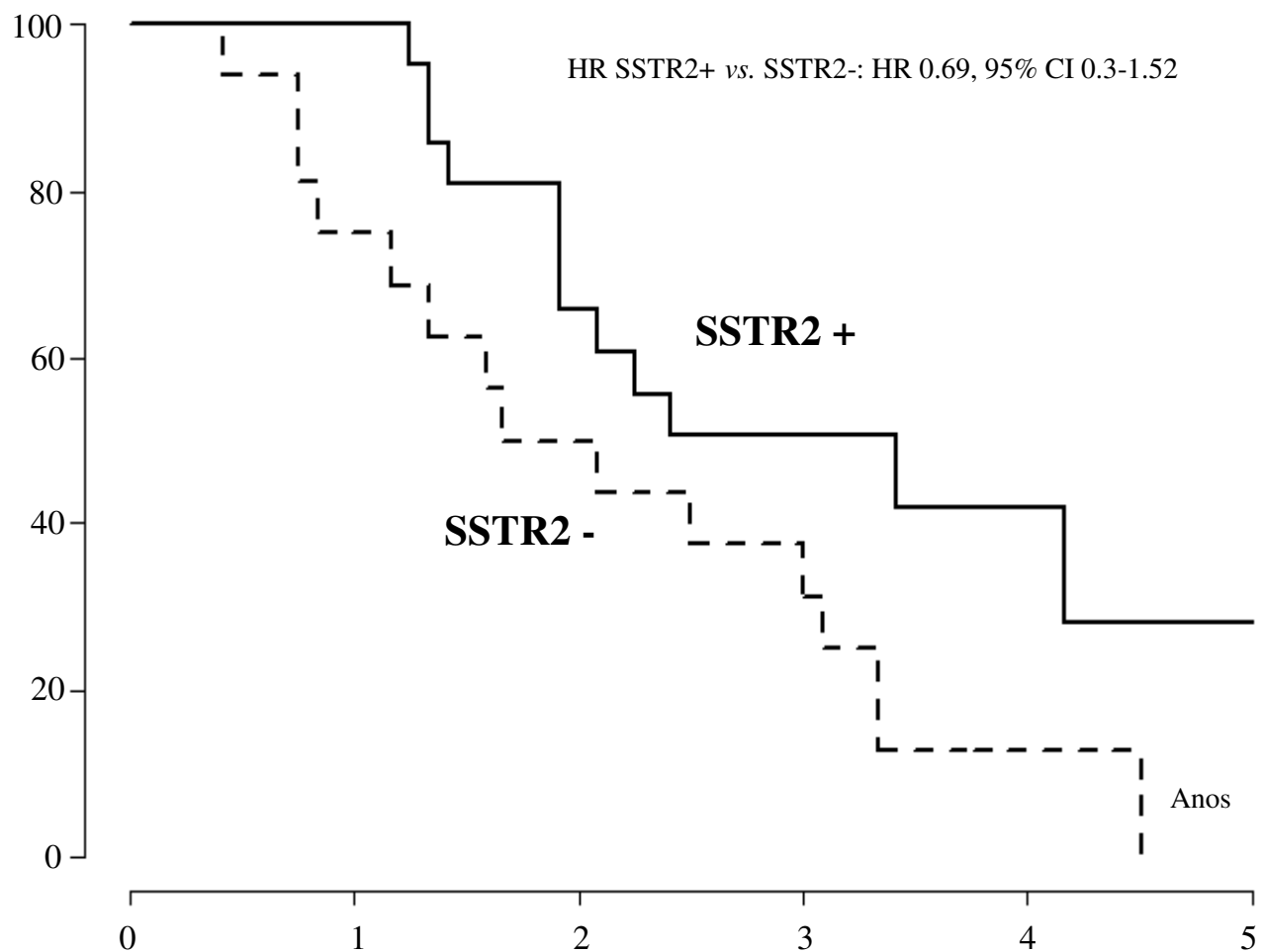
Valores da CgA sérica estratificados em quartis: Q₁: CgA<14; Q₂: 14≤CgA<24; Q₃: 24≤CgA<36; Q₄: CgA≥36. *Hazard ratios* ajustados para idade, PSA inicial, PSA atual, escore de Gleason e presença de metástases; † Calculado excluindo os pacientes que receberam análogo da somatostatina. CgA, cromogranina A; CaPRC, câncer de próstata resistente à castração; HR, *hazard ratio*.

Figura III. Sobrevida global após o diagnóstico de CaPRC de acordo com a presença de células neoplásicas positivas para CgA ^a



^a Calculado nos 39 pacientes com biópsia positiva. CgA, cromogranina A; CaPRC, câncer de próstata resistente à castração.

Figura IV. Sobrevida global após o diagnóstico de CaPRC de acordo com a presença de células neoplásicas positivas para SSTR2 ^a



^a Calculado nos 39 pacientes com biópsia positiva. *Hazard Ratios* ajustados para idade, PSA inicial, PSA atual, escore de Gleason e presença de metástases. SSTR2, receptor da somatostatina subtipo 2; HR, *hazard ratio*.

6 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

NEUROENDOCRINE DIFFERENTIATION IN CASTRATION- RESISTANT PROSTATE CANCER: A SYSTEMATIC DIAGNOSTIC APPROACH

Marcelo Pimentel^{a,b}, Deliu-Victor Matei^a, Giuseppe Renne^a, Maria Teresa Sandri^a, Edoardo Botteri^a, Concetta de Cicco^a, Walter Jose Koff^b, Ottavio de Cobelli^a

^a European Institute of Oncology, Milan, Italy

^b Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

INTRODUCTION: Neuroendocrine differentiation (NED) is associated with development of castration-resistant prostate cancer (CRPCa). Previous studies reported to characterize NED in CRPCa have controversial results. The aim of this study was to better establish presence and prognostic significance of NED in CRPCa.

METHODS: Forty-seven patients with CRPCa entered the study. Tissue expression of CgA (t-CgA), somatostatin receptor 2 (SSTR2), proliferation index Ki-67 and androgen receptor (AR) were evaluated immunohistochemically in prostate cancer needle biopsies. Serum CgA (s-CgA) was measured using immunoassay. Twenty-six patients underwent somatostatin receptor scintigraphy (Octreoscan).

RESULTS: s-CgA was elevated in 25 (54%) patients, t-CgA present in 26 (67% of biopsy positive patients) and SSTR2 in 22 (58% of biopsy positive patients). Octreoscan resulted positive in 4 (15%) patients. AR was positive in 20 (51%) patients. There was a trend of association between t-CgA and elevated s-CgA ($p=0.09$). Serum CgA was associated with PSA at NED evaluation ($p=0.04$) and t-CgA with Gleason score at diagnosis ($p=0.03$). SSTR2 was not associated with any clinical parameter studied. In multivariate analysis, s-CgA ≥ 36 U/l was associated with reduction in overall survival (HR 1.8, 95% CI 1.3-2.5, $P=0.004$). Tissue CgA was associated with a reduction in survival not significant ($p=0.31$) and SSTR2 with better survival, while not statistical significant (HR 0.69, 95% CI 0.3-1.52).

