

ADRIANA WORSCHER

***Atrofia parcial em biópsias de agulha de
próstata: uso do coquetel AMACR (Alfa-Metilacil
Coenzima A Racemase) + 34BBE12. Útil no
diagnóstico diferencial entre carcinoma e atrofia da
próstata?***

CAMPINAS

2008

ADRIANA WORSCHER

***Atrofia parcial em biópsias de agulha de
próstata: uso do coquetel AMACR (Alfa-Metilacil
Coenzima A Racemase) + 34BBE12. Útil no
diagnóstico diferencial entre carcinoma e atrofia da
próstata?***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr ATHANASE BILLIS

CAMPINAS

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

W897a Worschech, Adriana
Atrofia parcial em biópsias de agulha de próstata: uso do coquetel AMACR (Alfa-Metilacil Coenzima A racemase) + 34βBE12. útil no diagnóstico diferencial entre carcinoma e atrofia da próstata? / Adriana Worschech. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Athanase Billis
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Próstata. 2. Atrofia. 3. Biópsia por agulha . 4. AMACR. 5. P504S. I. Billis, Athanase. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Partial atrophy in needle biopsy of prostate : use of the cocktail AMACR (Alfa-Metilacil Coenzima A Racemase) + 34βBE12. Is it useful in differential diagnosis between atrophy carcinoma of prostate?

Keywords: • Prostate
• Atrophy
• Needle biopsy
• AMACR, protein human
• P504S, protein human

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Athanase Billis
Profa. Dra. Maria Letícia Cintra
Profa. Dra. Andresa Borges Soares

Data da defesa: 29 - 08 - 2008

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Athanase Billis

Membros:

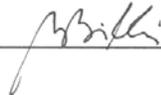
1. Profa. Dra. Andresa Borges Soares



2. Prof. Dr. Fábio Rogério



3. Prof. Dr. Athanase Billis



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

29/08/2008

DEDICATÓRIA

Dedico a finalização desse trabalho primeiramente a Deus, que me proporcionou a vida, aos meus pais pela dedicação e educação, aos meus avôs pela constante presença e apoio, aos meus irmãos pelo companheirismo incondicional, e em especial ao meu marido e companheiro pela presença, compreensão e apoio em todos os momentos, principalmente os mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Dr. Athanase Billis que tão gentilmente me aceitou como sua aluna para realização desse estudo, a minha co-orientadora Dr. Luciana Rodrigues Meirelles pelo apoio e dedicação nos momentos mais difíceis do trabalho.

Ao responsáveis e funcionários do Laboratório de Patologia Experimental, que me proporcionaram tanto conhecimento e prática na área da imunoistoquímica e da patologia molecular, Dr. Marcelo Alvarenga, Dr. Glauce Aparecida Pinto, aos ex-funcionários Tarsis Eduardo Prates e Cristiano Chagas, aos funcionários Priscila Bianchi Juliano, Rosemeire Franchi Dionísio, Marisa de Almeida Matsura e Julio César de Moraes.

A todos os professores da pós-graduação que ampliaram os horizontes do meu conhecimento, em suas aulas tão brilhantemente ministradas.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia Patológica, que me auxiliaram de alguma maneira no desenvolvimento desse trabalho.

"A dúvida é o princípio da sabedoria".

ARISTÓTELES

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. A descoberta da Alfa-metilacil coenzima A racemase (AMACR)	17
1.2. A aplicação da Alfa-metilacil coenzima A racemase (AMACR) em neoplasias	17
1.3. Aplicações da AMARC em patologia prostática	21
1.3.1. . Adenocarcinoma	21
1.3.2. "Suspeito, mas não diagnóstico de adenocarcinoma"	22
1.3.3. Lesões precursoras de câncer	23
1.3.4. Lesões benignas	24
1.3.5. Atrofia	25
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Atrofia	35
4.2. Imunoistoquímica - Coquetel P504S+34βE12	36
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
9. APÊNDICE	61

		PÁG.
TABELA 1	Anticorpos e técnicas empregadas.	59
TABELA 2	Intensidade de imunexpressão da AMACR (P504S) em ácinos com adenocarcinoma, ácinos normais, ácinos com atrofia parcial e ácinos com atrofia simples, hiperplásica (hiperplasia pós-atrótica) e esclerosante. (coquetel P504S + 34βE12).	60
TABELA 3	Padrão de positividade de imunexpressão fraca para AMACR em ácinos de adenocarcinoma, ácinos normais e ácinos de atrofia parcial (coquetel P504S + 34βE12).	61
TABELA 4	Padrão de positividade de imunexpressão forte para AMACR em ácinos de adenocarcinoma, ácinos normais e ácinos de atrofia parcial (coquetel P504S+ 34βE12).	62
TABELA 5	Padrão de distribuição das células basais utilizando-se a citoqueratina de alto peso molecular (clone 34βE12) em ácinos de adenocarcinoma, ácinos normais e ácinos de atrofia parcial (coquetel P504S+ 34βE12).	63

LISTA DE FIGURAS

		PÁG.
FIGURA 1	Atrofia parcial (H&E).	64
FIGURA 2	Atrofia parcial (H&E).	64
FIGURA 3	Atrofia hiperplásica (ou hiperplasia pós-atrótica) (H&E).	64
FIGURA 4	Atrofia esclerosante (H&E).	64
FIGURA 5	Adenocarcinoma com imunoexpressão forte difuso para P504S (coquetel P504S+34βE12).	64
FIGURA 6	Adenocarcinoma com imunoexpressão forte mista para P504S (coquetel P504S+34βE12).	64
FIGURA 7	Adenocarcinoma e um ácino normal com imunoexpressão forte difuso para P504S (coquetel P504S+34βE12).	65
FIGURA 8	Atrofia parcial com imunoexpressão fraca difusa para P504S(coquetel AMACR + 34βE12). Padrão de marcação de células basais com 34βE12 contínuo, descontínuo e ausente.	65
FIGURA 9	Atrofia hiperplásica (ou hiperplasia pós-atrótica). Aparente marcação em células basais (coquetel P504S + 34βE12),	65



RESUMO

A atrofia parcial (AP) é uma lesão benigna que mais freqüentemente imita adenocarcinoma, particularmente a variante parcial. AP ocorre com maior freqüência no lobo posterior ou zona periférica e ganhou importância maior com o uso das biópsias por agulha na detecção do carcinoma prostático.

A atrofia parcial e a hiperplasia pós-atrófica (atrofia hiperplásica) são as lesões benignas que mais freqüentemente são confundidas com adenocarcinoma. Uma das razões que contribuem para dificultar o diagnóstico da atrofia parcial está relacionada com a ausência de células basais em alguns ácinos.

Mais recentemente a aplicação da molécula de AMACR (alfa-metilacil Co-enzima A racemase) como marcador de células neoplásicas através de imunistoquímica tem auxiliado no diagnóstico diferencial com o adenocarcinoma. Entretanto, sua aplicação na rotina diagnóstica ainda não está estabelecida. A imunoexpressão da AMACR pode causar algumas dúvidas em sua interpretação. Na literatura existem poucos estudos que relatam a expressão da AMACR em atrofia parcial.

Avaliamos através da imunistoquímica a expressão da AMACR e do 34 β E12 (citoqueratina de alto peso molecular) através do coquetel P504S+34 β E12 em material proveniente de 74 biópsias por agulha de próstata correspondendo a 61 pacientes. Foram analisados um total de 1198 ácinos prostáticos (324 ácinos com adenocarcinoma, 213 ácinos normais, 190 ácinos com atrofia parcial, 298 ácinos com hiperplasia pós-atrófica, 139 ácinos com atrofia simples e 34 ácinos com atrofia esclerosante).

Nos ácinos com adenocarcinoma a intensidade da marcação da AMACR foi forte em 251/324 (77.5%) e fraca 73/324 (22.5%). Não houveram casos negativos. Nos ácinos normais observou-se marcação para a AMACR forte em 13/213 (6.1%), fraca em 33/213 (15.5%) e negativa em 167/213 (78.4%). A atrofia parcial apresentou marcação para a AMACR fraca em 47/190 (24.7%) e negativa em 143/190 (75.3%). Não houve marcação forte em nenhum dos casos de atrofia parcial.

Os ácinos normais mostraram expressão para AMACR negativo, fraco e forte onde os valores foram respectivamente 167/213 (78,4%), 33/213 (15,5%) e 13/213 (6,1%). A atrofia parcial mostrou-se negativa, e fraca para imunoexpressão da

AMACR em 143/190 (75,3%) e 47/190 (24,7%) respectivamente. Não foi observada forte positividade em atrofia parcial, no entanto, a fraca positividade observada em cerca de 25% dos ácinos pode causar dificuldade para a interpretação correta no diagnóstico diferencial de câncer e atrofia parcial. A AMACR foi negativa em todos os ácinos da atrofia simples, hiperplásica (ou hiperplasia pós-atrótica) e esclerosante, por conseguinte, sem qualquer ajuda no diagnóstico diferencial de adenocarcinoma. A distribuição das células basais, observadas na atrofia simples, hiperplásica e esclerosante foram descontínuas e as células do compartimento secretor mostraram imunexpressão aberrante de 34βE12 sugerindo um fenótipo intermédio.

Analisando-se os estes resultados conclui-se que o diagnóstico diferencial do adenocarcinoma com atrofia parcial deve ser feito com cautela considerando-se que a expressão da AMACR, apesar de fraca em nosso estudo, pode ocorrer em cerca de 25% dos ácinos. Soma-se a este achado o fato de que em 23.2% dos ácinos de atrofia parcial as células basais estão ausentes. Estes dados impõem cautela no difícil diagnóstico diferencial de pequenos focos “suspeitos, mas não diagnósticos de adenocarcinoma da próstata”, sendo que, em alguns casos, os critérios puramente morfológicos poderão ser os únicos na identificação da lesão.

Palavra chave: próstata, atrofia, atrofia parcial, biópsia de agulha, AMACR, P504S.



ABSTRACT

Prostatic atrophy (PA) is the benign lesion that most frequently mimicks adenocarcinoma particularly the partial variant. PA occurs more frequently in the peripheral zone and gained greater importance with the use of needle biopsies in detecting cancer of the prostate. Partial atrophy and post-atrophic hyperplasia (hyperplastic atrophy) are the benign lesions that most often are confused with adenocarcinoma. One of the reasons that contribute to make the diagnosis of partial atrophy difficult is related to the absence of basal cell in some acini.

More recently the application of AMACR (alpha-metilacil Co-enzyme A racemase) as a marker of malignant cells through immunohistochemistry has helped in the differential diagnosis with prostate cancer. However, its application in routine diagnosis is not yet established. The immunoexpression of AMACR may cause some doubt in interpretation. In literature there are few studies that reported the expression of AMACR in partial atrophy.

We evaluated by immunohistochemistry the expression of AMACR and 34 β E12 (cytokeratin high-molecular weight) using the cocktail P504S +34 β E12 in 74 needle prostatic biopsies corresponding to 61 patients. We analyzed a total of 1198 prostate acini (324 acini with adenocarcinoma, 213 normal acini, 190 acini with partial atrophy, 298 acini with post-atrophic hyperplasia, 139 acini with simple atrophy and 34 acini with sclerosing atrophy).

In adenocarcinoma acini the staining of AMACR was strong in 251/324 (77.5%) and weak in 73/324 (22.5%). There were no negative acini. In normal acini AMACR was strong in 13/213 (6.1%), weak in 33/213 (15.5%) and negative in 167/213 (78.4%). In partial atrophy, acini showed weak AMACR in 47/190 (24.7%) and were negative in 143/190 (75.3%). There was no strong staining in partial atrophy. The immunoexpression of AMACR was negative in all variants of complete atrophy: simple atrophy, hyperplastic atrophy and sclerosing atrophy.

Normal acini showed negative, weak, or strong expression in 167/213 (78.4%), 33/213 (15.5%), and 13/213 (6.1%) acini, respectively. Partial atrophy showed negative, and weak expression in 143/190 (75.3%), and 47/190(24.7%) acini,

respectively. No strong positivity was seen in partial atrophy, however, the weak positivity seen in approximately 25% of the acini may be a pitfall for the correct interpretation in the differential diagnosis of cancer and partial atrophy. AMACR was negative in all acini of simple, postatrophic hyperplasia and sclerosing atrophy, therefore, with no help in the differential diagnosis of adenocarcinoma. The distribution of basal cells in simple, postatrophic hyperplasia and sclerotic atrophy was discontinuous and the cells of the secretory compartment showed aberrant expression of 34 β E12 suggesting an intermediate phenotype.

Analyzing these results it is concluded that the differential diagnosis of prostate cancer with partial atrophy must be done carefully considering that the expression of AMACR, although weak in our study, can occur in about 25% of the acini. Furthermore, in 23.2% acini of partial atrophy the basal cells are absent. In some cases the microscopic identification of partial atrophy will rely only on morphologic criteria.

Key Words: prostate, atrophy, partial atrophy, needle biopsy, AMACR, P504S.



1- INTRODUÇÃO

1.1. A descoberta da Alfa-metilacil coenzima A racemase (AMACR)

Alfa-metilacil CoEnzima A racemase (AMACR) é uma enzima que foi purificada e caracterizada por investigadores estudando o metabolismo dos lípidos. Foi caracterizada em tecidos humanos em 1995 (Schmitz et al.,1995). Embora o mecanismo preciso não seja conhecido, a AMACR (proteína com 382 aminoácidos produzida nos peroxissomos e mitocôndrias) tem importante papel na biossíntese dos ácidos biliares e na beta-oxidação de ácidos graxos ramificados (Ferdinandusse et al., 2000; Kotti et al., 2000), ela catalisa a conversão dos vários (R)-metil da cadeia ramificada de ácidos graxos em acil-CoA e seus esterisômeros nas mitocôndrias e peroxissomos (Shi et al.,2007; Ferdinandusse et al.,2000). Em condições normais, a AMACR é detectável em uma variedade de tecidos, incluindo fígado, rim, músculo esquelético, vesícula biliar e cérebro (Shi et al.,2007; Ferdinandusse et al.,2002; Ferdinandusse et al.,2000).

Xu et al. (2000), usando subtração de cDNA em conjunto com cDNA "microarray screening", identificaram 3 genes: P503S, P504S e P510S que codificavam proteínas com diferentes expressões em neoplasias. P503S e P504S, dois dos produtos gênicos assim chamados de acordo com o número do clone cDNA, foram claramente identificados como alfa-metilacil coenzima A racemase (AMACR) humana. Em imunistoquímica, os autores observaram que anticorpos obtidos de coelho contra as proteínas P503S mostravam expressão aumentada no câncer e em nódulos hiperplásicos da próstata enquanto que os anticorpos contra as proteínas P504S somente no câncer (Xu et al., 2000).

