

Marco Aurelio Watanabe Yorioka

**O emprego da fusão TMPRSS2:ERG e da deleção do PTEN
como biomarcadores de prognóstico no manejo
do câncer de próstata de muito baixo risco em vigilância ativa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Dr. José Pontes Junior

São Paulo

2023

Marco Aurelio Watanabe Yorioka

**O emprego da fusão TMPRSS2:ERG e da deleção do PTEN
como biomarcadores de prognóstico no manejo
do câncer de próstata de muito baixo risco em vigilância ativa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Dr. José Pontes Junior

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Yorioka, Marco Aurelio Watanabe
O emprego da fusão TMRSS2:ERG e da deleção do
PTEN como biomarcadores de prognóstico no manejo do
câncer de próstata de muito baixo risco em vigilância
ativa / Marco Aurelio Watanabe Yorioka. -- São
Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.
Orientador: José Pontes Junior.

Descritores: 1.Biomarcadores tumorais
2.Neoplasias da próstata 3.Condução expectante
4.Imuno-histoquímica

USP/FM/DBD-181/23

Responsável: Erivalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Viviane, inestimável companheira que me apoia em todos os momentos e não mede esforços para nosso bem-estar. Te amo profundamente.

Aos meus pais Mario (*in memoriam*) e Fumie, que sempre priorizaram a formação de seus filhos com base no amor, educação, honestidade e humildade. O que sou hoje, devo tudo a vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e seus familiares, que mesmo em momento frágil e de sofrimento, aceitaram participar deste estudo.

Ao Dr. José Pontes Junior, um mestre e amigo que sempre me incentivou, ensinou e orientou neste projeto e também em toda minha carreira urológica. Seu esplendor científico é incomparável. Não possuo palavras para agradecer.

Ao Prof. Dr. William Carlos Nahas, um líder nato que em todos os momentos me apoiou na realização desta tese, além de me acolher com carinho na Disciplina de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Aos Drs. Leonardo Cardili, Publio Viana e colega Aline K. Assato, fundamentais para a execução deste trabalho e cujos conhecimentos elevaram a qualidade final da tese.

Aos membros da Banca de Qualificação: Prof. Dra. Katia Ramos Moreira Leite, Prof. Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, Prof. Dra. Marcia Saldanha Kubrusly e Dr. Daher Cezar Chade, cujas correções e sugestões propiciaram melhoria nesta tese.

Às enfermeiras Sanarely Pires Adonias Borges de Queiroz e Renata Soares Martins, por todo auxílio técnico e com os pacientes do estudo.

À Dra. Ines Nobuko Nishimoto, por toda orientação e ajuda com as análises estatísticas.

À Elisa de Arruda Cruz, secretária da Pós-Graduação, pelo grande suporte nas tarefas burocráticas e documentais.

À minha família, sempre presente nos momentos de alegria e infortúnios.

Aos meus amigos e colegas urologistas, que com seus vastos conhecimentos e nossa vivência diária ajudaram indireta e diretamente nesta tese.

*“Temos de fazer o melhor que podemos.
Esta é a nossa sagrada responsabilidade
humana.”*

Albert Einstein

Normalização

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Câncer de próstata	2
1.2 Vigilância ativa	5
1.3 Marcadores moleculares	8
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo primário	15
2.2 Objetivo secundário	15
3 MÉTODOS	17
3.1 Pacientes e amostras	17
3.2 Série de pacientes em vigilância ativa	17
3.2.1 Critérios de inclusão	17
3.2.2 Critérios de exclusão	18
3.3 Série de candidatos à vigilância ativa e tratados com cirurgia	19
3.3.1 Critérios de inclusão	19
3.3.2 Critérios de exclusão	20
3.4 Análise da expressão das proteínas ERG e PTEN por IH	20
3.5 Correlação prognóstica da fusão TMPRSS2:ERG e da perda do PTEN no câncer de próstata de muito baixo risco	26
3.5.1 Série de vigilância ativa	26
3.5.2 Série de candidatos à vigilância ativa e tratados com cirurgia	28
3.6 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	31
4.1 Série de pacientes em vigilância ativa	31
4.1.1 Características clínico-demográficas e seguimento	31
4.1.2 Imunoexpressões de ERG e PTEN em biópsia e espécime cirúrgico na série de vigilância ativa	35
4.1.3 Correlação da imunoexpressão de ERG em biópsia com os critérios de progressão e os fatores prognósticos na série de vigilância ativa	36
4.1.4 Correlação da imunoexpressão de ERG no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos na série de vigilância ativa	38
4.1.5 Correlação da imunoexpressão de PTEN em biópsia com os critérios de progressão e os fatores prognósticos na série de vigilância ativa	39
4.1.6 Correlação da imunoexpressão de PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos na série de vigilância ativa	41
4.1.7 Avaliação conjunta da imunoexpressão de ERG e PTEN em biópsia com os critérios de progressão e fatores prognósticos na série de vigilância ativa	42
4.1.8 Avaliação conjunta da imunoexpressão de ERG e PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos na série de vigilância ativa	45