CONCLUSIONS: We have found an elevated prevalence of NED in CRPCa patients. In our series NED markers were associated with an elevated PSA, higher Gleason scores and decrease in overall survival. These findings must be confirmed in larger studies.

KEYWORDS: castration-resistant prostate cancer; neuroendocrine differentiation; chromogranin A; detection; prognosis

Introduction: Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed solid malignant tumour among men in the United States and Western Europe (1, 2). Although local therapies are very effective in treating localized PCa and androgen deprivation therapy (ADT) induces initially good results in advanced cases, disease may progress to a castration-resistant state. Neuroendocrine differentiation (NED) and neuroendocrine (NE) cell hyperactivation might play a key role in the pathogenesis of castration-resistant prostate cancer (CRPCa) through bioactive neuropeptide production and secretion (3), rendering the potential prognostic and therapeutic implications of NED in PCa an important and timely topic.

NE cells have generally a focal distribution in a population of predominantly adenocarcinoma cells and serum or tissue levels of NE cell products might reflect their activity (4, 5). Chromogranin A (CgA) is the main product of NE cells and the most utilized serum and tissue marker of NED (6). The reported detection rate of NED in PCa patients was found to be 10-100%, depending on the definition, method and population studied (7-12). Considering only CRPCa, Cabrespine (13) reported an increased serum CgA in 45% of patients and examining autopsy tissue in a subgroup of 15 patients, Casella (14) demonstrated presence of tissue CgA in 80% of his series.

As chemotherapy (15) or immunotherapy (16) minimally improve survival of CRPCa patients, there is an increasing interest in the development of other therapies. In this way, new targeted chemotherapy agents based on somatostatin analogues and cytotoxic somatostatin conjugates are under development (17-19). As a result, careful determination of NED presence, with identification of subgroups of potentially responders to a given therapy, seems a very important goal.

Results of NED markers as prognostic indicators in PCa are controversial. Some authors have found an association between NED and a worse prognosis (20-22), while others failed to find this relation (13, 23). Previous studies trying to characterize NED in PCa generally have some methodological limitations: heterogeneous disease stage, heterogeneous specimen method of collection (transurethral resection, core biopsy, radical prostatectomy, autopsy) and heterogeneous NED markers panel. As a result, it is difficult to simply transfer their conclusions to CRPCa population. The objective of this study was to better establish the prevalence, relation with clinical parameters and prognostic significance of NED in a homogeneous group of patients with CRPCa, using a simple panel of specific immunostaining of biopsy specimens, serum levels of CgA and somatostatin receptor scintigraphy (Octreoscan).

Patients and methods: From January 2003 to December 2006, 47 patients with CRPCa not previously submitted to radical prostatectomy, treated at the European Institute of Oncology, Milan, Italy, underwent transperineal US-guided sextant prostate biopsies and blood sample collection. CRPCa was defined as three or more successive PSA rising over nadir with castrate testosterone levels and after antiandrogen withdrawal for at least four weeks and/or radiological progression (24). All patients were maintained in ADT with LHRH analogue and in all but three patients oral estramustine plus etoposide based chemotherapy was ongoing at the moment of enrolling in the study as part of a phase II trial (25). Twenty-six patients underwent in vivo somatostatin receptor scintigraphy (Octreoscan). After NED evaluation a subgroup of 16 patients in biochemical and/or clinical progression underwent somatostatin analogue plus oral estradiol therapy.

Laboratory: Serum CgA (s-CgA) was measured by means of an enzyme-linked

immunoabsorbent assay (ELISA) kit (Dako, Glostrup, Denmark). **Pathology:** Tissue specimens were obtained with a 16 Gauge Tru-Cut biopsy needle, formalin-fixed and paraffin-embedded. For each case, archival hematoxylin and eosin sections and paraffin blocks were retrieved. Hematoxylin and eosin staining was used to determine the presence of prostate cancer cells, histological type and Gleason score. **Immunohistochemistry:** Immunohistochemical study was performed on paraffin-embedded tissues of positive core biopsies. It was utilized a panel of commercially available primary monoclonal antibodies: chromogranin A (Signet Laboratories, Dedham, USA), Ki-67 antigen (MIB-1) (Immunotech, Marseille, France), androgen receptor (Oncogene Science, Cambridge, USA) and somatostatin receptor (Bio Trend, Koln, Germany). After blocking endogenous peroxidase with 5% hydrogen peroxide for 12 minutes, dewaxed sections were reacted with the primary antibodies for 30 minutes at room temperature using an automatic immunostainer (Dako Autostainer, Dako, Glostrup, Denmark) and then incubated with a high-sensitivity detection kit according to the manufacturer's instructions (Dako En Vision Plus-HRP, Dako, Glostrup, Denmark). The specificity of all immunoreactions was double-checked by substituting the primary antibody with a nonrelated, isotypic mouse immunoglobulin at a comparable dilution or with normal serum alone. Appropriate internal positive controls were also checked in all reactions. The percentage of immunoreactive tumour cells for each marker (labeling index) was evaluated by counting (where present) at least 1000 tumour cells in representative fields of immunostaining using a standard light microscope. Evaluations of immunohistochemical staining were reviewed independently and blindly by two pathologists, counting each sample three times; thus, the highest score for each antibody and the highest score between the two observers were reported. Stromal

chromogranin was reported as absent or present. The presence of cytoplasmic chromogranin on neoplastic cells was reported as 0 cells positive, 1-5 cells positive and > 5 cells positive. The percentages of positive cells was also evaluated semi-quantitatively on a scale from 0 to 3 (0 = staining absent or observed in less than 5% of neoplastic cells, 1 = 5 to 25%, 2 = 26 to 50% and 3 = more than 51%). The somatostatin receptor subtype 2 (SSTR2) was recorded as positive if staining was identified in the cytoplasm or membrane of tumour cells and the percentages of positive cells were reported with a cut-off of 10%. We have also verified the staining for SSTR2 within the stromal area. **Somatostatin receptor scintigraphy:** scintigraphy with In 111-DTPA-octreotide (Octreoscan) was performed in 26 patients (55%). The labelling of the Octreoscan was performed according to instructions provided by the manufacturer (Mallinckrodt, Petten, NL). Whole body images were performed at 4 and 24 h after injection of 110-150MBq of In 111-DTPA-octreotide. A double headed gamma camera, equipped with a medium-energy collimator, was used (Infinia, GE Healthcare). The collection of original data for single photon emission computed tomography (SPECT) images was performed by means of a 64 step rotation 360° in a 64x64 word matrix. Energy windows of 171 and 245 keV + 20% were used. The collection time for each angle was 60s, amounting for approximately 40.000 counts/angle. For reconstruction of SPECT images a Butterworth filter was applied to the original data.

The study was approved by the institutional review board of the hospital and all patients gave written informed consent.