1.2. Aplicação da Alfa-metilacil coenzima A racemase (AMACR) em neoplasias

Zhou et al. (2002), usando anticorpos policlonais, encontraram expressão aumentada em imunistoquímica de AMACR em carcinomas do colón e reto, ovário, mama, bexiga, pulmão e rim bem como linfomas e melanomas. A

expressão mais acentuada foi observada nos carcinomas do colón e reto (92%) (Zhou et al., 2002). Usando anticorpos monoclonais, Jiang et al. (2003) relataram que 81% dos carcinomas hepatocelulares, 75% dos carcinomas renais, 31% dos carcinomas uroteliais e 27% dos carcinomas gástricos eram positivos para AMACR. Estes autores também relataram que carcinomas do pulmão, mama, pâncreas, ductos biliares, adrenal, glândula salivar, ovário, tireóide e endométrio eram negativos ou raramente positivos enquanto que expressão de AMACR era encontrada em tecido normal de fígado, rim e glândula salivar (Jiang et al., 2003a). Usando um "tissue microarray" de alta densidade, Witkiewicz et al. (2005) determinaram que a AMACR tinha expressão aumentada em 42 de 160 carcinomas invasivos de mama e estava associada com indiferenciação tumoral.

Em 2003, Jiang et al. examinaram a expressão da AMACR em 242 casos de tumores do colón incluindo 176 carcinomas, 38 adenomas e 28 pólipos hiperplásicos. Usando imunohistoquímica, observaram que a AMACR tinha expressão aumentada em 75% dos carcinomas e 79% dos adenomas, mas somente em 4% dos pólipos hiperplásicos. Foi sugerido que a expressão aumentada de AMACR poderia ser um evento precoce na seqüência da gênese do tumor coloretal (Jiang et al., 2003b). Chen et al. (2005) examinaram a expressão de AMACR em 59 pequenos adenocarcinomas do intestino delgado e 66 adenocarcinomas coloretais e relataram que 62% dos tumores coloretais eram positivos comparativamente a apenas 5% dos tumores do intestino delgado. De acordo com os autores, a expressão de AMACR seria importante na diferenciação entre adenocarcinomas coloretais e do intestino delgado.

Existem vários trabalhos estudando a expressão da AMACR em tumores renais. Tretiakova et al. (2004) relataram a expressão da enzima em 41 de 41 carcinomas renais papilíferos comparativamente a 13 de 52 carcinomas renais convencionais, 3 de 20 oncocitomas, 0 de 8 carcinomas cromóforos e 0 de 15 carcinomas sarcomatóides. Outros carcinomas papilíferos também estudados pelos autores, incluindo da tireóide, mama, endométrio, ovário e pâncreas, raramente eram positivos. Lin et al. (2004) observaram que a expressão de AMACR em imunohistoquímica foi de 100% em 15 carcinomas renais papilíferos,

69% de carcinomas convencionais, 29% de carcinomas cromóforos e 25% de oncocitomas.

Suh et al. (2005) estudaram 17 casos de adenocarcinomas primários da bexiga do tipo entérico e observaram 65% de positividade para AMACR, semelhante à positividade de 70% que eles observaram em carcinomas coloretais mas muito maior que a positividade de 14% que observaram nos carcinomas uroteliais convencionais da bexiga. Estes achados sugerem que a expressão da AMACR esteja relacionada com um fenótipo entérico em certos tumores. Logani et al. (2005) relataram expressão aumentada de P504S em 32% de carcinomas coloretais metastáticos no ovário em contraposição a nenhum de 23 carcinomas mucinosos e endometrióides primários do ovário. É possível que a expressão de AMACR em uma neoplasia ovariana possa sugerir metástase e não neoplasia ovariana primária.

Shi et al.(2007), estudaram a correlação da expressão da AMACR com a diferenciação e o prognóstico em carcinoma coloretal. Foi feito o estudo em 106 casos de carcinoma coloretal primário e 47 carcinomas coloretais com metástase em gânglios linfáticos. Estes casos foram divididos em 3 grupos de acordo com o grau de diferenciação histológica do tumor primário. O grupo A incluiu 50 casos de carcinoma coloretal com diferenciação histológica bem diferenciada e moderadamente diferenciada, 20 destes com metástase linfonodal. O grupo B incluiu casos com o mesmo aspecto do grupo A, mostrando, entretanto pequenos focos de tumores (20%) de alto grau, e 10 com metástase linfonodal. O grupo C incluiu 33 casos de adenocarcinoma pouco diferenciado e carcinoma indiferenciado, 17 destes com metástase linfonodal. Os resultados obtidos nos casos de carcinoma coloretal primário e metastáticos foram respectivamente 59.4% e 46.8%. As expressões obtidas no grupo A foram de 76% e no B 69.6% e foram muito maiores que os obtidos no grupo C 27.3%. Em contraste a taxa de expressão no grupo A entre tumores primários e metastáticos foram similares (80% e 75%) respectivamente. O padrão de expressão apresentado pela AMACR foi citoplasmático e o padrão de positividade foi forte. Coloração para AMACR em epitélio adjacente ao tumor foram raros (<2%). Não foi encontrada relação entre a

expressão da AMACR e a sobrevida. E a conclusão foi que a expressão da AMACR está relacionada com a diferenciação tumoral.

Guzman et al.,(2008),realizaram um estudo sobre a expressão da AMACR na distinção entre carcinoma hepatocelular e displasia hepatocelular e tecidos hepáticos benignos não displásicos. O estudo imunoistoquímico foi realizado em blocos de parafina de tecidos fixados em formalina de 20 pacientes que sofreram hepatectomia. O padrão de imunexpressão citoplasmático observado foi finamente granular ou grosseiramente granular, e ausência de reatividade foi definida como padrão de negatividade. A AMACR se mostrou positiva em ambos os casos, onde o padrão de coloração foi o mesmo observado nas glândulas malignas e na displasia, com marcação grosseiramente granular citoplasmática difusa. Em contraste, as colorações nas glândulas normais foram citoplasmáticas finamente granulares pontilhadas difusas.

Em 2008, Scheil-Bertram et al., realizaram um estudo retrospectivo dos adenocarcinomas de Barrett tratados por cirurgia (2000-2005, idade média de 67 anos), e analisaram a reatividade da imunexpressão da AMACR em lesões neoplásicas associadas a doença de Barrett de 77 diferentes espécimes (60 biópsias cirúrgicas e 17 espécimes cirúrgicos). Nesse estudo, 70% dos casos demonstraram infiltração da submucosa, 38% eram pouco diferenciados e 31% demonstraram metástases por via linfática. Epitélios com distúrbio de Barrett, que foram negativos para displasia de células epiteliais colunares (n=30) não demonstraram imunorreatividade para AMACR. A imunorreatividade foi observada em 27% dos casos (8/30) de Barrett que apresentaram positividade para displasia de células colunares (Scheil-Bertram et al. 2008).

No total de 91% dos casos de displasia de baixo grau foram positivos para AMACR e 96% dos casos de displasia de alto-grau e início de adenocarcinoma de Barrett tiveram positividade para AMACR.

Em resumo, os pesquisadores chegaram à conclusão de que a sensibilidade de imunexpressão da AMACR em displasia de baixo grau e adenocarcinoma incipiente de Barrett foram significativamente maiores no estudo em questão, em comparação com estudos anteriores.

Sendo assim, a AMACR seria um novo marcador para diagnóstico de displasia de baixo grau e de lesões neoplásicas de Barrett. (Scheil-Bertram et al. 2008).

1.3. Aplicações da AMACR em patologia prostática

1.3.1. Adenocarcinoma

O primeiro trabalho utilizando a AMACR em câncer da próstata foi publicado em 2000 por Xu et al. Foi observada imunoreatividade para P504S em adenocarcinomas prostáticos mas não em glândulas benignas enquanto que para P503S houve imunoreatividade para glândulas malignas e benignas. Em 2001, Jiang et al. examinaram a expressão de AMACR em 137 carcinomas da próstata e 70 casos com glândulas benignas usando o anticorpo monoclonal de coelho P504S. Todos os carcinomas mostraram forte expressão citoplasmática independente da graduação de Gleason. Em 88% dos casos benignos, a imunoreatividade para AMACR foi completamente negativa, sendo que nos 12% restantes positiva, mas fraca e focal. Observaram também que lesões benignas como atrofia e hiperplasia de células basais eram completamente negativos.

Vários outros trabalhos (Rubin et al. 2002; Luo et al., 2002; Jiang et al., 2002; Beach et al., 2002; Jiang et al., 2004a; Kumar-Sinha et al., 2004) que se seguiram confirmaram os achados de Xu et al. (2000) e Jiang et al. (2001).

O primeiro trabalho examinando a AMACR como fator prognóstico no câncer da próstata foi publicado em 2005 por Rubin et al. Os autores observaram que uma expressão diminuída de AMACR em células cancerosas estava associada com maior progressão da moléstia independentemente da contagem final de Gleason, PSA pré-operatório e margens cirúrgicas comprometidas no espécime cirúrgico.

1.3.2. "Suspeito, mas não diagnóstico de adenocarcinoma"

Uma das mais úteis aplicações da AMACR é na condição que em patologia prostática se refere como "suspeito, mas não diagnóstico de câncer" (Billis, 2003). Com o uso cada vez maior do PSA para rastreamento e diagnóstico precoce do câncer da próstata, um número maior de biópsias prostáticas de agulha é realizado. Em consequência, há um número também maior de pequenos focos de adenocarcinoma nas biópsias que não permitem um diagnóstico de certeza (Catalona et al., 1994, DiGiuseppe et al., 1997; Nadler et al., 1995). Iczkowski et al. (Iczkowski et al., 1997) observaram que as causas mais frequentes são: foco muito pequeno (70%), o foco desaparece em cortes seriados (61%) e ausência de critérios citológicos (55%). A denominação "suspeito, mas não diagnóstico de adenocarcinoma" também é conhecida pela sigla Inglesa *ASAP* (*atypical small acinar proliferation*). Em reunião de consenso da OMS recomendou-se não utilizar esta sigla pelas seguintes razões: é confusa para o urologista o qual pode interpretá-la como entidade patológica (neoplasia intra-epitelial alto grau, adenose ou outra) e lesões suspeitas, mas não diagnósticas não necessariamente são microacinares (Mahul et al., 2005).

Aspectos histológicos do adenocarcinoma prostático como desarranjo arquitetural, atípia nuclear e ausência de células basais (Epstein, 1995, Epstein e Yang, 2002., Humphey, 2006), quando usados isoladamente não são inteiramente sensíveis e específicos para estabelecer um diagnóstico definitivo de câncer prostático. Imunoistoquímica para citoqueratinas de alto peso molecular como a 34 β E12 e, mais recentemente a p63, têm sido usada para identificar células basais que tipicamente estão presentes em glândulas normais, mas ausentes nas glândulas neoplásicas (Brawer et al., 1985; Signoretti et al, 2000). Infelizmente, coloração negativa para células basais em alguns poucos ácinos suspeitos não é uma prova definitiva para malignidade uma vez que ácinos normais podem ter uma distribuição focal ou descontínua de células basais (Wojno e Epstein, 1995). Assim, um marcador sensível e específico para carcinoma da próstata seria de grande utilidade na condição "suspeito, mas não diagnóstico de adenocarcinoma".

Em 2004, numa tentativa de avaliar a utilidade da AMACR no estabelecimento de um diagnóstico definitivo em casos suspeitos para adenocarcinoma em biópsias prostáticas de agulha, 3 uropatologistas analisaram 93 casos usando a AMACR e citoqueratinas de alto peso molecular. Foi observado que a imunorreação com a AMACR contribuiu na resolução de 12% a 24% dos casos de modo unânime ou por consenso entre os uropatologistas (Jiang et al., 2004b). Num outro trabalho, a AMACR contribuiu para estabelecer um diagnóstico definitivo de adenocarcinoma por um uropatologista experiente em 34/76 (50%) de casos com laudo de "suspeito, mas não diagnóstico" (Zhou et al., 2004).

1.3.3. Lesões precursoras de câncer

Neoplasia intraepitelial prostática (NIP) alto-grau (do Inglês *high-grade prostatic intraepithelial neoplasia - HGPIN*) é considerada uma lesão precursora do câncer prostático (Bostwick, 1988; Bostwick, 1996). Há um risco maior de carcinoma numa rebiópsia quando NIP alto-grau está presente (Bostwick, 1988; Bostwick, 1996). Há vários trabalhos estudando a expressão imunoistoquímica da AMACR em NIP alto-grau. Imunoexpressão aumentada em NIP alto grau varia entre os autores de 13% a 72% (Jiang et al., 2001; Rubin et al., 2002; Luo et al., 2002; Jiang et al., 2002; Beach et al., 2002; Jiang et al., 2004a).

A hiperplasia adenomatosa atípica, também conhecida como adenose, é considerada de potencial pré-canceroso duvidoso e se caracteriza por proliferação bem delimitada de pequenos ácinos sem atipia citológica significativa notadamente na zona de transição da glândula (Bostwick, 1996; Bostwick et al., 1993). Ela é vista em cerca de 5% a 20% das ressecções transuretrais da próstata e a sua importância está na possibilidade de ser confundido com adenocarcinoma Gleason grau (padrão) 1 ou 2 (Bostwick, 1996, Bostwick et al., 1993; Kovi, 1985). Yang et al. (2002) observaram imunoexpressão de AMACR focal em 10% e difusa em 7,5% de casos com adenose. Gupta et al. (2003) observaram expressão de

AMACR em 31% dos casos. Estes achados parecem apoiar a idéia de que certo número de casos de hiperplasia adenomatosa atípica podem ser precursores de câncer.

1.3.4. Lesões benignas

Nos estudos iniciais empregando anticorpos monoclonais e policlonais de AMACR, foi observada expressão em epitélio prostático normal variando de 12% a 21% dos ácinos (Jiang et al., 2001; Rubin et al., 2002; Luo et al., 2002; Jiang et al., 2002, Beach et al., 2002, Jiang et al., 2004a). A positividade é descrita, quase sempre, como sendo finamente granular, focal, fraca e não circunferencial. Leav et al. (2003) observaram expressão de AMACR em hiperplasia nodular da próstata adjacente a adenocarcinoma mas não em nódulos distantes. Este achado pode representar um efeito de campo semelhante ao observado por Ananthranarayanan et al. (2005) em glândulas normais adjacentes a câncer as quais mostraram expressão aumentada de AMACR. Há diferenças na imunopositividade para AMACR conforme o anticorpo empregado seja monoclonal ou policlonal. O anticorpo policlonal mostra uma intensidade de coloração de fundo mais acentuada. Kunju et al. (2003) comparou os dois anticorpos e observou que 68% de glândulas normais mostraram expressão fraca para AMACR com o anticorpo policlonal em comparação com apenas 7% utilizando o anticorpo monoclonal.

O adenoma nefrogênico é uma lesão benigna constituída de pequenas estruturas glandulares que se formam ao longo do urotélio acreditando-se que possam se originar de células tubulares descamadas (Mazal et al., 2002). Apesar de achado raro, a lesão pode ser confundida com adenocarcinoma. Gupta et al. (2004) observaram expressão circunferencial, moderada a forte, focal ou difusa em 22 de 38 (58%) adenomas nefrogênicos. Algumas destas lesões são também negativas para citoqueratinas de alto peso molecular. Assim, o adenoma

nefrogênico pode ser confundido com adenocarcinoma em bases morfológicas bem como na imunohistoquímica.