4.1.9	Análise univariada e multivariada dos preditores de progressão por escore de Gleason na série de vigilância ativa	46
4.1.10	Sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com as imunexpressões de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico de pacientes com progressão e tratados na série de vigilância ativa	49
4.1.11	Correlação entre a imunexpressão do ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico na série de vigilância ativa	55
4.2	Série de candidatos à vigilância ativa e tratados com cirurgia	56
4.2.1	Características clínico-demográficas, seguimento e imunexpressões de ERG e PTEN na série de pacientes tratados com cirurgia	56
4.2.2	Correlações da imunexpressão de ERG e PTEN em biópsia com os fatores prognósticos patológicos na série de pacientes tratados com cirurgia.....	58
4.2.3	Correlações da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia com os fatores prognósticos patológicos na série de pacientes tratados com cirurgia.....	59
4.2.4	Correlações da imunexpressão de ERG e PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos na série de pacientes tratados com cirurgia.....	61
4.2.5	Correlações da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos na série de pacientes tratados com cirurgia.....	62
4.2.6	Sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com as imunexpressões de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico na série de pacientes tratados com cirurgia.....	64
4.2.7	Correlação entre a imunexpressão de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico na série de pacientes tratados com cirurgia.....	70
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES	85
7	ANEXOS	87
8	REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICE		

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bx	Biópsia
CaP	Câncer de Próstata
CAPRA	<i>Cancer of the Prostate Risk Assessment</i>
EUA	Estados Unidos da América
ERG	<i>ETS-Related Gene</i>
ETS	<i>Erythroblast transformation-specific</i>
FISH	Fluorescência por Hibridização in situ
GG	Grupo de Grau
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H&E	Hematoxilina e Eosina
IC	Intervalo de Confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IH	Imuno-histoquímica
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
MSKCC	<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
MDT	Máximo Diâmetro Tumoral
OR	<i>Odds Ratio</i>
PASS	<i>Canary Prostate Active Surveillance Study</i>
PCA3	Gene 3 do Câncer de Próstata
PI-RADS	<i>Prostate Imaging Reporting and Data System</i>
PR	Prostatectomia Radical
PRIAS	<i>Prostate Cancer Research Internacional Active Surveillance</i>
PSA	Antígeno Prostático Específico
PSAd	Densidade de PSA
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homologue on chromosome 10</i>

RB	Recidiva Bioquímica
RDT	Radioterapia Externa
Ref.	Valor de referência
RM	Ressonância Magnética Multiparamétrica de próstata
RT-PCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
SLRB	Sobrevida Livre de Recidiva Bioquímica
SPINK1	<i>Serine Peptidase Inhibitor, Kazal type 1</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TMPRSS2	<i>Transmembrane Protease Serine 2</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
VA	Vigilância Ativa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínico-demográficas dos pacientes em VA	31
Tabela 2 – Características das biópsias no protocolo de VA.....	32
Tabela 3 – Seguimento durante VA	33
Tabela 4 – Imunoexpressão de ERG e PTEN em biópsia, em 101 pacientes em VA.....	36
Tabela 5 – Imunoexpressão de ERG e PTEN no espécime cirúrgico, em 51 pacientes operados na série de VA	36
Tabela 6 – Correlação da imunoexpressão de ERG em biópsia de acordo com os critérios de progressão durante a VA em 96 pacientes.....	37
Tabela 7 – Correlação da imunoexpressão de ERG em biópsia de acordo com escore de PI-RADS durante a VA em 96 pacientes.....	37
Tabela 8 – Correlação da imunoexpressão de ERG em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 50 pacientes operados durante a VA	38
Tabela 9 – Correlação da imunoexpressão de ERG no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 51 pacientes operados durante a VA.....	39
Tabela 10 – Correlação da imunoexpressão de PTEN em biópsia de acordo com os critérios de progressão durante a VA em 95 pacientes.....	40
Tabela 11 – Correlação da imunoexpressão de PTEN em biópsia de acordo com escore de PI-RADS durante a VA em 95 pacientes.....	40
Tabela 12 – Correlação da imunoexpressão de PTEN em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 49 pacientes operados durante a VA	41
Tabela 13 – Correlação da imunoexpressão de PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 51 pacientes operados durante a VA.....	42
Tabela 14 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de acordo com os critérios de progressão e escore de PI-RADS em 95 pacientes durante a VA	43
Tabela 15 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG negativo e PTEN positivo em biópsia com os critérios de progressão em 95 pacientes durante a VA	44
Tabela 16 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG negativo e PTEN positivo em biópsia com escore de PI-RADS em 95 pacientes durante a VA	44
Tabela 17 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de acordo com os fatores prognósticos patológicos de 49 pacientes operados durante a VA.....	45
Tabela 18 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico de acordo com os fatores prognósticos patológicos de 51 pacientes operados durante a VA	46
Tabela 19 – Modelo de regressão logística univariado dos fatores preditores de progressão por escore de Gleason na série de 101 pacientes em VA.....	47
Tabela 20 – Modelo de regressão logística multivariado dos fatores preditores de progressão por escore de Gleason na série de 101 pacientes em VA	48