Statistics: The chi-square test, Fisher exact test or Mantel-Haenszel chi-square test for ordinal variables were used to compare percentages between groups. Medians were compared using the non-parametric two-sample median test. If appropriate, log transformation of values was performed in linear regression models. Overall survival was defined as the time interval from the date of castration-resistant disease to death from any cause. Patients alive were censored at last follow-up visit. Survival was plotted using the Kaplan-Meier method. The log rank test was used to assess survival differences between groups in the univariate analysis. Multivariate Cox proportional hazards regression models were used to identify the prognostic independent clinicopathological features associated with survival. All tests were two sided. All analyses were performed with the SAS software (SAS Institute, Cary, USA).

Results: Patients clinical characteristics are shown in Table I. Median duration of hormone sensitivity period was 16.5 months while median time from castration-resistant status to NED evaluation was 8 months. Biopsy specimen showed tumour in 39 patients (83%).

Prevalence: if s-CgA was considered alone, 25 (54%) patients could be defined as having NED. Considering immunohistochemical findings, 26 patients (67% of biopsy positive patients) had positive tissue CgA (t-CgA), while 22 patients (58% of biopsy positive patients) showed tissue presence of SSTR2. The androgen receptor (AR) was positive in neoplastic cells in 20 patients (51% of biopsy positive patients) and median observed proliferation rate index Ki-67 was 10% (range 1-80).

Relation between NED markers and clinical parameters: as outlined in Table II, elevated s-CgA was associated with high PSA value at time of NED evaluation (actual PSA), with a

median PSA of 25ng/ml for patients with s-CgA \leq 20 U/l and 50ng/ml for those with s-CgA $>$ 20 U/l ($p=0.04$). Nevertheless, s-CgA was not associated with PSA and Gleason score at diagnosis, initial treatment, presence of metastasis or duration of ADT.

Presence of cytoplasmic CgA positive neoplastic cells (t-CgA) was associated with higher Gleason scores at diagnosis, 50% of patients with positive t-CgA cells had Gleason score \geq 8, versus 11% in the negative group ($p=0.03$). Median duration of ADT was 36 months for patients with no t-CgA positive cells, 18 for patients with 1-5 positive cells and 23 for those with more than 5 positive cells ($p=0.02$, comparing no cells versus \geq 1 positive cells). Median duration of castration-resistant disease till NED valuation was 13 months for patients with no t-CgA positive cells, 4 for patients with 1-5 positive cells and 7 for those with more than 5 positive cells ($p=0.05$, comparing no cells versus \geq 1 positive cells). The t-CgA was not associated with PSA at diagnosis, initial treatment, presence of metastasis or actual PSA. Presence of SSTR2 on neoplastic cells was not associated with any of the clinical parameters evaluated.

Relation between NED markers: association between s-CgA and immunohistochemical parameters is summarized in Table III. There was a trend of association between presence of cytoplasmic positive neoplastic cells (t-CgA) and elevated (\geq 20 U/l) s-CgA ($p=0.09$). Percentage of positive t-CgA cells (cytoplasmic CgA density) was not associated with s-CgA. In the same way there was no association between presence of SSTR2 and s-CgA. There was a trend of positive relation involving s-CgA and percentage of AR positive neoplastic cells ($p=0.064$) (figure 1).

Relation between NED markers and clinical course: median follow up after diagnosis of CRPCa was 32 months (5-72). Five year overall survival (OS) was 50% if considered from

the day of beginning of ADT and 15% from the onset of CRPCa. Considering a cut-off level of 20 U/l for s-CgA, difference in OS after diagnosis of CRPCa didn't reached statistical significance. Stratifying patients in quartiles accordingly to s-CgA: Q1: s-CgA<14; Q2: 14≤s-CgA<24; Q3: 24≤s-CgA<36; Q4: s-CgA≥36, values of s-CgA ≥ 36 U/l were associated with a modest decrease in OS (figure 2), even when adjusted for age, PSA, metastatic status, Gleason score and treatment with somatostatin analogue (HR Q4 vs. others 1.8 (95% CI 1.3-2.5). Presence of cytoplasmic CgA positive cells (t-CgA) was associated with a reduction in OS after CRPCa diagnosis, but this difference didn't reach statistical significance (figure 3). Tissue evidence of SSTR2 was associated to a better survival on univariate analysis. This tendency loses its statistical significance when data are adjusted for age, PSA, Gleason score and metastatic status (HR 0.69, 95% CI 0.3-1.52) (figure 4).

In vivo NED evaluation: of the 26 patients submitted to somatostatin receptor scintigraphy (Octreoscan) four (15%) showed in vivo presence of SSTR, matching with bone and lymph node metastases in three and one patient respectively. All patients with a positive Octreoscan had a rather good expression of SSTR2 in the neoplastic tissue (20, 40, 40 and 90% of neoplastic cells positive).

Discussion: Detection of NE activity and definition of NED presence in PCa patients remains a controversial issue in literature. Prevalence of NED in PCa seems to be a result of NED definition assumed. As a result, in the literature it varies from 10% to 100% (7-10, 14). To our knowledge, this is the first study to consider a composite panel of examinations including blood sample, prostate biopsy and Octreoscan to define NED presence and its

prognostic implications in a homogeneous group of CRPCa patients. According to this panel, prevalence of NED was 54%, if based on s-CgA level, 67% considering presence of t-CgA and 58% taken into account presence of SSTR2 positive neoplastic cells. Independently of definition assumed, we have found a high prevalence of NED in this specific population of CRPCa. This information might be useful for the development of new treatment modalities and strategies for this advanced stage disease.

In our series an elevated s-CgA was associated with higher PSA values at moment of NED evaluation. Previous studies with patients at different disease stages didn't find this association (11, 26). Moreover, as reported by Sasaki et al. (27), during endocrine therapy s-CgA elevation precedes PSA increase. In our study s-CgA and PSA were measured at an end stage disease, when PSA level was already high. Considering this, we had the two markers elevated at the same time, justifying this relation. We have found a positive relation between positive t-CgA and higher initial Gleason score, confirming data from previous studies that included patients at different disease stages (10, 11, 22, 23). This relation might indicate that tumours exhibiting a more aggressive pattern at the beginning of its course are supposed to develop NED more frequently.

The presence of t-CgA was not associated with a longer period of ADT or castration-resistant disease in the present series. Previous studies reported a positive association between NED and hormonal therapy (8, 13, 27, 28). In fact, a longer period of ADT might induce NED, but probably not in all patients. In a CRPCa population, as the case of our series, the potential role of long lasting ADT in promoting NED is not clear. It's not possible to differentiate whether the increase of NED is attributable to condition of castration-resistant or long-term ADT (8). Besides this, diseases rapidly progressing

towards castration-resistant may majorly express NE features, even with a short period of ADT.

We have found a trend of association between the presence of t-CgA positive neoplastic cells and an elevated s-CgA that not reached statistical significance ($p=0.09$). Angelsen (7) have demonstrated an association between serum and tissue NED markers in a small series, with less than a half under ADT. Analyzing core biopsies from newly diagnosed PCa patients, Bollito (11) found a relation between s-CgA and t-CgA, particularly in metastatic cases. In our patients presence of SSTR2 positive neoplastic cells was not associated with s-CgA levels or t-CgA presence, suggesting that these markers stain different cells and probably reveal different aspects of NED phenotype in CRPCa.