1.3.5. Atrofia

A atrofia parcial e a hiperplasia pós-atrótica (atrofia hiperplásica) são as lesões benignas que mais freqüentemente são confundidas com adenocarcinoma. Uma das razões que contribuem para dificultar o diagnóstico da atrofia parcial está relacionada com a ausência de células basais em alguns ácinos. A atrofia prostática ocorre com maior freqüência no lobo posterior ou na zona periférica e ganhou importância com o aumento do uso das biópsias por agulha na detecção do carcinoma prostático (Billis, 1998; Cheville & Bostwick, 1995). A freqüência aumenta com a idade (Billis, 1998; Liavag, 1968; Moore, 1936), mas a lesão também é observada em homens mais jovens a partir da terceira década (Gardner, 1987).

As causas da atrofia prostática incluem inflamação crônica com ou sem componente ativo representado por presença de neutrófilos, tratamento radioterápico, uso de antiandrógenos, isquemia crônica local e causas desconhecidas (Billis, 1998; Billis, 2003; Srigley, 2004).

O tratamento radioterápico e o uso de antiandrógenos causam atrofia difusa e intensa, inclusive com presença de atipias epiteliais nos casos de tratamento radioterápico (Srigley, 2004). Inflamação e isquemia crônica local causam atrofia focal, a última sendo mais freqüente e intensa em pacientes mais idosos (Billis, 1998).

Morfologicamente, a atrofia focal pode ser completa (Billis, 1998) ou parcial (Oppenheimer *et al.*, 1998). A completa pode ser subtipada em simples, hiperplásica (ou hiperplasia pós-atrótica) e esclerosante. O subtipo simples e hiperplásico podem ou não apresentar fibrose do estroma bem como dilatação cística dos ácinos. A variante esclerosante sempre mostra um colarinho fibroso e hialinizado ao redor dos ácinos atroficos, que progressivamente se dilatam.

O epitélio de revestimento se atenua podendo desaparecer completamente (Billis, 2000).

A atrofia parcial e a completa hiperplásica são os subtipos que maiores dificuldades apresentam no diagnóstico diferencial com adenocarcinoma. O emprego de citoqueratinas de alto peso molecular (34 β E12) é de grande valia no diagnóstico diferencial. Porém, em alguns casos de atrofia parcial, as células basais podem estar espaçadas (descontínuas) ou totalmente ausentes (Herawi *et al.*, 2005).

Em ácinos com atrofia parcial há perda de citoplasma apical com abundância de citoplasma lateral, onde os núcleos ocupam quase toda a altura da célula e o citoplasma se assemelha aos ácinos normais. Neste tipo de atrofia não há a perda da camada basal, mas, esta pode se apresentar em sua grande maioria na forma descontínua ou ausente o que pode tornar o diagnóstico diferencial com adenocarcinoma mais difícil (Oppenheimer *et al.*, 1998). Nos casos que apresentam atrofia simples, os ácinos se apresentam pequenos, com diminuição da altura das células epiteliais, o estroma envolvente pode ou não apresentar fibrose e pode haver algum grau de dilatação cística acinar (Billis, 1998).

Na atrofia hiperplásica ou hiperplasia pós-atrótica os ácinos apresentam graus diferentes de proliferação, são pontiagudos, com distorção do lúmen acinar, o que pode simular infiltração do estroma por adenocarcinoma. Já na atrofia esclerosante, há simultaneamente a atrofia do epitélio e a proliferação de fibroblastos, sempre resultando em fibrose ao redor dos ácinos acometidos em forma de um colarinho fibro-hialino, podendo ocorrer o desaparecimento do epitélio e a substituição deste por um tecido frouxo semelhante a mesênquima (Billis, 1998).

A recente descoberta da proteína AMACR (alfa-metilacil Co-enzima A racemase), como um novo marcador de ácinos neoplásicos prostáticos e seu emprego através da imunistoquímica tornaram-se atrativos naqueles casos em que há dificuldades no diagnóstico diferencial com adenocarcinoma.

Principalmente nos casos de atrofia parcial e nos “suspeitos, mas não diagnósticos”.

Na literatura existem poucos estudos descrevendo a expressão da AMACR nas atrofias completa e parcial e com resultados contraditórios.

Jiang *et al.*, 2001, examinaram por imunocitoquímica a expressão do anticorpo monoclonal P504S (AMACR) em um total de 207 biópsias de próstata: 77 prostatectomias, 112 biópsias por agulha e 18 biópsias transuretrais. Foram analisados 137 casos de adenocarcinoma de próstata e 70 casos de próstatas benignas. Neste estudo, a AMACR apresentou forte marcação citoplasmática granular em 100% dos carcinomas, independente de sua graduação histológica (Gleason), com imunomarcação difusa (>75% do tumor) em 92% dos casos. Em contrapartida, 171/194 (88%) dos casos com próstata benigna foram negativos para AMACR. A expressão da P504S não foi encontrada nos casos de hiperplasia de células basais, metaplasia urotelial e em pequenas glândulas atróficas que imitam carcinoma (Jiang *et al.*,2001)

Em 2001, Jiang *et al.* observaram que focos de atrofia tinham expressão de AMACR totalmente negativa à avaliação imunoistoquímica. Os autores não relatam se os focos eram de atrofia parcial ou completa, tampouco os subtipos da última.

Rubin *et al.*, 2002, usando o anticorpo monoclonal anti-P504S demonstraram um aumento da expressão da AMACR em epitélio prostático maligno em relação ao epitélio prostático benigno. Neste estudo com “tissue microarrays”, analisaram-se 108 amostras de próstata benigna, 26 de atrofia prostática, 75 com neoplasia intraepitelial prostática, 116 com carcinoma de próstata e 17 em metástases de adenocarcinoma da próstata. Estes fragmentos apresentaram intensidade de marcação média para AMACR: 1.31, 2.33, 2.67, 3.20, e 2.5 respectivamente ($p < 0,001$).

Em 2002, Beach *et al.* aplicou imunoistoquímica com anticorpo monoclonal P504S num total de 366 biópsias de agulha de próstata, sendo 10 de 2 pacientes sem adenocarcinoma, 28 provenientes de prostatectomias (16 com padrão morfológico específico, 7 após terapia hormonal e 5 após tratamento

radioterápico), 5 de carcinomas invasivos uroteliais da bexiga e uma ressecção transuretral de um paciente com carcinoma urotelial invasivo da bexiga e câncer de próstata, tratado com terapia hormonal. Um total de 153/186 biópsias (82%) com adenocarcinoma de próstata apresentaram imunoexpressão para P504S. Não houve imunoexpressão em ácinos atróficos de hiperplasia pós-atrótica (n=10), metaplasia urotelial (n=7), e hiperplasia de células basais (n=1). Três de 79 (4%) focos de atrofia tinham expressão focal, fraca e não circunferencial.

Rubin *et al.*(2002), observaram que não havia expressão de AMACR em focos de atrofia prostática. Os autores também não especificaram o tipo de atrofia analisado (Rubin *et al.*,2002)

Em 2005, Herawi *et al.* estudaram a utilidade do uso da AMACR em lesões benignas da próstata que potencialmente simulam adenocarcinoma, dando ênfase à variante parcial da atrofia. O material de estudo correspondeu a biópsias prostáticas de agulha recebidas em consulta por Epstein no Hospital Johns Hopkins. Em 345 pacientes de um total de 4046 pacientes, foram observadas 567 lesões suspeitas de adenocarcinoma. Após revisão, estas lesões foram, então, diagnosticadas como benignas. Destas 567 lesões, 203/567 (35,8%) correspondiam à atrofia parcial, sendo esta a lesão benigna que mais freqüentemente se confundiu com adenocarcinoma. Do total de biópsias com atrofia parcial, 117/203 (57,6%) dispunham de estudo imunoistoquímico para citoqueratinas de alto peso molecular (clone 34βE12) ou p63 com resultados técnicos aceitáveis e 19/203 (9,3%) tinham análise imunoistoquímica para AMACR (Herawi *et al.*,2005). O padrão de positividade em imunoistoquímica para células basais foi considerado: focal (ácinos mostrando células basais esparsas) em 87% dos casos, focal/negativo (ácinos com células basais esparsas e ácinos totalmente negativos) em 13% dos casos; e, negativo (ácinos totalmente negativos) em 13% dos casos. Nenhum caso mostrou padrão de positividade difusa (células basais em disposição contínua). Dos 19 casos que dispunham de estudo para AMACR, 15/19 (79%) foram positivos. Os autores não fizeram distinção entre intensidade de coloração fraca, moderada ou intensa, aceitando qualquer intensidade mais forte que o fundo como positiva. A alta freqüência de positividade para AMACR

nesta casuística pode ser explicada, de acordo com os autores, pela variabilidade das técnicas e anticorpos empregados, uma vez que o material em consulta recebido provinha de várias instituições universitárias ou particulares (Herawi *et al.*,2005)

Em 2008, Wang *et al.* (2008) analisaram através de imunoistoquímica biópsias de próstata por agulha, recebidas em consulta no período de 3 meses: 170 casos tinham diagnóstico de atrofia parcial. Foram incluídos no estudo mais 108 casos de atrofia parcial, sem áreas de glândulas atípicas ou adenocarcinoma, recebidos também como consulta. Utilizou-se o coquetel imunoistoquímico com tripla marcação (34βE12+p63+P504S). A imunoexpressão nas áreas de atrofia foi caracterizada como citoplasmática difusa ou luminal. A intensidade da coloração como negativa, fracamente positiva, moderadamente positiva e fortemente positiva. Estes resultados, segundo os próprios autores, devem ser interpretados com cautela, visto os espécimes serem procedentes de diferentes instituições, com diferentes protocolos de imunoistoquímica e marcas de anticorpos utilizados.



2- JUSTIFICATIVA

O emprego da imunexpressão de AMACR em patologia prostática tem se mostrado útil em certas situações notadamente como auxílio no diagnóstico definitivo de lesões consideradas "suspeitas, mas não diagnósticas de adenocarcinoma". A atrofia prostática, notadamente a variante parcial e o subtipo histológico hiperplásico (ou hiperplasia pós-atrótica) da variante completa, é a lesão benigna que mais freqüentemente se confunde histologicamente com adenocarcinoma. O uso da imunexpressão de citoqueratinas de alto peso molecular para detecção de células basais é de grande valia para o diagnóstico diferencial, entretanto, principalmente na variante parcial as células basais podem estar espaçadas e mesmo ausentes em alguns ácinos benignos. Nestes casos o uso da imunexpressão de AMACR pode ser útil no diagnóstico diferencial.

Na literatura, somente 4 trabalhos estudaram o uso de AMACR em lesões de atrofia prostática com resultados controvertidos. Dois trabalhos relataram total negatividade em focos de atrofia. Um terceiro trabalho observou que focos de atrofia podiam mostrar total negatividade ou positividade focal, fraca e não circunferencial. O quarto trabalho mostrou uma positividade relativamente alta em casos de atrofia parcial a qual, de acordo com os autores, podia ser explicada pela variabilidade das técnicas e anticorpos empregados uma vez que o material estudado era de consultas provenientes de várias instituições universitárias ou particulares.

Considerando que, a atrofia prostática, notadamente a variante parcial, é a lesão benigna que mais freqüentemente se confunde com adenocarcinoma e os resultados controvertidos de apenas 4 trabalhos encontrados na literatura, acreditamos que este estudo seja uma contribuição relevante no que se refere à utilidade da imunexpressão da AMACR no diagnóstico diferencial da atrofia prostática com o adenocarcinoma em biópsias prostáticas de agulha.



3- OBJETIVOS

1. Avaliar através da imunistoquímica a expressão apresentada pela AMACR em ácinos normais, ácinos com atrofia completa (esclerosante, hiperplásica e simples) e atrofia parcial e ácinos com adenocarcinoma, quantificando a intensidade de sua marcação (forte, fraca ou ausente) e classificando seu padrão de imunoexpressão nestes ácinos (difuso, luminal ou misto);

2. Avaliar através de imunistoquímica, utilizando pool de citoqueratinas de alto peso molecular (34βE12), o padrão de distribuição das células basais em ácinos normais, ácinos com atrofia completa (esclerosante, hiperplásica e simples) e atrofia parcial e ácinos com adenocarcinoma;

3. Baseando-se nos resultados do estudo, avaliar criticamente a real utilidade do uso do coquetel AMACR+34βE12 no diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma e atrofia parcial.



4- MATERIAL E MÉTODOS

Aplicando a técnica imunoistoquímica com o uso do coquetel P504S+34βE12 foram analisadas a imunoexpressão em 1198 ácinos, provenientes de 74 biópsias prostáticas de agulha de 61 pacientes, correspondendo a 324 ácinos com adenocarcinoma, 213 ácinos normais, 190 ácinos com atrofia parcial, 298 ácinos com hiperplasia pós-atrótica, 139 ácinos com atrofia simples e 34 ácinos com atrofia esclerosante.

4.1. Atrofia

Os casos de atrofia parcial e atrofia completa (simples, hiperplásica e esclerosante), foram selecionados a partir de lâminas coradas de H & E provenientes do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp. A atrofia parcial foi diagnosticada de acordo com os critérios de Oppenheimer et al. (1998). Em contraste à atrofia completa, a qual pode ser mais facilmente diagnosticada com base no aumento da presença de glândulas bem formadas e com intensa basofilia devido à escassez de citoplasma, na atrofia parcial há preservação do citoplasma lateral ao núcleo dando às células aspecto claro que simula adenocarcinoma (figura 1).

A atrofia completa foi diagnosticada de acordo com os critérios estabelecidos por Billis (1998). Três tipos histológicos foram identificados: a atrofia simples, a atrofia hiperplásica e a atrofia esclerosante.

A atrofia simples usualmente envolve todo o lobo, os ácinos são pequenos e demonstram pouca diminuição da altura das células epiteliais (figura 2). Podem apresentar dilatação cística com achatamento do epitélio, o estroma circundante pode apresentar algum grau de fibrose ou elastose.

A atrofia hiperplásica apresenta pequenos ácinos com diferentes graus de proliferação e revestidos por epitélio atrófico, esses ácinos estão agrupados como ilhas (figura 3). O estroma pode ou não apresentar algum grau de fibrose. Quando presente, a proliferação é irregular notando-se eventual distorção do lúmen acinar formando ácinos pontiagudos. Por causa desta distorção acinar o

ácino simula infiltração do estroma. É o subtipo de atrofia completa que mais freqüentemente traz dificuldades no diagnóstico diferencial com adenocarcinoma.

A atrofia esclerosante é uma lesão peculiar (figura 4), pois há simultaneamente a atrofia do epitélio e a proliferação de fibroblastos ao redor do ácino, onde a proliferação contínua dos fibroblastos no estroma resultam na formação de um colar fibro-hialino que freqüentemente vem associado à elastose que envolve o ácino. À medida que a hialinização se torna mais intensa, os ácinos ou ductos se dilatam, às vezes acentuadamente, e o epitélio se torna extremamente achatado e, eventualmente, desaparece. Quando isto ocorre, o lúmen é substituído por um tecido frouxo que lembra mesênquima com presença de infiltrado inflamatório de células redondas.