Prostatic NE cells are fully differentiated postmitotic cells with no proliferative activity and are negative for Ki-67 (5). Proliferation index Ki-67 of cancer cells resulted however rather high (10%) in our series. As demonstrated in previous reports (11, 28), proliferation index of neoplastic cells adjacent to NE cells is increased. Jongsma (29) showed that proliferation of PCa cell lines in conditions of androgen depletion can be modulated by neuropeptides with mitogenic effects produced by NE cells, justifying this high proliferation index. Grobholz (30) found a positive association between Ki-67 index and NED in radical prostatectomy specimens. Contrarily, Ishida (23) and Casella (14) didn't find this association in tissue obtained from radical prostatectomies and core biopsies of untreated patients, respectively.

Immunohistochemical studies show that AR is not expressed in prostatic NE cells (31) and NED has been proposed as one contributing factor for the development of CRPCa. Besides this, high levels of AR expression and development of hypersensitive receptors has

been recognized as another feature associated with the development of CRPCa (3). The prevalence of AR positive cells in our series is high (53%), confirming the hypersensitive/overexpression pathway for the development of CRPCa. Interestingly, we have found a positive relation between s-CgA and presence of AR, possibly reflecting the action of proliferative factors produced by NED cells on adjacent exocrine (AR positive/overexpressed) neoplastic cells.

Data on prognostic impact of NED in PCa are conflicting. In patients presenting with CRPCa, elevated levels of s-CgA were associated with a poorer prognosis, as demonstrated by Taplin (20) and Berruti (21, 32). However this finding was not confirmed by Cabrespine (13). Our results show that high levels of s-CgA were associated with a modest reduction on overall survival with statistical significance. More aggressive course of disease in patients presenting NED could be determined by the capacity of NE differentiated PCa cells to escape apoptosis (33), NED cells can survive and continue acting in the androgen-deprived environment (34), producing and secreting potent neuropeptides that stimulate cell growth, differentiation, transformation and invasion .

Prognostic value of NED tissue markers is more controversial. These conflicting results may be due to the heterogeneous population studied, the limited amount of tissue samples or the unequal distribution on NED tumour cells on prostate (6). Some authors didn't find an association between tissue evidence of CgA and worse prognosis examining tissues obtained from radical prostatectomies (23, 35, 36) or core biopsies in untreated (14) or metastatic (37) patients. On the contrary, others studies have demonstrated a worse outcome associated with t-CgA presence analysing prostate biopsy specimens of stage D2 (12) or newly diagnosed patients (22, 28). We have found that presence of t-CgA was

associated with a worse prognosis, while not statistically significant. On the other hand, tissue evidence of SSTR2 was associated with a better survival (without statistical significance), suggesting once more that these markers reveal different aspects of NED phenotype in PCa. In this regard, our study is the first valuating prognostic value of t-CgA and SSTR2 in a group composed of only CRPCa patients.

Scintigraphic imaging with radiolabeled analogues of somatostatin, such as In 111-DTPA-octreotide (Octreoscan), are used clinically for localization of tumours expressing receptors for somatostatin (38). Studies on the use of Octreoscan in CRPCa are rather scarce. Nilsson (39) found some positive Octreoscan result in 94% of 31 patients with CRPCa, but only 37% of all bone metastases detected by 99 Tc-labeled bone scan presented some Octreoscan uptake. More recently, series of CRPCa presented lower rates of Octreoscan positivity: 85% of 20 cases, all with low intensity uptake (40), and only 37% of 20 cases (41). We have found a low rate of Octreoscan positivity, but it has to be noted that all patients with a positive result had a rather good expression of SSTR2 in the neoplastic tissue. This fact could indirectly indicate that for a positive scan an elevated presence of SSTR2 is required.

Immunohistochemical staining for NE products on neoplastic tissue indicates storage, but not necessarily production or secretion of these products (4); besides this, it may be difficult to obtain tissue samples that adequately represent NED of entire prostate tumour (42). This is especially true in patients previously submitted to radical prostatectomy. On the other hand, serum levels of NE markers (CgA) could better represent NED of entire tumour and its metastasis. However, the presence of serum products may not reflect exactly the NE activity on prostate, because tissue receptors are needed for its action

(4). Considering this, analysis of both serum and tissue markers could better define NED pattern in an individual basis.

Our study has some limitations. The small patient sample size and limited amount of tissue obtained from core biopsies make that our findings must be interpreted with caution. Different NED markers, as neurone-specific enolase, synaptophysin or chromogranin B, and others subtypes of SSTR family, were not included in our panel. As prostatic tissue was needed for immunohistochemical analysis, patients previously submitted to radical prostatectomy were not included, possibly inducing some selection bias.

Conclusions: In a homogenous group of CRPCa patients we have found a high prevalence of NED defined by presence of serum or tissue markers. NED markers were associated with high PSA, high initial Gleason score and a decrease on overall survival. No relation was found between these markers, probably due to the different aspects of NED phenotype reflected by each one. In this way we propose a multi-indicator panel of NED in CRPCa utilizing serum chromogranin A and immunohistochemical staining for CgA, somatostatin receptor subtype 2 and proliferation index Ki-67 in the neoplastic tissue. Somatostatin receptor scintigraphy (Octreoscan) was positive in a very small subgroup of patients, so its application in this setting is questionable. These findings must be confirmed in larger studies and may establish NED as an important prognostic indicator and target for development of new therapies for CRPCa patients.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Jun 17.
3. Bonkhoff H, Berges R. From pathogenesis to prevention of castration resistant prostate cancer. *Prostate*. 2010 Jan 1;70(1):100-12.
4. Sciarra A, Mariotti G, Gentile V, Voria G, Pastore A, Monti S, et al. Neuroendocrine differentiation in human prostate tissue: is it detectable and treatable? *BJU Int*. 2003 Mar;91(5):438-45.
5. Komiya A, Suzuki H, Imamoto T, Kamiya N, Nihei N, Naya Y, et al. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *Int J Urol*. 2009 Jan;16(1):37-44.
6. Vashchenko N, Abrahamsson PA. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *Eur Urol*. 2005 Feb;47(2):147-55.
7. Angelsen A, Syversen U, Haugen OA, Stridsberg M, Mjølnerod OK, Waldum HL. Neuroendocrine differentiation in carcinomas of the prostate: do neuroendocrine serum markers reflect immunohistochemical findings? *Prostate*. 1997 Jan 1;30(1):1-6.
8. Hirano D, Okada Y, Minei S, Takimoto Y, Nemoto N. Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *Eur Urol*. 2004 May;45(5):586-92; discussion 92.

9. Sciarra A, Di Silverio F, Autran AM, Salciccia S, Gentilucci A, Alfarone A, et al. Distribution of high chromogranin A serum levels in patients with nonmetastatic and metastatic prostate adenocarcinoma. *Urol Int.* 2009;82(2):147-51.
10. Theodoropoulos VE, Tsigka A, Mihalopoulou A, Tsoukala V, Lazaris AC, Patsouris E, et al. Evaluation of neuroendocrine staining and androgen receptor expression in incidental prostatic adenocarcinoma: prognostic implications. *Urology.* 2005 Oct;66(4):897-902.
11. Bollito E, Berruti A, Bellina M, Mosca A, Leonardo E, Tarabuzzi R, et al. Relationship between neuroendocrine features and prognostic parameters in human prostate adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 2:S159-64.
12. Kokubo H, Yamada Y, Nishio Y, Fukatsu H, Honda N, Nakagawa A, et al. Immunohistochemical study of chromogranin A in Stage D2 prostate cancer. *Urology.* 2005 Jul;66(1):135-40.
13. Cabrespine A, Guy L, Gachon F, Cure H, Chollet P, Bay JO. Circulating chromogranin a and hormone refractory prostate cancer chemotherapy. *J Urol.* 2006 Apr;175(4):1347-52.
14. Casella R, Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC. Focal neuroendocrine differentiation lacks prognostic significance in prostate core needle biopsies. *J Urol.* 1998 Aug;160(2):406-10.
15. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004 Oct 7;351(15):1502-12.

16. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 29;363(5):411-22.
17. Stangelberger A, Schally AV, Djavan B. New treatment approaches for prostate cancer based on peptide analogues. *Eur Urol*. 2008 May;53(5):890-900.
18. Sciarra A, Cardi A, Dattilo C, Mariotti G, Di Monaco F, Di Silverio F. New perspective in the management of neuroendocrine differentiation in prostate adenocarcinoma. *Int J Clin Pract*. 2006 Apr;60(4):462-70.
19. Sciarra A, Panebianco V, Ciccariello M, Salciccia S, Gentilucci A, Lisi D, et al. Complete response to the combination therapy with androgen blockade and somatostatin analogue in a patient with advanced prostate cancer: magnetic resonance imaging with ¹H-spectroscopy. *Eur Urol*. 2008 Mar;53(3):652-5.
20. Taplin ME, George DJ, Halabi S, Sanford B, Febbo PG, Hennessy KT, et al. Prognostic significance of plasma chromogranin a levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated in Cancer and Leukemia Group B 9480 study. *Urology*. 2005 Aug;66(2):386-91.
21. Berruti A, Mosca A, Tucci M, Terrone C, Torta M, Tarabuzzi R, et al. Independent prognostic role of circulating chromogranin A in prostate cancer patients with hormone-refractory disease. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Mar;12(1):109-17.
22. Berruti A, Bollito E, Cracco CM, Volante M, Ciccone G, Porpiglia F, et al. The prognostic role of immunohistochemical chromogranin a expression in prostate cancer patients is significantly modified by androgen-deprivation therapy. *Prostate*. 2010 May 15;70(7):718-26.

23. Ishida E, Nakamura M, Shimada K, Tasaki M, Konishi N. Immunohistochemical analysis of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Pathobiology*. 2009;76(1):30-8.
24. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, et al. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol*. 2008 Jan;53(1):68-80.
25. Spitaleri G, Matei DV, Curigliano G, Detti S, Verweij F, Zambito S, et al. Phase II trial of estramustine phosphate and oral etoposide in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Ann Oncol*. 2009 Mar;20(3):498-502.
26. Deftos LJ, Nakada S, Burton DW, di Sant'Agnese PA, Cockett AT, Abrahamsson PA. Immunoassay and immunohistology studies of chromogranin A as a neuroendocrine marker in patients with carcinoma of the prostate. *Urology*. 1996 Jul;48(1):58-62.
27. Sasaki T, Komiya A, Suzuki H, Shimbo M, Ueda T, Akakura K, et al. Changes in chromogranin a serum levels during endocrine therapy in metastatic prostate cancer patients. *Eur Urol*. 2005 Aug;48(2):224-9; discussion 9-30.
28. Berruti A, Mosca A, Porpiglia F, Bollito E, Tucci M, Vana F, et al. Chromogranin A expression in patients with hormone naive prostate cancer predicts the development of hormone refractory disease. *J Urol*. 2007 Sep;178(3 Pt 1):838-43; quiz 1129.
29. Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, Romijn JC, van Der Kwast TH, Schroder FH, et al. Androgen-independent growth is induced by neuropeptides in human prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2000 Jan;42(1):34-44.
30. Grobholz R, Griebel M, Sauer CG, Michel MS, Trojan L, Bleyl U. Influence of neuroendocrine tumor cells on proliferation in prostatic carcinoma. *Hum Pathol*. 2005 May;36(5):562-70.

31. Huang J, Yao JL, di Sant'Agnese PA, Yang Q, Bourne PA, Na Y. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. *Prostate*. 2006 Sep 15;66(13):1399-406.
32. Berruti A, Dogliotti L, Mosca A, Bellina M, Mari M, Torta M, et al. Circulating neuroendocrine markers in patients with prostate carcinoma. *Cancer*. 2000 Jun 1;88(11):2590-7.
33. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 2002 Oct 1;53(2):118-23.
34. Sun Y, Niu J, Huang J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am J Transl Res*. 2009;1(2):148-62.
35. Veltri RW, Isharwal S, Miller MC, Epstein JI, Mangold LA, Humphreys E, et al. Long-term assessment of prostate cancer progression free survival: evaluation of pathological parameters, nuclear shape and molecular biomarkers of pathogenesis. *Prostate*. 2008 Dec 1;68(16):1806-15.
36. Ahlegren G, Pedersen K, Lundberg S, Aus G, Hugosson J, Abrahamsson P. Neuroendocrine differentiation is not prognostic of failure after radical prostatectomy but correlates with tumor volume. *Urology*. 2000 Dec 20;56(6):1011-5.
37. Yamada Y, Nakamura K, Aoki S, Taki T, Naruse K, Matsubara H, et al. An immunohistochemical study of chromogranin A and human epidermal growth factor-2 expression using initial prostate biopsy specimens from patients with bone metastatic prostate cancer. *BJU Int*. 2007 Jan;99(1):189-95.
38. Reubi JC, Maecke HR. Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med*. 2008 Nov;49(11):1735-8.

39. Nilsson S, Reubi JC, Kalkner KM, Laissue JA, Horisberger U, Olerud C, et al. Metastatic hormone-refractory prostatic adenocarcinoma expresses somatostatin receptors and is visualized in vivo by [111In]-labeled DTPA-D-[Phe1]-octreotide scintigraphy. *Cancer Res.* 1995 Dec 1;55(23 Suppl):5805s-10s.
40. Kalkner KM, Acosta S, Thorsson O, Frederiksen H, Nilsson A, Gustavsson B, et al. Octreotide scintigraphy and Chromogranin A do not predict clinical response in patients with octreotide acetate-treated hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2006;9(1):92-8.
41. Mencobonii M, Tredici S, Rebella L, Bergaglio M, Galbusera V, Manzara A, et al. Effect of chemotherapy on somatostatin receptor detection with octreotide scintigraphy in hormone-refractory prostate cancer patients. *Anticancer Res.* 2006 May-Jun;26(3B):2233-5.
42. Cohen MK, Arber DA, Coffield KS, Keegan GT, McClintock J, Speights VO, Jr. Neuroendocrine differentiation in prostatic adenocarcinoma and its relationship to tumor progression. *Cancer.* 1994 Oct 1;74(7):1899-903.