4.2. Imunoistoquímica - Coquetel P504S+34βE12

Foram utilizados tecidos fixados em formalina tamponada, emblocados em parafina e cortados na espessura 3-4µm. Colocados sobre lâminas de vidro previamente tratadas com organossilano, foram então submetidos a tratamento para recuperação antigênica em panela a vapor em uma solução tampão de Tris-EDTA, ph 8.9, por 30 minutos a 95°C. As lâminas foram encubadas em estufa a 37°C por 30 minutos, com anticorpo monoclonal de coelho anti-P504S (AMACR) humano (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, CA, USA) numa diluição de 1:100, junto com o anticorpo monoclonal de camundongo citoqueratina de alto peso molecular (clone 34βE12) (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, CA, USA), Carpinteria, CA), numa diluição de 1:100. Depois levadas à geladeira, para procedimento no dia seguinte (tabela 1). O sistema de detecção usado foi o Advanced™ HRP Link Enzyme (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, CA, USA)(composto por Advanced™ HRP Link, um polímero carregado com Ig anti-camundongo e anti-coelho, produzido em cabra, e por Advanced™ HRP Enzyme, que é um segundo polímero conjugado com uma grande quantidade de

peroxidase e menor quantidade de Ig anti-cabra, que vai se ligar ao primeiro polímero, e amplificar a marcação do anticorpo no tecido).

As lâminas foram incubadas com o Advanced™ HRP Link, por 30 minutos em estufa a 37° C, seguido de lavagem e incubação com o Advanced™ HRP Enzyme , por 30 minutos em estufa a 37° C.

O produto final foi visualizado através da reação da diaminobenzidina com a peroxidase do sistema de detecção. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina.

O padrão de imunoexpressão obtido através da proteína P504S (AMACR) nas células secretoras foi considerado citoplasmático difuso (figura 5), luminal quando presente no citoplasma, na região do lúmen e misto quando apresentou marcação difusa citoplasmática com acentuação luminal (figura 6).

O padrão de intensidade de imunoexpressão da P504S foi considerado forte, fraco e negativo.

A imunoexpressão do anticorpo citoqueratina de alto peso molecular (clone 34βE12) foi utilizado para a detecção da presença das células basais e foi classificado de acordo com sua distribuição: contínua, descontinuas ou ausentes, no citoplasma das células basais.



5- RESULTADOS

Ácinos de adenocarcinoma apresentaram intensidade de imunoeexpressão para o anticorpo anti-P504S fraca ou forte (figuras 5 e 6). A imunoeexpressão foi fraca em 73/324 (22.5%) ácinos e forte em 251/324 (77.5%) ácinos.

A tabela 2 apresenta a imunoeexpressão do anticorpo anti-P504S em adenocarcinoma, ácinos normais e em atrofia: parcial, simples, hiperplásica e esclerosante. Os ácinos normais apresentaram imunoeexpressão para o anticorpo anti-P504S, como negativa, fraca ou forte onde os resultados obtidos foram respectivamente 167/213 (78.4%) marcação negativa, 33/213 (15.5%) marcação fraca, e 13/213 (6.1%) marcação forte (figura 7).

A atrofia parcial apresentou imunoeexpressão negativa ou fraca, tendo como resultados, 143/190 (75.3%) marcação negativa, e 47/190(24.7%) marcação fraca.

O anticorpo anti-P504S foi negativo em todos os casos de atrofia simples, hiperplásica (ou hiperplasia pos-atr6fica) e esclerosante (figura 9).

As tabelas 3 e 4 mostram o padr6o da imunoeexpress6o do anticorpo anti-P504S.

Em ácinos de adenocarcinoma, o padr6o de marcaç6o difusa obtido foi de 28 (38.4%), o luminal 45 (61.6%) e o misto 0 (0%).

Em ácinos normais o padr6o de marcaç6o difuso foi de 26 (78.8%), o luminal 5 (15.2%) e o misto 2 (6%).

O padr6o de positividade em ácinos de atrofia parcial obtido na marcaç6o difusa foi de 20 (42.6%), para a luminal 2 (4.2%), e para a mista 25 (53.2).

O padr6o forte de positividade de imunoeexpress6o para o anticorpo anti-P504S observado nos casos de adenocarcinoma para as marcaç6es difusas foram 34 (13.5%) (figura 7), para a marcaç6o luminal 26 (10.4%) e para a mista 191 (76.1%)

Para a imunoeexpress6o de marcaç6o forte para o anticorpo anti-P504S observado em ácinos normais com padr6o difuso (figura 7) foram obtidos 6 (46.2%), para o padr6o luminal 7 (53.8%) e para o misto 0 (0%).

Para a imunexpressão de marcação forte para anticorpo anti- P504S nenhum resultado foi obtido nos casos de atrofia parcial

Foram contados os ácinos de acordo com a distribuição das células basais na atrofia parcial sendo observada distribuição contínua, descontínua ou ausente. (figura 8) sendo os valores obtidos, respectivamente, 42/190 (22.1%), 104/190 (54.7%) e 44/190 (23.2%) (tabela 5).

A imunexpressão para o *pool* de citoqueratinas de alto peso molecular (clone 34 β E12) apresentaram o padrão de marcação citoplasmático em células basais e sua distribuição nestas, se apresentaram contínuas, e eventualmente descontínuas em ácinos normais. Esse padrão se repetiu nos casos de atrofia simples, hiperplásica ou esclerosante.

Nos casos de ácinos de adenocarcinoma não houve imunexpressão para o *pool* de citoqueratinas de alto peso molecular (clone 34 β E12), visto que os ácinos neoplásicos não apresentam células basais.



6- DISCUSSÃO

A atrofia prostática é uma das lesões que com maior freqüência imitam o adenocarcinoma prostático. Esta lesão ocorre mais freqüentemente no lobo posterior ou zona periférica e ganhou importância com a crescente utilização de biópsias de agulhas para a detecção de carcinoma da próstata (Billis, 1998; Cheville & Bostwick, 1995).

Moore, em 1936, foi um dos primeiros autores a descrever atrofia prostática em um estudo de autópsia (Moore, 1936). Trata-se de uma lesão que tem uma freqüência de 85% em autópsias (Billis, 1998) e de 83,7% em biópsias de agulha (Billis *et al.*, 2007).

A nomenclatura da atrofia prostática é difícil e confusa. Moore classificou a atrofia prostática em atrofia acinar simples e atrofia esclerosante (Moore, 1936). Franks, em 1954 adicionou a atrofia acinar simples e a atrofia esclerosante uma lesão chamada por ele de hiperplasia pós-atrófica (Franks, 1954).

Quando a atrofia acinar simples forma hiperplasia, Franks (1954) chamou-a de hiperplasia lobular. Em geral, ela envolve todo o lóbulo glandular. O ducto central ou alvéolo, geralmente alongado e, muitas vezes mostrando dilatações císticas, é cercado por ácinos recém formados. Atrofia esclerosante foi chamada de hiperplasia pós-esclerótica. Desde os primeiros estudos, os autores descreveram entidades morfológicas similares com diferentes nomes.

Em um grupo de trabalho para classificar a atrofia (De Marzo *et al.*, 2006) quatro subtipos de atrofia focal foram consideradas: atrofia simples, atrofia simples com formação de cistos, hiperplasia pós-atrófica e atrofia parcial. Em um estudo feito em autópsias, 3 subtipos foram considerados como atrofia focal: atrofia simples, atrofia hiperplásica (ou hiperplasia pós-atrófica) e atrofia esclerosante (Billis, 1998). A atrofia focal está em contraste com a atrofia difusa, ocorrendo esta última secundariamente a radioterapia e/ou terapia hormonal.

Mais de um subtipo de atrofia, ou seja, lesões mistas podem ser vistas em biópsias de agulha.

A atrofia é claramente associada ao avanço da idade. (Billis, 1998; Moore 1936). Radioterapia e/ou tratamentos hormonais estão associados com

atrofia difusa. Inflamação inativa ou ativa é causa freqüente de atrofia focal. Estudos em autópsias mostram evidências de que a isquemia crônica local também pode ser causa de atrofia focal (Billis, 1998). No entanto, muitos casos de atrofia são ainda considerados de natureza idiopática.

A relação da atrofia prostática com a neoplasia é controversa. De Marzo *et al.* (1999) sugerem que a atrofia proliferativa inflamatória pode de fato dar origem ao carcinoma diretamente ou que a atrofia proliferativa pode evoluir para carcinoma indiretamente via neoplasia intraepitelial prostática de alto grau. Outros estudos estão em desacordo com esta hipótese (Billis *et al.*, 2007; Postma *et al.*, 2005).

A atrofia parcial e a hiperplasia pós-atrófica (atrofia hiperplásica) são as lesões benignas que mais freqüentemente são confundidas com adenocarcinoma. Uma das razões que contribuem para dificultar o diagnóstico da atrofia parcial está relacionada com a ausência de células basais em alguns ácinos (Billis, 1998; Cheville & Bostwick, 1995).

A aplicação da molécula de AMACR (alfa-metilacil Co-enzima A racemase) como marcador de células neoplásicas através de imunistoquímica tem auxiliado no diagnóstico diferencial com o adenocarcinoma. Entretanto, sua aplicação na rotina diagnóstica ainda não está estabelecida. A imunoexpressão da AMACR pode causar algumas dúvidas em sua interpretação. Na literatura existem poucos estudos que relatam a expressão da AMACR em atrofia parcial (Herawi *et al.*, 2005; Beach *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2002 Jiang *et al.*, 2001)..

Avaliamos através de imunistoquímica a expressão da AMACR e do *pool* citoqueratina de alto peso molecular (clone 34 β E12) através do coquetel P504S+34 β E12 em material proveniente de 74 biópsias por agulha de próstata correspondendo a 61 pacientes. Foram analisados um total de 1198 ácinos prostáticos (324 ácinos de adenocarcinoma, 213 ácinos normais, 190 ácinos de atrofia parcial, 298 ácinos de hiperplasia pós-atrófica, 139 ácinos de atrofia simples e 34 ácinos de atrofia esclerosante). Nos ácinos neoplásicos a intensidade da marcação da AMACR foi forte em 251/324 (77.5%) e fraca 73/324 (22.5%). Não houve casos negativos. Nos ácinos normais observou-se marcação para a

AMACR forte em 13/213 (6.1%), fraca em 33/213 (15.5%) e negativa em 167/213 (78.4%). A atrofia parcial apresentou marcação para a AMACR fraca em 47/190 (24.7%) e negativa em 143/190 (75.3%). Não houve marcação forte em nenhum dos casos de atrofia parcial. A imunexpressão de AMACR foi negativa em todos os casos de atrofia completa e suas variantes: atrofia simples, hiperplásica e esclerosante.

Estudos anteriores não descreveram a expressão da racemase nas diversas variantes da atrofia (Wang *et al.*, 2008; Herawi *et al.*, 2005; Beach *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2002 Jiang *et al.*, 2001).

Jiang *et al.*, 2001, examinaram por imunocitoquímica a expressão do anticorpo monoclonal P504S (AMACR) em um total de 207 biópsias de próstata: 77 prostatectomias, 112 biópsias por agulha e 18 biópsias transuretrais. Foram analisados 137 casos de adenocarcinoma de próstata e 70 casos de próstatas benignas. Neste estudo, a AMACR apresentou forte marcação citoplasmática granular em 100% dos carcinomas, independente de sua graduação histológica (Gleason), com imunomarcção difusa (>75% do tumor) em 92% dos casos. Em contrapartida, 171/194 (88%) dos casos com próstata benigna foram negativos para AMACR. A expressão da P504S não foi encontrada nos casos de hiperplasia de células basais, metaplasia urotelial e em pequenas glândulas atroficas que imitam carcinoma (Jiang *et al.*,2001)

Em 2001, Jiang *et al.* observaram que focos de atrofia tinham expressão de AMACR totalmente negativa à avaliação imunoistoquímica. Os autores não relatam se os focos eram de atrofia parcial ou completa, tampouco os subtipos da última.

Rubin *et al.*, 2002, usando o anticorpo monoclonal anti-P504S demonstraram um aumento da expressão da AMACR em epitélio prostático maligno em relação ao epitélio prostático benigno. Neste estudo com “tissue microarrays”, analisaram-se 108 amostras de próstata benigna, 26 de atrofia prostática, 75 com neoplasia intraepitelial prostática, 116 com carcinoma de próstata e 17 em metástases de adenocarcinoma da próstata. Estes fragmentos

apresentaram intensidade de marcação média para AMACR: 1.31, 2.33, 2.67, 3.20, e 2.5 respectivamente ($p < 0,001$).

Em 2002, Beach *et al.* aplicou imunistoquímica com anticorpo monoclonal P504S num total de 366 biópsias de agulha de próstata, sendo 10 de 2 pacientes sem adenocarcinoma, 28 provenientes de prostatectomias (16 com padrão morfológico específico, 7 após terapia hormonal e 5 após tratamento radioterápico), 5 de carcinomas invasivos uroteliais da bexiga e uma ressecção transuretral de um paciente com carcinoma urotelial invasivo da bexiga e câncer de próstata, tratado com terapia hormonal. Um total de 153/186 biópsias (82%) com adenocarcinoma de próstata apresentaram imunexpressão para P504S. Não houve imunexpressão em ácinos atróficos de hiperplasia pós-atrófica ($n=10$), metaplasia urotelial ($n=7$), e hiperplasia de células basais ($n=1$). Três de 79 (4%) focos de atrofia tinham expressão focal, fraca e não circunferencial.

Rubin *et al.*(2002), observaram que não havia expressão de AMACR em focos de atrofia prostática. Os autores também não especificaram o tipo de atrofia analisado (Rubin *et al.*,2002)

Em 2005, Herawi *et al.* estudaram a utilidade do uso da AMACR em lesões benignas da próstata que potencialmente simulam adenocarcinoma, dando ênfase à variante parcial da atrofia. O material de estudo correspondeu a biópsias prostáticas de agulha recebidas em consulta por Epstein no Hospital Johns Hopkins. Em 345 pacientes de um total de 4046 pacientes, foram observadas 567 lesões suspeitas de adenocarcinoma. Após revisão, estas lesões foram, então, diagnosticadas como benignas. Destas 567 lesões, 203/567 (35,8%) correspondiam à atrofia parcial, sendo esta a lesão benigna que mais freqüentemente se confundiu com adenocarcinoma. Do total de biópsias com atrofia parcial, 117/203 (57,6%) dispunham de estudo imunistoquímico para citoqueratinas de alto peso molecular (clone 34 β E12) ou p63 com resultados técnicos aceitáveis e 19/203 (9,3%) tinham análise imunistoquímica para AMACR (Herawi *et al.*,2005). O padrão de positividade em imunistoquímica para células basais foi considerado: focal (ácinos mostrando células basais esparsas) em 87% dos casos, focal/negativo (ácinos com células basais esparsas e ácinos totalmente

negativos) em 13% dos casos; e, negativo (ácinos totalmente negativos) em 13% dos casos. Nenhum caso mostrou padrão de positividade difusa (células basais em disposição contínua). Dos 19 casos que dispunham de estudo para AMACR, 15/19 (79%) foram positivos. Os autores não fizeram distinção entre intensidade de coloração fraca, moderada ou intensa, aceitando qualquer intensidade mais forte que o fundo como positiva. A alta frequência de positividade para AMACR nesta casuística pode ser explicada, de acordo com os autores, pela variabilidade das técnicas e anticorpos empregados, uma vez que o material em consulta recebido provinha de várias instituições universitárias ou particulares (Herawi *et al.*,2005)

Em 2008, Wang *et al.* (2008) analisaram através de imunoistoquímica biópsias de próstata por agulha, recebidas em consulta no período de 3 meses: 170 casos tinham diagnóstico de atrofia parcial. Foram incluídos no estudo mais 108 casos de atrofia parcial, sem áreas de glândulas atípicas ou adenocarcinoma, recebidos também como consulta. Utilizou-se o coquetel imunoistoquímico com tripla marcação (34 β E12+p63+P504S). A imunoexpressão nas áreas de atrofia foi caracterizada como citoplasmática difusa ou luminal. A intensidade da coloração como negativa, fracamente positiva, moderadamente positiva e fortemente positiva. Estes resultados, segundo os próprios autores, devem ser interpretados com cautela, visto os espécimes serem procedentes de diferentes instituições, com diferentes protocolos de imunoistoquímica e marcas de anticorpos utilizados.