Table I. Patients characteristics

Total (No.)		47
Age (years)	Median	66
	(Range)	(53-87)
PSA at PCa diagnosis (ng/ml)	Median	52
	(Range)	(4-2.500)
Gleason score ^a	≤6 (%)	11 (31)
	7 (%)	10 (29)
	≥8 (%)	14 (40)
Initial treatment	RT+ADT (%)	15 (32)
	ADT (%)	32 (68)
Duration of ADT (months)	Median	29
	(Range)	(9-198)
Duration of CRPCa till NED valuation (months)	Median	8
	(Range)	(0-37)
Metastasis	Yes (%)	41 (87)
PSA at NED valuation (ng/ml)	Median	36
	(Range)	(2-5580)

^a One or more than one patient had missing data. PSA, prostate-specific antigen; PCa, prostate cancer; RT, external radiotherapy; ADT, androgen deprivation therapy; CRPCa, castration-resistant prostate cancer; NED, neuroendocrine differentiation.

Table II. Clinical characteristics and relation with serum and immunohistochemical NED analysis

Clinical parameters		Serum CgA			Cytoplasmic CgA positive neoplastic cells ^b				SSTR2 ^{a, b}		
		≤20 U/l	>20 U/l	P	0 cells	1-5 cells	>5 cells	P	-	+	P
PSA at PCa diagnosis (ng/ml)	Median	40	56	0.17	53	49	30	0.90	40	50	0.74
	(Range)	(4-1280)	(13-2500)		(11-2287)	(4-2100)	(12-108)	0.65 ^c	(4-2100)	(11-2287)	
Gleason score ^a	≤6 (%)	6 (35)	5 (29)	1.0	5 (56)	1 (9)	3 (33)	0.26	4 (29)	5 (36)	0.80
	7 (%)	4 (24)	5 (29)		3 (33)	3 (27)	3 (33)	0.03 ^c	5 (36)	3 (21)	
	≥8 (%)	7 (41)	7 (41)		1 (11)	7 (64)	3 (33)		5 (36)	6 (43)	
Initial treatment	RT+ADT (%)	7 (33)	7 (28)	0.70	3 (23)	4 (29)	6 (50)	0.16	7 (44)	6 (27)	0.29
	ADT (%)	14 (67)	18 (72)		10 (77)	10 (71)	6 (50)	0.34 ^c	9 (56)	16 (73)	
Duration of ADT (months)	Median (Range)	28 (13-95)	29 (9-198)	0.87	36 (12-82)	18 (9-95)	23 (11-75)	0.05 0.02 ^c	27 (9-82)	25 (11-95)	0.89
Duration of CRPCa till NED valuation (months)	Median (Range)	9 (0-24)	8 (0-37)	0.55	13 (4-37)	4 (0-24)	7 (2-21)	0.14 0.05 ^c	7 (0-25)	8 (0-37)	0.82
Metastasis	Yes (%)	19 (90)	22 (88)	1.0	12 (92)	12 (86)	9 (75)	0.24 0.35 ^c	13 (81)	19 (86)	0.67
PSA at NED valuation (ng/ml)	Median (Range)	25 (6-1175)	50 (4-5580)	0.04	37 (8-1175)	31 (10-570)	18 (2-5580)	0.83 0.65 ^c	30 (2-5580)	28 (4-1175)	1.0

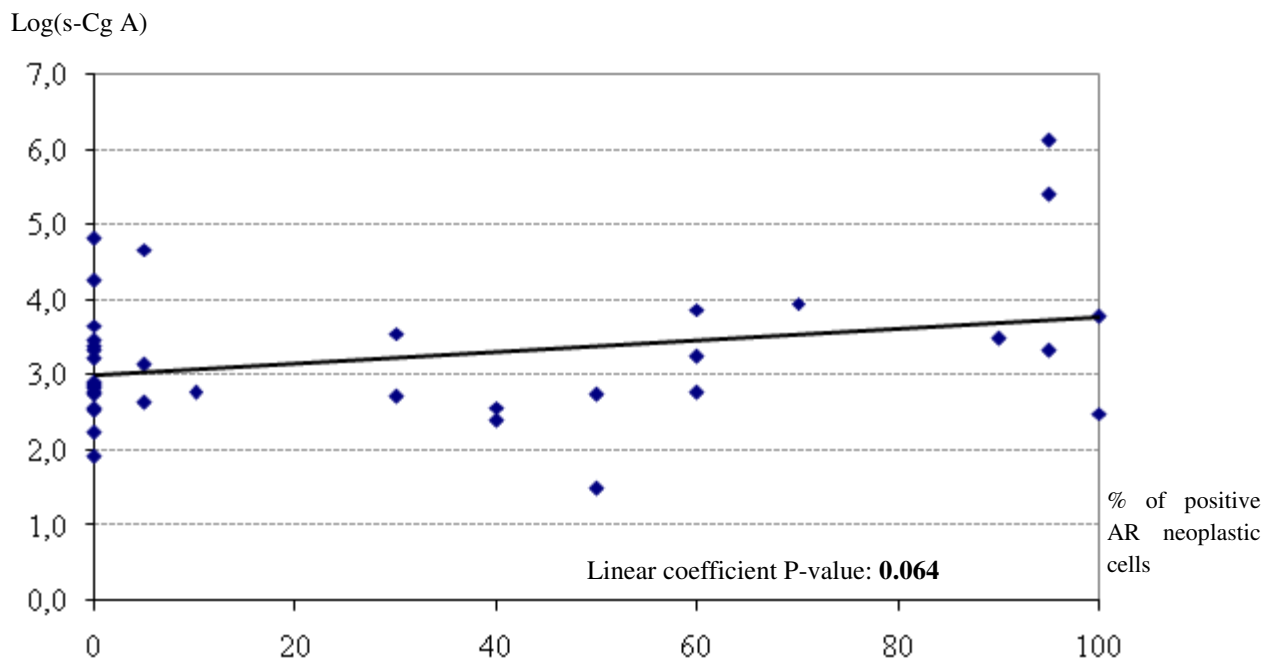
^a One or more than one patient had missing data; ^b Calculated on 39 patients with positive biopsy; ^c 0 cells *versus* ≥1cells. NED, neuroendocrine differentiation; CgA, chromogranin A; SSTR2, somatostatin receptor subtype 2; PSA, prostate-specific antigen; PCa, prostate cancer; RT, external radiotherapy; ADT, androgen deprivation therapy; CRPCa, castration-resistant prostate cancer.

Table III. Serum CgA and immunohistochemical parameters

Immunohistochemical Parameters		Total N=47	Serum CgA ≤20 U/l N=21	Serum CgA >20 U/l N=25	P
Stromal CgA (%)	Absent	42 (89)	19 (90)	22 (88)	1.0
	Present	5 (11)	2 (10)	3 (12)	
Cytoplasmic CgA positive cells ^b (%)	0 cells	13 (33)	9 (47)	4 (21)	0.10 0.09 ^c
	1-5 cells	14 (36)	6 (32)	8 (42)	
	>5 cells	12 (31)	4 (21)	7 (37)	
Cytoplasmic CgA density ^b (%)	0	13 (33)	9 (47)	4 (21)	0.21
	1	17 (44)	5 (26)	11 (58)	
	2	6 (15)	5 (26)	1 (5)	
	3	3 (8)	0 (0)	3 (16)	
SSTR2 ^a (%)	-	16 (42)	7 (37)	8 (44)	0.74
	+	22 (58)	12 (63)	10 (56)	
SSTR2 positive cells ^a (%)	0	16 (42)	7 (37)	8 (44)	0.42
	<10%	11 (29)	5 (26)	6 (33)	
	>10%	11 (29)	7 (37)	4 (22)	
Stromal SSTR2 ^a (%)	-	32 (84)	15 (79)	16 (89)	0.66
	+	6 (16)	4 (21)	2 (11)	
Ki 67 (%)	Median (range)	10 (1-80)	10 (1-31)	15 (1-80)	0.75

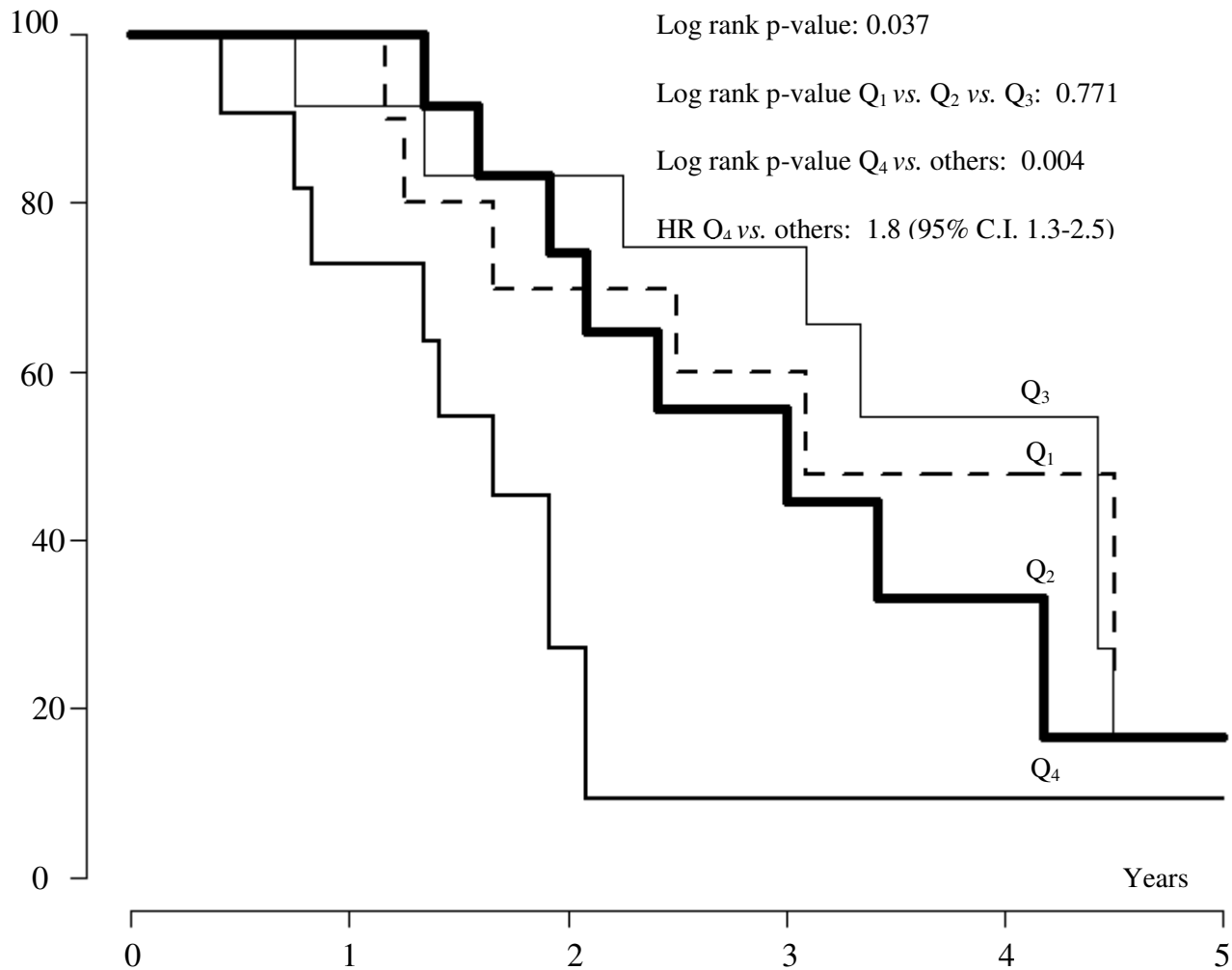
^a One or more than one patient had missing data; ^b Calculated on 39 patients with positive biopsy; ^c First category versus others. CgA, chromogranin A; SSTR2, somatostatin receptor subtype 2.