Como achado adicional ao estudo, observamos no nosso estudo a ausência de imunoexpressão da AMACR nos 3 subtipos da atrofia completa, bem como expressão aberrante de 34 β E12 no compartimento secretor.

Utilizando-se o coquetel AMACR (P504S) com pool de citoqueratinas de alto peso molecular (34 β E12) nas 3 variantes da atrofia completa, observou-se uma sobreposição aparente de positividade nas células basais e secretoras.

Van Leenders *et al.*, (2003) constatou que na atrofia proliferativa inflamatória as células do compartimento secretor têm feições intermediárias. Esta conclusão foi parcialmente baseada nos achados sobre a fraca expressão destas células para PSA e receptor androgênico, e níveis elevados de citoqueratina 8/18,

e da falta de expressão para p63. Segundo os autores, a constatação de um grande número de células intermediárias altamente proliferativas na atrofia proliferativa inflamatória apóia a hipótese de que estas células possam representar as células principalmente envolvidas na carcinogênese prostática. É importante mencionar que esta expressão aberrante fenotípica do compartimento das células secretoras também é visto nos ácinos atróficos da próstata de cães castrados, sugerindo assim uma pluripotencialidade de resposta a hormônios sexuais (Merk *et al.*, 1986).

O uso isolado do anticorpo anti-P504S (AMACR/racemase/alfa-metilacil-CoA-racemase) como um marcador para adenocarcinoma deve ser interpretado com muita cautela, visto que esta proteína pode apresentar imunoexpressão forte em cerca de 6% de ácinos normais e, imunoexpressão fraca em aproximadamente 25% de ácinos com atrofia parcial, o que pode dificultar a interpretação dos resultados. Soma-se a estes achados o fato de que em 23.2% dos ácinos de atrofia parcial as células basais estão ausentes. Estes dados impõem cautela no difícil diagnóstico diferencial de pequenos focos “suspeitos, mas não diagnósticos de adenocarcinoma da próstata”, sendo que em alguns casos os critérios puramente morfológicos poderão ser os únicos na identificação da lesão.



7- CONCLUSÃO

1. O anticorpo anti-P504S (AMACR / alfa-metilacil-CoA-racemase) mostrou-se um bom marcador de ácinos neoplásicos revelando forte positividade em cerca de 77.5% dos mesmos e fraca positividade em aproximadamente 22.5% dos mesmos. Não houve ácinos negativos. Em ácinos normais, houve negatividade em cerca de 78% dos casos, entretanto houve expressão fraca em 15.5% dos ácinos e forte em aproximadamente 6%. Em ácinos de atrofia parcial a negatividade foi em cerca de três quartos dos casos, entretanto, em aproximadamente 25% dos ácinos foi fraca.

2. A imunoexpressão para 34 β E12 nas células basais foram ausentes nos ácinos neoplásicos constituindo um achado peculiar a eles. Em ácinos de atrofia parcial, as células basais foram contínuas em 22.1% dos casos, descontínuas em 54.7% dos casos e totalmente ausentes em 23.2% dos casos.

3. Analisando-se estes resultados conclui-se que o diagnóstico diferencial do adenocarcinoma com atrofia parcial deve ser feito com cautela considerando-se que a expressão de AMACR, apesar de fraca em nosso estudo, pode ocorrer em cerca de 25% dos ácinos. Soma-se a este achado o fato de que em 23.2% dos ácinos de atrofia parcial as células basais estão ausentes. Estes dados impõem cautela no difícil diagnóstico diferencial de pequenos focos “suspeitos, mas não diagnósticos de adenocarcinoma da próstata”, sendo que, em alguns casos, os critérios puramente morfológicos poderão ser os únicos na identificação da lesão.



8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ananthranarayanan V, Deaton RJ, Yang XJ, Pins MR, Gann PH. Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) expression in normal prostatic glands and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): association with diagnosis of prostate cancer. *Prostate*. 2005; 63: 341-346.

Beach R, Gown AM, De Peralta-Venturina MN, Folpe AL, Yaziji H, Salles PG, et al. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 37618 gauge needle biopsies. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26: 1588-1596.

Billis A. Prostatic atrophy: An autopsy study of a histologic mimic of adenocarcinoma, *Mod Pathol*. 1998; 11: 47-54.

Billis A.; Magna,L.A.- Prostate elastosis. A microscopic feature useful for the diagnosis of postatrophic hyperplasia, *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124: 1306-1309.

Billis A, Magna LA: Inflammatory atrophy of the prostate. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127: 840-844.

Billis A. *Patologia cirúrgica da próstata*. Campinas: Impressão Digital do Brasil Gráfica e Editora Ltda, 2003.

Billis A, Freitas LLL, Magna LA, et al.: Inflammatory atrophy on prostate needle biopsies: Is there topographic relationship to cancer? *Int Braz J Urol*. 2007; 33: 355-363.

Billis A, Meirelles LR, Magna LA, et al.: Extent of prostatic atrophy in needle biopsies and serum PSA levels: is there an association? *Urology*. 2007; 69: 927-930.

Bostwick DG, Srigley J, Grignon D, Maksem J, Humphrey P, van der Kwast TH, et al. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: morphologic criteria for its distinction from well-differentiated carcinoma. *Hum Pathol.* 1993; 24: 819-832.

Bostwick DG. Premalignant lesions of the prostate. *Semin Diag Pathol.* 1988; 5: 240-253.

Bostwick DG. Prospective origins of prostate carcinoma: prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer.* 1996; 77: 330-336.

Brawer MK, Peehl DM, Stamey TA, Bostwick DG. Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res.* 1985; 45: 3663-3667.

Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal exam and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol.* 1994; 151: 1283-1290.

Chen ZM, Ritter JH, Wang HL. Differential Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase in adenocarcinomas of the small and large intestines. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29: 890-896.

Cheville, J.C. & Bostwick, D.G.- Postatrophic hyperplasia of the prostate. A histologic mimic of prostatic adenocarcinoma, *Am J Surg Pathol.* 1995; 19: 1068-1076.

De Marzo AM, Platz EA, Epstein JI et al.: A working group classification of focal prostate atrophy lesions. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30: 1281-1291.

De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999; 155: 1985-1992.

DiGiuseppe JA, Sauvageot J, Epstein JI. Increasing incidence of minimal residual cancer in radical prostatectomy specimens. *Am J Surg Pathol.* 1997; 21: 174-178.

Epstein JI, Yang XJ. *Prostate biopsy interpretation.* Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002.

Epstein JI, Yang XJ. *Prostate Biopsy Interpretation.* Third Edition. Lippincott Williams and Walkins, Philadelphia, PA, 2002.

Epstein JI. Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Hum Pathol.* 1995; 26: 223-229.

Ferdinandusse S, Denis S, Li J, Dacremont G, Waterham HR, Wanders RJ. Subcellular localization and physiological role of alpha-methylacyl-CoA racemase. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1890-1896.

Ferdinandusse S, Rusch H, van Lint AE, Dacremont G, Wanders RJ, Vreken P. Stereochemistry of the peroxisomal branched-chain fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in patients suffering from different peroxisomal disorders. *J Lipid Res.* 2002; 43: 438-444.

Franks LM: Atrophy and hyperplasia in the prostate proper. *J Pathol Bacteriol.* 1954; 68: 617-621.

Gardner,W.A. Jr. & Culberson,D.E.- Atrophy and proliferation in the young adult prostate, *J Urol.* 1987; 137: 53-56.

Gupta A, Wang HL, Policarpio-Nicholas ML, Tretiakova MS, Papavero V, Pins MR, et al. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase in nephrogenic adenoma. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28: 1224-1229.

Gupta N, De Peralta-Venturina MN, Gown AM, Beach R, Salles P, Yazini H et al. P504S antibody expression in putative precursor lesion of prostate carcinoma (PCA) high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and atypical adenomatous hyperplasia (AAH). *Mod Pathol.* 2003; 16: 152A.

Guzman G, Wu SJ, Kajdacsy-Balla A, Cotler SJ. Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR/P504S) can distinguish hepatocellular carcinoma and dysplastic hepatocytes from benign nondysplastic hepatocytes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006,14: 411-416.

Herawi M, Parwani AV, Irie J, Epstein JI. Small glandular proliferations on needle biopsies: Most common benign mimickers of prostatic adenocarcinoma sent in for expert second opinion. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29: 874-880.

Humphrey PA. Diagnosis of adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2006; 19: 899-906.

Iczkowski, K.A.; MacLennan,G.T. & Bostwick,D.G. - Atypical small acinar proliferation suspicious for malignancy in prostate needle biopsies: clinical significance in 33 cases, *Am J Surg Pathol.* 1997; 21:1489-1495.

Jiang Z, Woda BA, Rock KL, Xu Y, Savas L, Khan A, et al. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25: 1397-1404.

Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Dresser K, Xu J, Fanger G, et al. P504S/ alpha-methylacyl-CoA racemase: a useful marker for diagnosis of small foci of prostatic carcinoma on needle biopsy. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26: 1169-1174.

Jiang Z, Fanger GR, Woda BA, Banner BF, Algate P, Dresser K, et al. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) in various malignant neoplasms and normal tissues: a study of 761 cases. *Hum Pathol.* 2003a; 34: 792- 796.

Jiang Z, Fanger GR, Banner BF, Woda BA, Algate P, Dresser K, et al. A dietary enzyme: alpha-methylacyl-CoA racemase/P504S is overexpressed in colon carcinoma. *Cancer Detect Prev.* 2003b; 27: 422-426.

Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Iczkowski KA, Chu PG, Tretiakova MS, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. *Histopathology.* 2004a; 45: 218- 225.

Jiang Z, Iczkowski KA, Woda BA, Tretiakova M, Yang XMJ. P504S immunostaining boosts diagnostic resolution of “suspicious” foci in prostatic needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 2004b; 121: 99-107.

Jiang Z, Li C, Fischer A, Dresser K, Woda BA. Using an AMACR (P504S)/34betaE12/p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123: 231-236.

Kotti TJ, Savolainen K, Helander HM, Yagi A, Novikov DK, Kalkkinen N et al. In mouse alpha-methylacyl-CoA racemase, the same gene product is simultaneously located in mitochondria and peroxisomes. *J Biol Chem.* 2000; 275: 20887-20895.

Kovi J. Microscopic differential diagnosis of small acinar adenocarcinoma of prostate. *Pathol Annu.* 1985; 20: 157-196.

Kumar-Sinha C, Shah RB, Laxman B, Tomlins SA, Harwood J, Schmitz W, et al. Elevated alpha-methylacyl-CoA racemase enzymatic activity in prostate cancer. *Am J Pathol.* 2004; 164: 787-93.

Kunju LP, Rubin MA, Shen R, Ingold C, Chinnaiyan AM, Shah RB, et al. Comparison of monoclonal antibody (P504S) and polyclonal antibody to alpha-methylacyl-CoA racemase in benign, atypical and malignant prostate tissue. *Mod Pathol.* 2003; 16: 718.

Leav I, McNeal JE, Ho SM, Jiang Z. Alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) expression in evolving carcinomas within benign prostatic hyperplasia and in cancers of the transition zone. *Hum Pathol.* 2003; 34: 228-233.

Liavag,I.- Atrophy and regeneration in the pathogenesis of prostatic carcinoma, *Acta Path Microbiol Scandinav .* 1968; 73: 338-350.

Lin F, Brown RE, Shen T, Yang XJ, Schuerch C. Immunohistochemical detection of P504S in primary and metastatic renal cell carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2004; 12: 153-159.

Logani S, Oliva E, Arnell PM, Amin MB, Young RH. Use of novel immunohistochemical markers expressed in colonic adenocarcinoma to distinguish primary ovarian tumors from metastatic colorectal carcinoma. *Mod Pathol.* 2005; 18: 19-25.

Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennett CJ, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; 62: 2220-2226.

Mahul A, Boccon-Gibod L, Egevad L, Epstein JI, Humphrey PA, Mikuz G et al. Prognostic and predictive factors and reporting of prostate carcinoma in prostate needle biopsy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2005; 216: 20-33

Mazal PR, Schaufler R, Altenhuber-Muller R, Haitel A, Watschinger B, Kratzik C, et al. Derivation of nephrogenic adenomas from renal tubular cells in kidney-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2002; 347: 653-659.

Merk FB, Warhol MJ, Kwan PWL et al. Multiple phenotypes of prostatic glandular cells in castrated dogs after individual or combined treatment with androgen and estrogen. Morphometric, ultrastructural, and cytochemical distinctions. *Lab Invest.* 1986; 54: 442-456.

Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific levels. *J Urol.* 1995; 154 :407-413.

Oppenheimer JR, Wills ML, Epstein JI. Partial atrophy in prostate needle cores: another diagnostic pitfall for the surgical pathologist. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 440-445.

Postma R, Schröder FH, van der Kwast TH: Atrophy in prostate needle biopsy cores and its relationship to prostate cancer incidence in screened men. *Urology.* 2005; 65: 745-749.

Rubin MA, Bismar TA, Andren O, Mucci L, Kim R, Shen R, et al. Decreased alpha-methylacyl-CoA racemase expression in localized prostate cancer is associated with an increased rate of biochemical recurrence and cancer-specific death. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1424-1432.

Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA.* 2002; 287: 1662-1670.

Schmitz W, Albers C, Fingerhut R, Conzellan E. Purification and characterization of an alpha-methylacyl-CoA racemase from human liver. *Eur J Biochem.* 1995; 231: 815- 822.

Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, et al. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol.* 2000; 157: 1769-1775.

Scheil-Bertram S, Lorenz D, Ell C, Sheremet E, Fisseler-Eckhoff A. Expression of alpha-methylacyl coenzyme A racemase in the dysplasia carcinoma sequence associated with Barrett's esophagus. *Mod Pathol.* 2008; 21: 961-967.

Shi X, Gong E, Wu X.. Alpha-methylacyl-CoA racemase/P504S overexpression in colorectal carcinoma is correlated with tumor differentiation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007; 15: 17 -180.

Srigley JR. Benign mimickers of prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2004; 17: 328-348.

Suh N, Yang XJ, Tretiakova MS, Humphrey PA, Wang HL. Value of CDX2, villin, and alpha-methylacyl-CoA racemase immunostains in the distinction between primary adenocarcinoma of the bladder and secondary colorectal adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2005; 18: 1217-1222.

Tretiakova MS, Sahoo S, Takahashi M, Turkyilmaz M, Vogelzang NJ, Lin F, et al. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase in papillary renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28: 69-76.

Van Leenders GJLH, Gage WR, Hicks JL et al. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol.* 2003; 162: 1529-1537.

Witkiewicz AK, Varambally S, Shen R, Mehra R, Sabel MS, Ghosh D, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase protein expression is associated with the degree of differentiation in breast cancer using quantitative image analysis. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* 2005; 14: 1418-1423.

Wojno KJ, Epstein LI. The utility of basal cell-specific anticytokeratin antibody (34 beta E 12) in the diagnosis of prostate cancer: a review of 228 cases. *Am J Surg Pathol.* 1995; 19: 251-260.

Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, et al. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *CancerRes.* 2000; 60: 1677-1682.

Yang XJ, Wu CL, Woda BA, Dresser K, Tretiakova M, Fanger GR, et al. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) in atypical adenomatous hyperplasia of the prostate. *Am J Surg. Pathol.* 2002; 26: 921-925.

Wang W, Sun X, Epstein JI. Partial atrophy on prostate needle biopsy cores: a morphologic and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32: 851-857.

Zhou M, Aydin H, Kanane H, Epstein JI. How often does alpha-methylacyl-CoA racemase contribute to resolving an atypical diagnosis on prostate needle biopsy beyond that provided by basal cell markers? *Am J Surg Pathol.* 2004; 28: 239-243.

Zhou M, Chinnaiyan AM, Kleer CG, Lucas PC, Rubin MA. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a novel tumor marker over-expressed in several human cancers and their precursor lesions. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26: 926-931.



9- APÊNDICE

TABELA 1. Anticorpos e técnicas empregadas.

Especificidade	Clone	Diluição	Recuperação Antigênica	Isótipo/ Espécie	Fornecedor
P504S	13H4	1:100	Tris-EDTA pH 8.9	IgG1/anti- rabbit	DAKO
HMWC	34βE12	1:100	Tris-EDTA pH 8.9	IgG1/anti- mouse	DAKO

TABELA 2. Intensidade de imunexpressão da AMACR (clone P504S) em ácidos com adenocarcinoma, ácidos normais, ácidos com atrofia parcial e ácidos com atrofia simples, hiperplásica (hiperplasia pós-atrótica) e esclerosante. (coquetel P504S + 34βE12).

	Negativo No.	Fraco No.	Forte No.
Adenocarcinoma	0 (0%)	73 (22.5%)	251 (77.5%)
Ácidos Normais	167 (78.4%)	33 (15.5%)	13 (6.1%)
Atrofia Parcial	143 (75.3)	47 (24.7) %	0 (0%)
Atrofia Simples	139 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Atrofia Hiperplásica	298 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Atrofia Esclerosante	34 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

TABELA 3. Padrão de positividade de imunexpressão fraca para AMACR em ácidos de adenocarcinoma, ácidos normais e ácidos de atrofia parcial (coquetel P504S + 34βE12).

	Difuso No.	Luminal No.	Misto No.
Adenocarcinoma	28 (38.4%)	45 (61.6%)	0 (0%)
Ácidos Normais	26 (78.8%)	5 (15.2%)	2 (6%)
Atrofia Parcial	20 (42.6%)	2 (4.2%)	25 (53.2%)

TABELA 4. Padrão de positividade de imunexpressão forte para AMACR em ácidos de adenocarcinoma, ácidos normais e ácidos de atrofia parcial (coquetel P504S+ 34βE12).

	Difuso No.	Luminal No.	Misto No.
Adenocarcinoma	34 (13.5%)	26 (10.4%)	191 (76.1%)
Ácidos Normais	6 (46.2%)	7 (53.8%)	0 (0%)
Atrofia Parcial	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

TABELA 5. Padrão de distribuição das células basais utilizando-se a citoqueratina de alto peso molecular (clone 34 β E12) em ácinos de adenocarcinoma, ácinos normais e ácinos de atrofia parcial (coquetel P504S+ 34 β E12).

	Contínuo No.	Descontínuo No.	Ausente No.
Adenocarcinoma	0/324 (0%)	0/324 (0%)	324/324 (100%)
Ácinos Normais	237/318 (74.5%)	80/318 (25.1%)	1/318 (0.3%)
Atrofia Parcial	42/190 (22.1%)	104/190 (54.7%)	44/190 (23.2%)

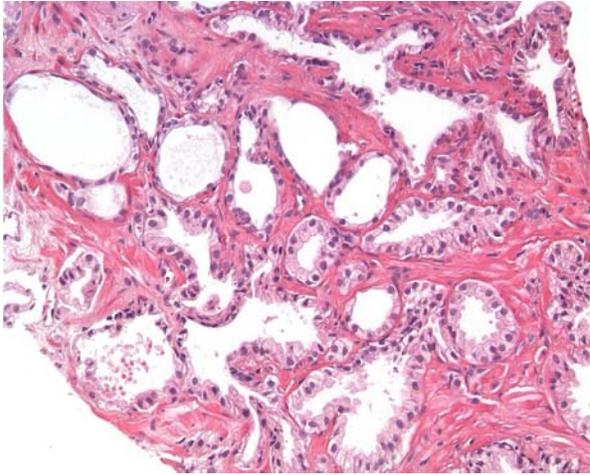


Figura 1. Atrofia parcial (H & E).

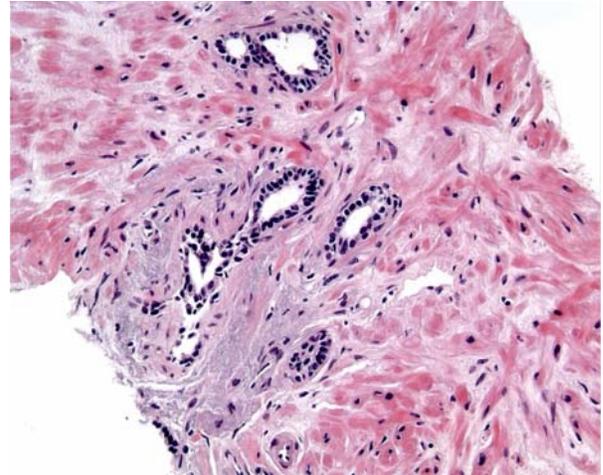


Figura 2. Atrofia simples (H&E).

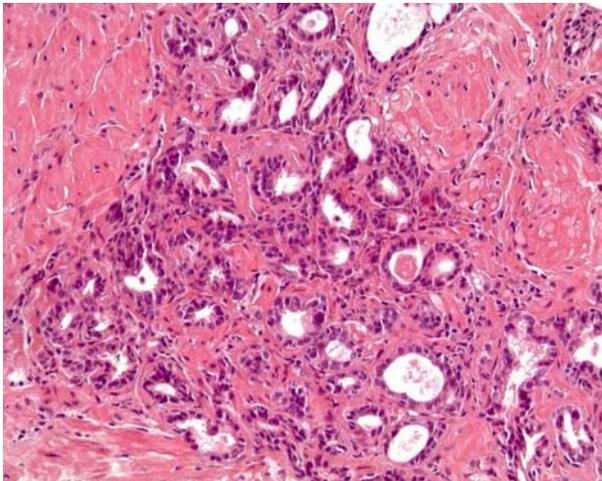


Figura 3. Atrofia hiperplásica

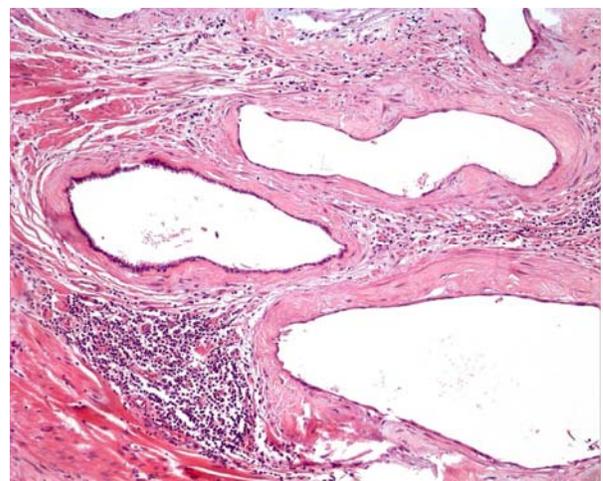


Figura 4. Atrofia esclerosante (H&E).

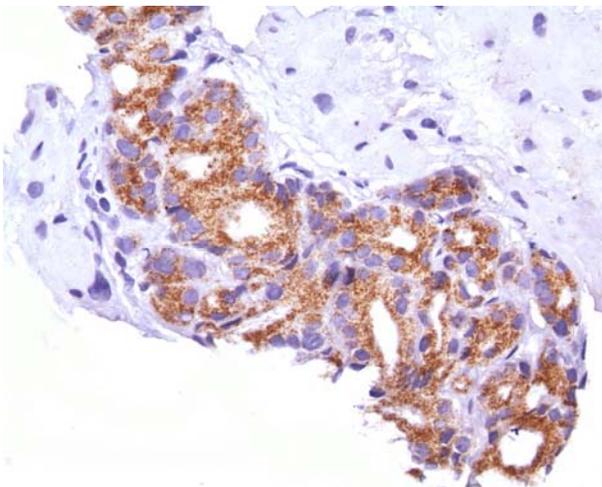


Figura 5. Adenocarcinoma com Imunoexpressão forte difusa para P504S (coquetel P504S + 34βE12).

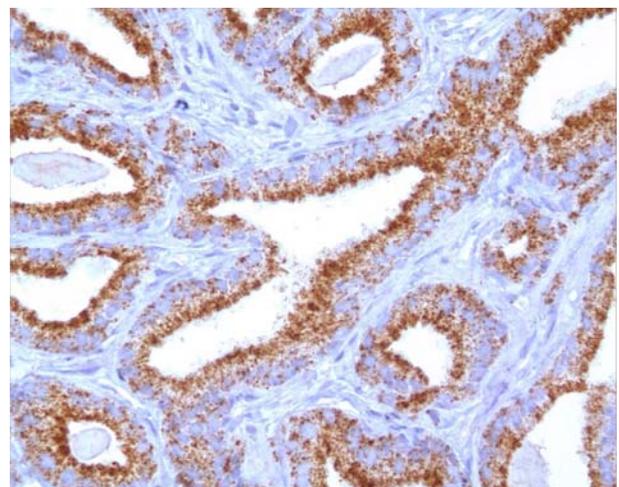


Figura 6. Adenocarcinoma com imunoexpressão forte mista para P504S (coquetel P504S + 34βE12).

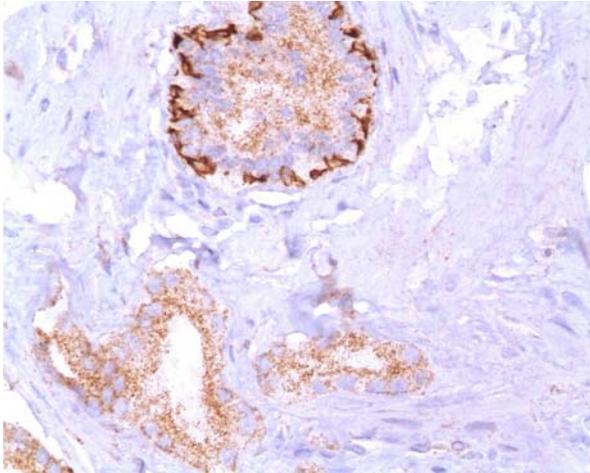


Figura 7. Adenocarcinoma e um ácino normal com imunoexpressão forte difusa para P504S (coquetel P504S+34 β E12).

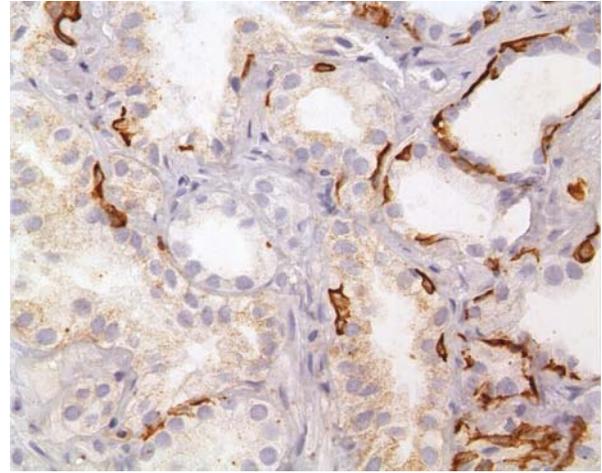


Figura 8. Atrofia parcial com imunoexpressão fraca difusa para P504S (coquetel AMACR + 34 β E12). Padrão de marcação de células basais com 34 β E12 contínuo, descontínuo e ausente.

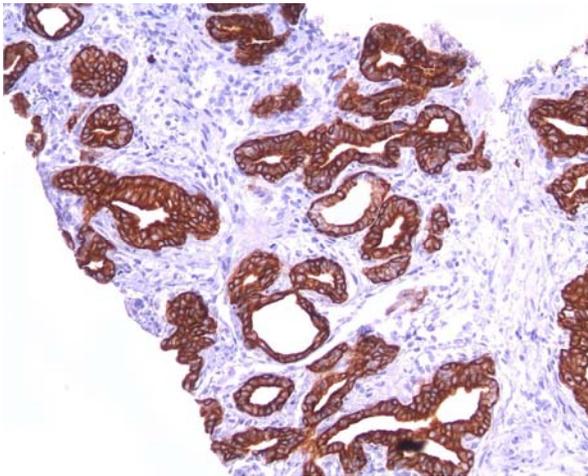


Figura 9. Atrofia hiperplásica (ou hiperplasia pós-atrótica) apresentando aparente marcação em células basais (coquetel P504S + 34 β E12).

Expression of the cocktail AMACR (alpha-methylacyl coenzyme A racemase) + 34 β E12 in partial and complete focal atrophy on prostate needle biopsies

Adriana Worschech, Luciana Meirelles, Athanase Billis

Department of Pathology, School of Medicine, University of Campinas (Unicamp),
Brazil.

Key Words: prostate, atrophy, partial atrophy, needle biopsy, AMACR, P504S, aberrant phenotypic expression, intermediate cells

Abstract: Focal prostatic atrophy is the benign lesion that most frequently mimick adenocarcinoma particularly the partial variant. While the use of immunohistochemistry for basal cells and more recently AMACR (alpha-methylacyl coenzyme A racemase) has aided in the differential diagnosis of prostate cancer, there have also been pitfalls with their use. There are very few studies in the literature describing the behavior of AMACR in focal atrophy. Using the cocktail P504S + 34 β E12 we analysed the immunohistochemical expression in adenocarcinoma, normal, and acini of partial and all variants of complete atrophy. We analysed the intensity and the pattern of expression of AMACR as well as the distribution of basal cells. Adenocarcinoma acini showed weak, or strong expression of AMACR in 73/324 (22.5%), and 251/324 (77.5%) acini, respectively. Normal acini showed negative, weak, or strong expression in 167/213 (78.4%), 33/213 (15.5%), and 13/213 (6.1%) acini, respectively. Partial atrophy showed negative, and weak expression in 143/190 (75.3%), and 47/190(24.7%) acini, respectively. No strong positivity was seen in partial atrophy, however, the weak

positivity seen in approximately 25% of the acini may be a pitfall for the correct interpretation in the differential diagnosis of cancer. Racemase was negative in all acini of simple, postatrophic hyperplasia and sclerosing atrophy, therefore, with no help in the differential diagnosis of adenocarcinoma.