Figure I. Serum CgA and androgen receptor in neoplastic cells



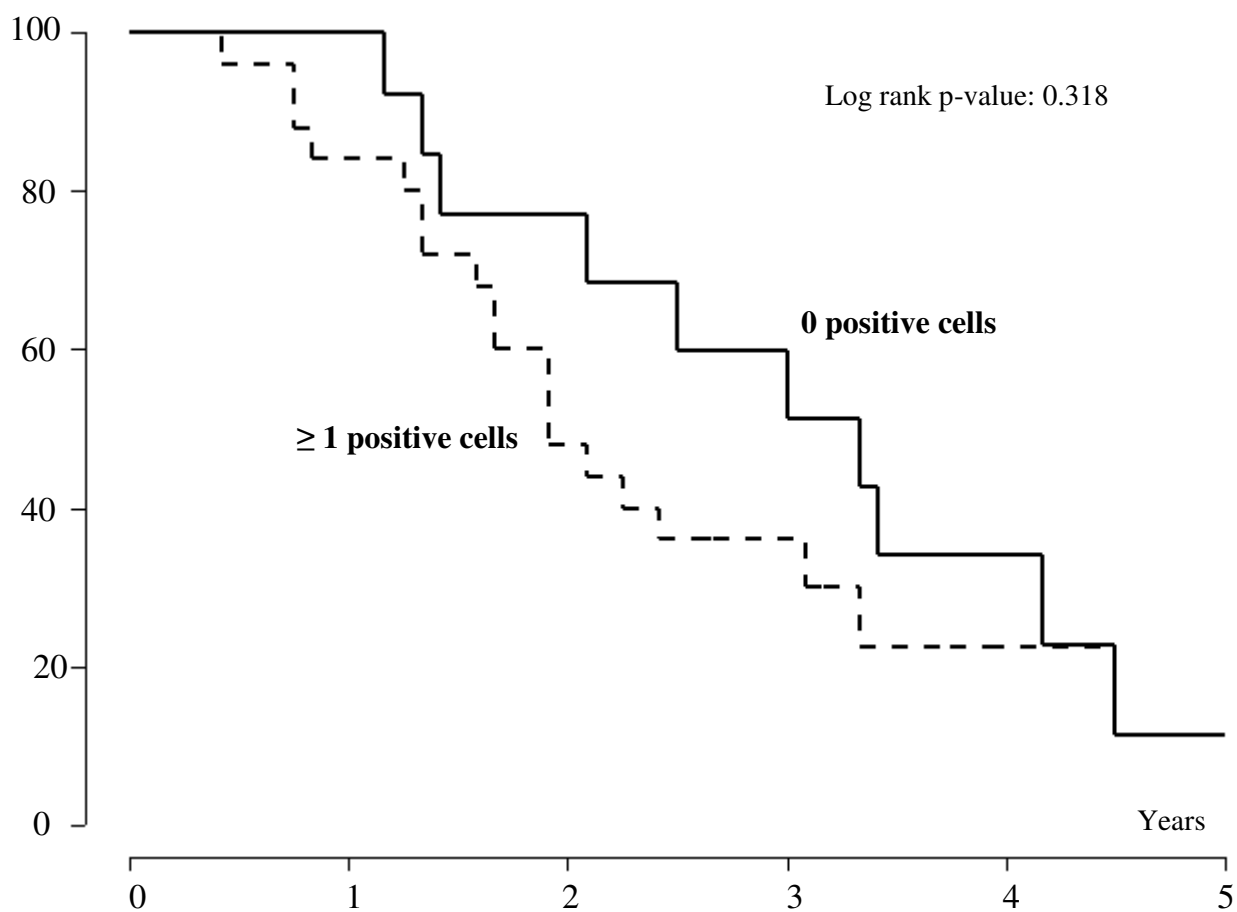
S-CgA, serum chromogranin A; AR, androgen receptor.

Figure II. Overall survival after CRPCa diagnosis according to serum CgA levels



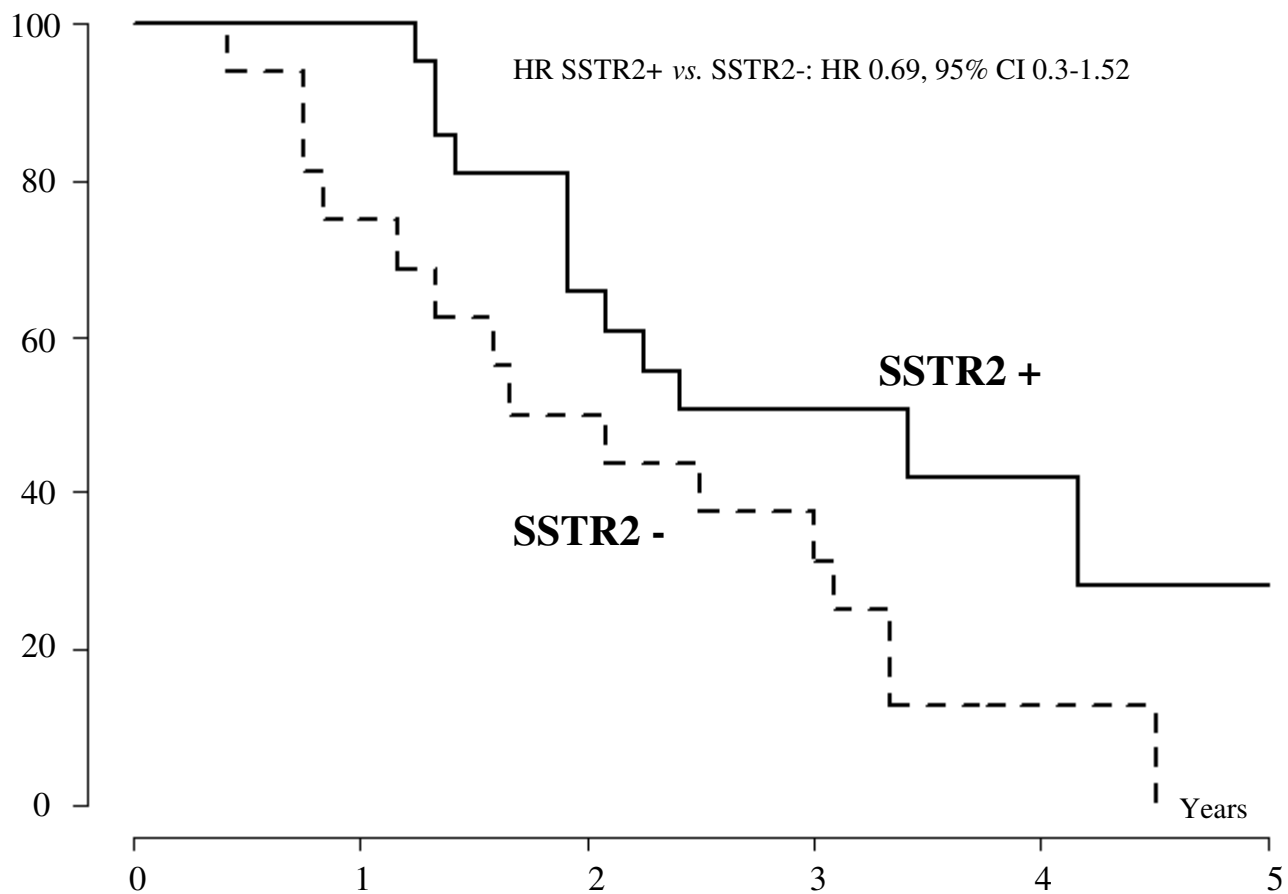
Values of serum CgA are stratified in quartiles: Q₁: CgA<14; Q₂: 14≤CgA<24; Q₃: 24≤CgA<36; Q₄: CgA≥36. Hazard ratios are adjusted for age, initial PSA, actual PSA, Gleason score and metastatic status; † Calculated excluding the subgroup of patients who received somatostatin analogue. CgA, chromogranin A; CRPCa, castration-resistant prostate cancer; HR, hazard ratio.

Figure III. Overall survival after CRPCa diagnosis according to presence of CgA positive neoplastic cells ^a



^a Calculated on 39 patients with positive biopsy. CgA, chromogranin A; CRPCa, castration-resistant prostate cancer.

Figure IV. Overall survival after CRPCa diagnosis according to the presence of SSTR2 positive neoplastic cells ^a



^a Calculated on 39 patients with positive biopsy. Hazard Ratios are adjusted for age, initial PSA, actual PSA, Gleason score and metastatic status. SSTR2, somatostatin receptor subtype 2; HR, hazard ratio.