The distribution of basal cells in simple, postatrophic hyperplasia and sclerotic atrophy was discontinuous and the cells of the secretory compartment showed aberrant expression of 34 β E12 suggesting an intermediate phenotype.

INTRODUCTION

Partial atrophy and postatrophic hyperplasia are the benign lesions that most frequently mimic adenocarcinoma. One of the reasons that contributes to the difficulty in distinguishing cancer from partial atrophy is the absence of basal cells in some of the acini. While the use of immunohistochemistry for basal cells and more recently AMACR (alpha-methylacyl coenzyme A racemase) has aided in the differential diagnosis of prostate cancer, there have also been pitfalls with their use. There are very few studies in the literature describing the expression of AMACR in partial or complete atrophy.

Jiang et al.¹⁰ examined by immunocytochemistry for monoclonal P504S antibody a total of 207 cases, including 137 cases of prostate carcinoma and 70 cases of benign prostate, from prostatectomies (n=77), prostate needle biopsies (n=112), and transurethral prostate resections (n=18). P504S showed strong cytoplasmic granular staining in 100% of prostate carcinomas regardless of Gleason scores and diffuse (>75% of tumor) staining in 92% of cases. In contrast, 171 of 194 (88%) of benign prostates, including 56 of 67 (84%) benign prostate cases and 115 of 127 (91%) cases of benign glands adjacent to cancers were negative for P504S. Expression of P504S was not found in basal cell hyperplasia, urothelial cells/metaplasia and small atrophic glands that mimic prostate carcinoma.

Beach et al.¹ stained with P504S monoclonal antibody a total of 366 prostate needle core biopsies from 124 patients with prostate cancer, 10 biopsies from 2 patients without prostate cancer, 28 prostatectomy specimens (16 with specific morphologic patterns, 7 posthormonal therapy and 5 postradiation therapy specimens), 5 bladder specimens with invasive urothelial carcinoma, and a single transurethral resection specimen from a patient with hormonally treated prostate cancer and invasive urothelial carcinoma. A total of 153 of 186 biopsies (82%) with prostatic adenocarcinoma stained for P504S. No staining was encountered in the specific small gland proliferations of postatrophic hyperplasia (n=10), transitional metaplasia (n=17), and basal cell hyperplasia (n=1). Three of 79 (4%) foci of atrophy had focal, faint, and noncircumferential staining.

Rubin et al.¹⁵ using a polyclonal anti-AMACR antibody demonstrated an increased expression of AMACR in malignant prostate epithelia relative to benign epithelia. Tissue microarrays to assess AMACR expression in specimens consisting of benign prostate (n=108 samples), atrophic prostate (n=26), prostatic intraepithelial neoplasia (n=75), localized prostate cancer (n=116), and metastatic prostate cancer (n=17), demonstrated mean AMACR protein staining intensity of 1.31, 2.33, 2.67, 3.20, and 2.50, respectively (p<0.001).

Herawi et al.⁹ studied a total of 567 separate suspected atypical foci from 345 patients received in consultation. The most common mimicker of adenocarcinoma was partial atrophy (203 of 567; 35.8%). Technically adequate immunohistochemistry for basal cells was performed in 117 cases of partial atrophy with patchy or patchy/negative staining seen in 102 of 117 (87%), with the remaining 13% of cases completely negative. A total of 15 of 19 (79%) cases of partial atrophy were positive with AMACR.

Using the cocktail P504S+34βE12 we studied the expression of AMACR in normal, adenocarcinoma, and atrophic acini. Our study includes acini of partial atrophy as well as the variants of complete atrophy.

METHODS

Using the cocktail P504S + 34βE12 we analyzed the immunohistochemical expression of a total of 1198 acini on 74 needle prostatic biopsies from 61 patients corresponding to 324 adenocarcinoma acini, 213 normal acini, 190 partial atrophy, 298 postatrophic hyperplasia, 139 simple atrophy, and 34 sclerosing atrophy.

Prostatic atrophy

Both partial and complete prostatic atrophy were considered. Partial prostatic atrophy was diagnosed according to criteria described by Oppenheimer et al.¹³ Architecturally, consists of crowded glands often with a disorganized growth pattern (Fig.1). In contrast to complete atrophy, which can typically be diagnosed at scanning magnification owing to the presence of well-formed glands with a very basophilic appearance, partial atrophy has pale cytoplasm lateral to the nuclei giving rise to pale staining glands that more closely mimic cancer. The nuclei may be slightly enlarged and irregular with occasional nucleoli. There is scant apical cytoplasm with nuclei extending to the full cell height, pale lateral cytoplasm similar to the cytoplasm seen in adjacent more recognizable benign glands, and luminal undulations as contrasted to the straight luminal borders often seen with malignant glands.

Complete atrophy was diagnosed according to criteria described by Billis⁵. Three histological subtypes were identified: simple atrophy, hyperplastic atrophy (or postatrophic hyperplasia), and sclerotic atrophy.

Simple atrophy usually involves an entire lobule, although isolated acini may be affected (Fig.2). The acini are small showing scant cytoplasm and decrease in the height of the epithelial cells. They may be cystic with flattened epithelium. The surrounding stroma may show fibrosis or elastosis.

Hyperplastic atrophy (or postatrophic hyperplasia) shows small acini closely packed together and lined by atrophic epithelium (Fig.3). In contrast to partial atrophy the cytoplasm is very scant and the nuclei are crowded conferring a basophilic tinge to the lesion. When fibrosis is present in the stroma, the proliferation is irregular and can result in distortion of the acini mimicking infiltrative adenocarcinoma.

Sclerotic atrophy is a peculiar and distinctive lesion (Fig.4). There is simultaneous atrophy of the epithelium and a proliferation of the fibroblasts about the acinus. Continued proliferation results in a fibrohyaline collar frequently associated to elastosis that involves the acinus. With higher degrees of hyalinization the acini dilate, sometimes prominently, and the epithelium becomes extremely flattened and eventually no longer can be identified. In advanced stages the lumen is replaced by loose mesenchyme-like tissue with scattered inflammatory round-cells.

Immunohistochemical stain

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were cut into 3-4 μ m sections, transferred to glass slides, and treated with a solution of Tris-EDTA pH 8.9 for 30 minutes at 95oC in steam cuisine for antigen retrieval before staining. Thesections were incubated with a monoclonal rabbit anti-human P504S (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, CA, USA) at a dilution of 1:100 and monoclonal mouse anti-human high-molecular-weight cytokeratin clone 34 β E12 (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, CA, USA)., Carpinteria, CA) at a dilution of 1:100. Incubation at 37oC for 30 minutes and then overnight in refrigerator. The slides were stained using the visualization systems AdvancedTM HRP Link Enzyme (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, CA, USA). The sections were washed, and incubated with the Advanced Link[®] HRP (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, CA, USA) for 30 minutes at 37o C. The sections were washed, and incubated with Advanced Enzyme[®] HRP (DAKOCYTOMATION, Carpinteria, CA, USA) for 30

minutes at 37o C. The end product was visualized with diaminobenzidine and hydrogen peroxide. The sections were counterstained with hematoxylin.

Expression of AMACR cytoplasmic granularity was considered as negative, weak, or strong according to the background. The pattern of expression was considered diffuse in the cytoplasm of secretory cells (Fig.5), only in the luminal part of the cytoplasm, and mixed whenever was diffuse with luminal accentuation (Fig.6). Basal cells were considered continuous, discontinuous, or absent.

RESULTS

Table 1 shows the P504S expression in adenocarcinoma, normal, and partial, simple, hyperplastic, and sclerosing atrophic acini. Adenocarcinoma acini showed weak, or strong (Figs. 5 and 6) expression of AMACR in 73/324 (22.5%), and 251/324 (77.5%) acini, respectively. Normal acini showed negative, weak, or strong (Fig.7) expression in 167/213 (78.4%), 33/213 (15.5%), and 13/213 (6.1%) acini, respectively. Partial atrophy showed negative, and weak (Fig.8) expression in 143/190 (75.3%), and 47/190(24.7%) acini, respectively. Racemase was negative in all acini of simple, hyperplastic (or postatrophic hyperplasia) (Fig.9) and sclerosing atrophy.

Tables 2 and 3 show the pattern of expression of P504S. The pattern of expression with weak racemase positivity was diffuse, luminal, and mixed in 28 (38.4%), 45 (61.6%), and 0 (0%) adenocarcinoma acini, respectively; 26 (78.8%), 5 (15.2%), and 2 (6%) normal acini, respectively; and, 20 (42.6%), 2 (4.2%), and 25 (53.2%) partial atrophy, respectively. The pattern of expression with strong racemase positivity was diffuse, luminal, and mixed in 34 (13.5%), 26 (10.4%), and 191 (76.1%) adenocarcinoma acini, respectively; 6 (46.2%), 7 (53.8%) and 0 (0%) normal acini, respectively; and no expression of strong racemase positivity was seen in partial atrophy.

The distribution of basal cells in partial atrophy was continuous, discontinuous, and absent (Fig.8) in 42/190 (22.1%), 104/190 (54.7%), and 44/190 (23.2%) acini, respectively. The distribution of basal cells in normal acini was either continuous (Fig.7) or discontinuous; in simple, postatrophic hyperplasia and sclerotic atrophy was descontinuous (Fig.11).

DISCUSSION

Prostatic atrophy is one of the most frequent mimickers of prostatic adenocarcinoma. It occurs most frequently in the posterior lobe or peripheral zone and gained importance with the increasing use of needle biopsies for the detection of prostatic carcinoma. Moore¹², in 1936, was one of the first authors to describe prostatic atrophy in a systematic autopsy study. It is a frequent lesion: 85% in autopsies and 83.7% on needle biopsies.² The nomenclature of prostatic atrophy is cumbersome and confusing. Moore¹² classified prostatic atrophy into *simple acinar atrophy* and *sclerotic atrophy*. Franks⁸ added to simple acinar atrophy and sclerotic atrophy a lesion that he called *postatrophic hyperplasia*. In a number of cases the atrophic epithelium of the prostate proper underwent hyperplastic change. The hyperplasia might involve areas which had undergone either simple or sclerotic atrophy and in both cases there was budding of epithelium from the atrophic acini or ducts. When hyperplasia followed simple acinar atrophy, it was called *lobular hyperplasia* by the author. It usually involved the whole gland lobule. A central duct or alveolus, generally elongated and often showing some cystic change, was surrounded by newly formed acini. Sclerotic atrophy with hyperplasia was called *postsclerotic hyperplasia*. Since the first studies, the authors described similar morphologic entities with different names.

In a working group classification,⁷ four subtypes of focal atrophy were considered: simple atrophy, simple atrophy with cyst formation, postatrophic hyperplasia, and partial atrophy. In an autopsy study 3 subtypes of complete focal atrophy were considered: simple atrophy, hyperplastic atrophy (or postatrophic

hyperplasia), and sclerotic atrophy.⁵ Focal atrophy is in contrast to diffuse atrophy which is seen secondary to radiotherapy and/or endocrine therapy. Complete or fully developed atrophy is in contrast to partial atrophy.

Most of the times, more than one subtype of atrophy may be seen on a needle biopsy including mixed lesions. A frequent mixed lesion consists of small acini of hyperplastic atrophy budding from a central located sclerotic atrophy. This supports the hypothesis that prostatic atrophy is a morphologic continuum and that hyperplastic type (or postatrophic hyperplasia) seems to be at the extreme end of this morphologic continuum. The hyperplastic small acini seem to represent a regenerative process. A high cell proliferation using immunohistochemistry seems to support this hypothesis.¹⁶ It is not established any possible relation of partial atrophy to complete atrophy.

There are some findings associated with the etiopathogenesis of the lesion. Atrophy is clearly associated to advanced age.^{5,12} Radiotherapy and/or hormonal deprivation are associated with diffuse atrophy. Inactive or active inflammation is a frequent cause for the lesion. Based on a study on autopsies there is evidence that chronic local ischemia may be a cause of atrophy.⁵ However, many examples of atrophy are still considered idiopathic in nature. Both inflammation and ischemia are associated with focal forms of atrophy.

The relation of prostatic atrophy to neoplasia is exciting and controversial. De Marzo et al.⁶ suggest that proliferative inflammatory atrophy may indeed give rise to carcinoma directly or that proliferative atrophy may lead to carcinoma indirectly via development into high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN). Other studies are at odds with this hypothesis.^{3,14} A recent and provocative finding was a positive and significant association between the extent of atrophy and the total or free serum prostate-specific antigen (PSA) elevation.⁴

In our study adenocarcinoma acini showed weak, or strong expression of P504S in 73/324 (22.5%), and 251/324 (77.5%) acini, respectively; normal acini showed negative, weak, or strong expression in 167/213 (78.4%), 33/213 (15.5%), and 13/213 (6.1%) acini, respectively; and foci of partial atrophy showed negative,

and weak expression in 143/190 (75.3%), and 47/190 (24.7%) acini, respectively. No acini in partial atrophy showed strong expression, however, the weak positivity seen in approximately 25% of the acini may be a pitfall for the correct interpretation. Furthermore, normal acini may show strong expression of AMACR in approximately 5% of the acini.

The variant of focal prostatic atrophy that most frequently causes difficulty in the differential diagnosis with adenocarcinoma of the prostate is partial atrophy (Fig.1). This lesion was reported in the periodic literature in 1998.¹³ Characteristically the basal cells are discontinuous and in some acini may be absent. An additional factor that contributes to the difficulty in distinguishing cancer from partial atrophy is the positivity for AMACR in some acini. Studying consultation cases, Herawi et al.⁹ found that 15/19 (79%) cases of partial atrophy were positive with AMACR. According to the authors, this high frequency of positivity may be explained by the fact that the slides were stained in a variety of institutions with varying techniques and antibodies. In our study, 24.7% partial atrophy acini showed weak positivity for AMACR.

Previous studies have not described the expression of AMACR in the several variants of atrophy.^{1,9,10,15} Our study is the only one that studied the expression of AMACR in partial and complete atrophy including all subtypes of the latter. Racemase expression is negative in simple, hyperplastic (or postatrophic hyperplasia), and sclerosing atrophy. Therefore, for the differential diagnosis with adenocarcinoma in difficult cases, racemase is of no help. The staining of basal cells is the main aid in these cases.

Using the cocktail P504S + 34 β E12 in cases of simple, hyperplastic, and sclerosing atrophy, we were surprised with an apparent presence of only basal cells (Fig. 10). However, staining with only p63 showed that there was a discontinuous layer of basal cells with a continuous layer of p63 negative cells in the secretory compartment (Fig. 11). van Leenders et al.¹⁷ found that many of the atrophic epithelial luminal cells in proliferative inflammatory atrophy are intermediate cells. This conclusion was based in part on the finding in these cells of weak expression of PSA and androgen receptor, high levels of cytokeratin 8/18,

and lack of p63. According to the authors, the finding of a large number of highly proliferating intermediate cells in proliferative inflammatory atrophy, provides further support that these cells may serve as preferred target cells in prostate carcinogenesis. It is worth mentioning that this aberrant phenotypic expression of the secretory compartment is also seen in atrophic prostate acini in castrated dogs suggesting a pluripotentiality of response to sex hormones.¹¹

In summary, adenocarcinoma acini showed weak, or strong expression of AMACR in 73/324 (22.5%), and 251/324 (77.5%) acini, respectively and normal acini showed negative, weak, or strong expression in 167/213 (78.4%), 33/213 (15.5%), and 13/213 (6.1%) acini, respectively. Partial atrophy showed negative, and weak expression in 143/190 (75.3%), and 47/190(24.7%) acini, respectively. No strong positivity was seen in partial atrophy, however, the weak positivity seen in approximately 25% of the acini may be a pitfall for the correct interpretation in the differential diagnosis of cancer. Racemase was negative in all acini of simple, postatrophic hyperplasia and sclerosing atrophy. Therefore, for the differential diagnosis with adenocarcinoma in difficult cases, racemase is of no help. The staining of basal cells is the main aid in these cases. The distribution of basal cells in simple, postatrophic hyperplasia and sclerotic atrophy was discontinuous and the cells of the secretory compartment showed aberrant expression of 34 β E12 suggesting an intermediate phenotype.

REFERENCES

1. Beach R, Gown AM, de Peralta-Venturina MN et al. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:1588-1596.
2. Billis A, Freitas LLL, Magna LA, et al.: Inflammatory atrophy on prostate needle biopsies: Is there topographic relationship to cancer? *Int Braz J Urol.* 2007;33:355-363.
3. Billis A, Magna LA: Inflammatory atrophy of the prostate. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:840-844.
4. Billis A, Meirelles LR, Magna LA, et al.: Extent of prostatic atrophy in needle biopsies and serum PSA levels: is there an association? *Urology.* 2007;69:927-930.
5. Billis A. Prostatic atrophy: An autopsy study of a histologic mimic of adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 1998;11:47-54.
6. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, et al.: Proliferative inflammatory atrophy of the prostate. Implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999;155:1985-92.
7. De Marzo AM, Platz EA, Epstein JI et al.: A working group classification of focal prostate atrophy lesions. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:1281-1291.
8. Franks LM: Atrophy and hyperplasia in the prostate proper. *J Pathol Bacteriol.* 1954;68:617-621.
9. Herawi M, Parwani A, Irie J et al. Small glandular proliferations on needle biopsies: Most common benign mimickers of prostatic adenocarcinoma sent in for expert second opinion. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:874-880.
10. Jiang Z, Woda BA, Rock KL et al. P504S: A new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:1397-1404.
11. Merk FB, Warhol MJ, Kwan PWL et al. Multiple phenotypes of prostatic glandular cells in castrated dogs after individual or combined treatment with

androgen and estrogen. Morphometric, ultrastructural, and cytochemical distinctions. *Lab Invest.* 1986;54:442-456.

12. Moore RA: The evolution and involution of the prostate gland. *Am J Pathol.* 1936;12:599-624.

13. Oppenheimer JR, Wills ML, Epstein JI. Partial atrophy in prostate needle cores: another diagnostic pitfall for the surgical pathologist. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:440-445.

14. Postma R, Schröder FH, van der Kwast TH: Atrophy in prostate needle biopsy cores and its relationship to prostate cancer incidence in screened men. *Urology.* 2005;65:745-749.

15. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM. α -Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA.* 2002;287:1662-1670.

16. Ruska KM, Sauvageot J, Epstein JI. Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:1073-1077.

17. Van Leenders GJLH, Gage WR, Hicks JL et al. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol.* 2003;162:1529-1537.

LEGENDS FOR THE FIGURES

FIGURE 1. Partial atrophy (H & E).

FIGURE 2. Simple atrophy (H & E).

FIGURE 3. Hyperplastic (or postatrophic hyperplasia) atrophy (H & E).

FIGURE 4. Sclerosing atrophy (H & E).

FIGURE 5. Adenocarcinoma acini with strong diffuse AMACR expression (cocktail P504S + 34 β E12).

FIGURE 6. Adenocarcinoma acini with strong mixed AMACR expression (cocktail P504S + 34 β E12).

FIGURE 7. Adenocarcinoma acini and one normal acinus with strong diffuse AMACR expression (cocktail P504S + 34 β E12).

FIGURE 8. Partial atrophy. Weak diffuse AMACR expression. The acini show either continuous, discontinuous or absent basal cells (cocktail AMACR + 34 β E12).

FIGURE 9. Hyperplastic (or postatrophic hyperplasia) atrophy negative for AMACR expression (P504S).

FIGURE 10. Hyperplastic (or postatrophic hyperplasia) atrophy showing apparently only basal cells (34 β E12).

FIGURE 11. Hyperplastic (or postatrophic hyperplasia) atrophy showing discontinuous basal cells p63 positive. Cells in the secretory compartment are p63 negative.

TABLE 1. *Expression of P504S in adenocarcinoma, normal, and partial, simple, hyperplastic (or postatrophic hyperplasia), and sclerosing atrophic acini.*

	Negative No. (%)	Weak No. (%)	Strong No. (%)
Adenocarcinoma acini	0 (0)	73 (22.5)	251 (77.5)
Normal acini	167 (78.4)	33 (15.5)	13 (6.1)
Partial atrophy acini	143 (75.3)	47 (24.7)	0 (0)
Simple atrophy acini	139 (100)	0 (0)	0 (0)
Hyperplastic atrophy acini	298 (100)	0 (0)	0 (0)
Sclerosing atrophy acini	34 (100)	0 (0)	0 (0)

TABLE 2. *Pattern of expression in acini with weak P504S positivity.*

	Diffuse No. (%)	Luminal No. (%)	Mixed No. (%)
Adenocarcinoma acini	28 (38.4)	45 (61.6)	0 (0)
Normal acini	26 (78.8)	5 (15.2)	2 (6)
Partial atrophy acini	20 (42.6)	2 (4.2)	25 (53.2)

TABLE 3. *Pattern of expression in acini with strong P504S positivity.*

	Diffuse No. (%)	Luminal No. (%)	Mixed No. (%)
Adenocarcinoma acini	34 (13.5)	26 (10.4)	191 (76.1)
Normal acini	6 (46.2)	7(53.8)	0 (0)
Partial atrophy acini	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Figure 1

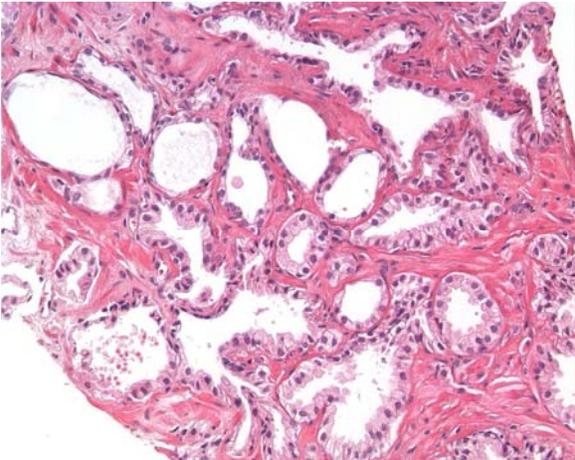


Figure 2

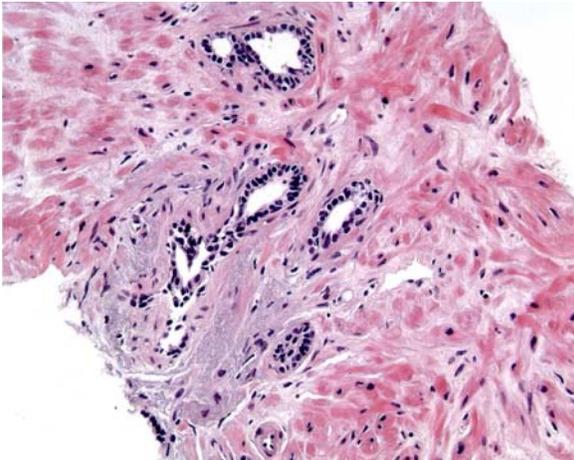


Figure 3

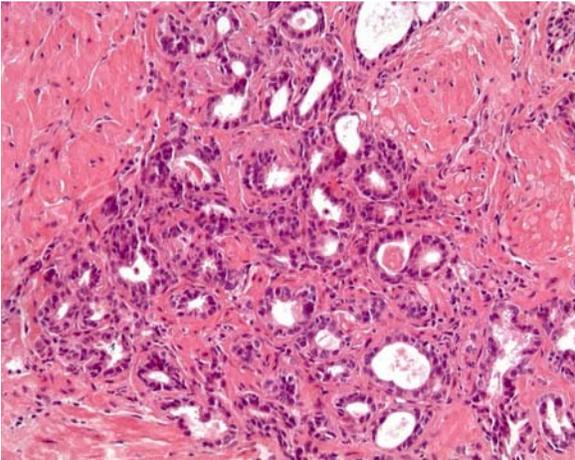


Figure 4

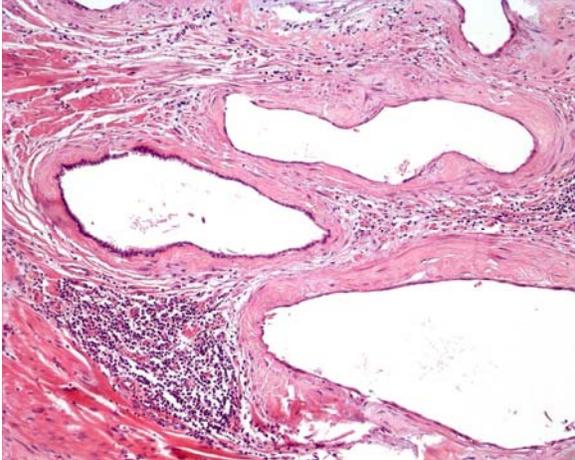


Figure 5

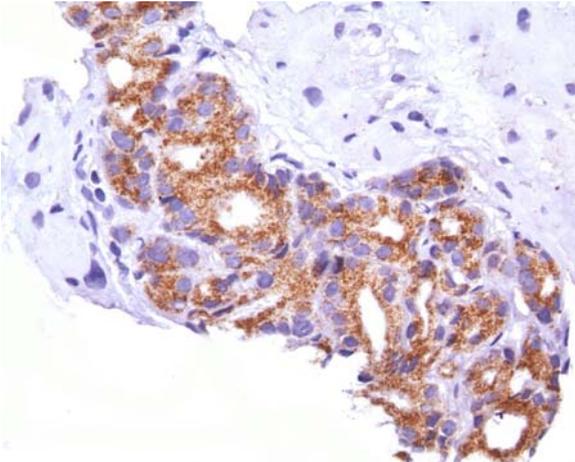


Figure 6

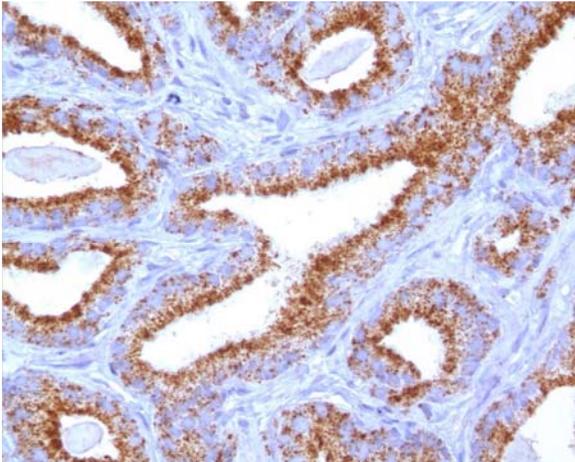


Figure 7

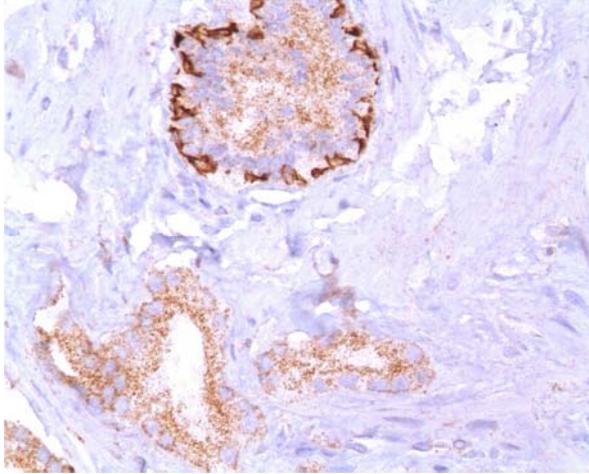


Figure 8

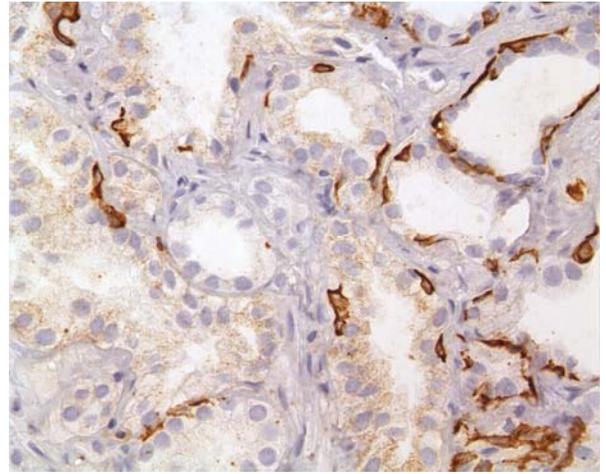


Figure 9

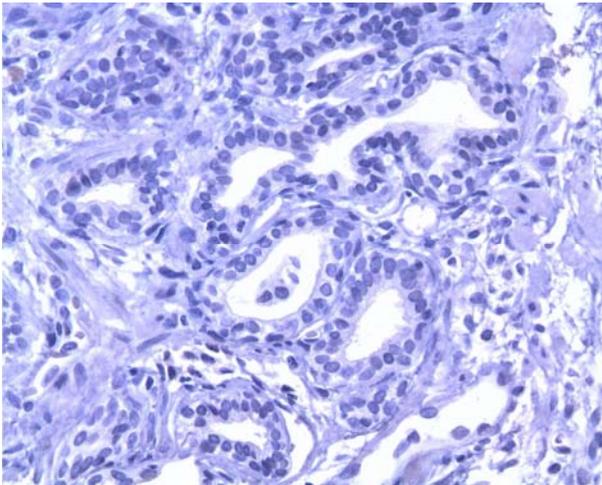


Figure 10

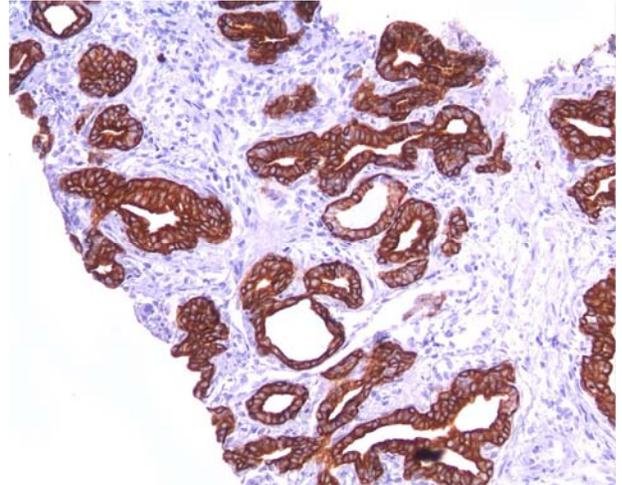


Figure 11