Tabela 21 – Modelo de regressão logística multivariado dos fatores de progressão por escore de Gleason, com exclusão do escore de PI-RADS, na série de 101 pacientes em VA	48
Tabela 22 – Probabilidade de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos nos pacientes tratados na série de VA de acordo com a imunexpressão de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico.....	50
Tabela 23 – Correlação da imunexpressão positiva de ERG com a imunexpressão negativa de PTEN em biópsia (N=95) e no espécime cirúrgico (N=51) de pacientes durante a VA	55
Tabela 24 – Características clínico-demográficas dos 109 pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR.....	56
Tabela 25 – Imunoexpressões de ERG e PTEN em 89 biópsias, na série de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR	57
Tabela 26 – Imunoexpressões de ERG e PTEN em 93 espécimes cirúrgicos, na série de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR.....	57
Tabela 27 – Correlação da imunexpressão de ERG em biópsia com os fatores prognósticos patológicos do espécime cirúrgico em 83 pacientes tratados com PR.....	58
Tabela 28 – Correlação da imunexpressão de PTEN em biópsia com os fatores prognósticos patológicos do espécime cirúrgico em 68 pacientes tratados com PR.....	59
Tabela 29 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de acordo com os fatores prognósticos patológicos do espécime cirúrgico em 68 pacientes tratados com PR	60
Tabela 30 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG negativo e PTEN positivo em biópsia com os fatores prognósticos patológicos do espécime cirúrgico em 68 pacientes tratados com PR.....	60
Tabela 31 – Correlação da imunexpressão de ERG no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR.....	61
Tabela 32 – Correlação da imunexpressão de PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR.....	62
Tabela 33 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico de acordo com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR.....	63
Tabela 34 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN positivos no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR	63
Tabela 35 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN negativos no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR	64
Tabela 36 – Probabilidade de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos de acordo com a imunexpressão de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico nos pacientes tratados com PR	65
Tabela 37 – Correlação da imunexpressão positiva de ERG com a imunexpressão negativa de PTEN em biópsia (N=68) e no espécime cirúrgico (N=93) nos pacientes tratados com PR.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – TMA evidenciando <i>spot</i> tumoral de CaP Gleason 6. A) Vista panorâmica do TMA exibindo <i>spots</i> tumorais e não tumorais. H&E, 20x. B) <i>Spot</i> tumoral contendo cerca de 40% de carga tumoral representada por Gleason padrão 6(3+3). H&E, 40x. C) Detalhe do mesmo <i>spot</i> tumoral anterior H&E, 100x.	22
Figura 2 – Etapas da confecção do TMA.	23
Figura 3 – Amostragem e inclusão no bloco receptor.	24
Figura 4 – Bloco receptor do TMA contendo os cilindros com as amostras do tecido a ser estudado.	24
Figura 5 – Expressão de ERG por IH de espécime cirúrgico e biópsia prostática. A) Exemplo de expressão nuclear positiva de ERG por IH em <i>spot</i> com amostra tumoral de espécime cirúrgico em TMA (Gleason 3+3). Imunoperoxidase, 40x. B) Detalhe do <i>spot</i> tumoral do caso anterior. Imunoperoxidase, 100x. C) Expressão positiva de ERG por IH em amostra de biópsia prostática por agulha. Imunoperoxidase, 400x.	25
Figura 6 – Expressão de PTEN por IH em biópsia prostática. A) Amostra tumoral (Gleason 3+3) apresentando perda da imunoexpressão nuclear de PTEN. Podemos observar o contraste com o filete nervoso (controle interno) circundado por tumor. Imunoperoxidase, 100x. B) Detalhe do caso A. Imunoperoxidase, 400x. C) Contraste da neoplasia com os elementos estromais e a perda de expressão do PTEN. Imunoperoxidase, 200x.	26
Figura 7 – Progressão geral e por escore de Gleason durante Vigilância Ativa em 101 pacientes com CaP de muito baixo risco	35
Figura 8 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de pacientes tratados com PR ou RDT durante a VA (N=72).....	49
Figura 9 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunoexpressão de ERG em biópsia de pacientes tratados com PR ou RDT durante a VA (N=71)	51
Figura 10 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunoexpressão de ERG no espécime cirúrgico de pacientes tratados com PR durante a VA (N=51).....	52
Figura 11 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunoexpressão de PTEN em biópsia de pacientes tratados com PR ou RDT durante a VA (N=70)	52
Figura 12 – Curva Kaplan Meier de de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão de PTEN no espécime cirúrgico de pacientes tratados com PR durante a VA (N=51).....	53
Figura 13 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de pacientes tratados com PR ou RDT durante a VA (N=70).....	54
Figura 14 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico de pacientes tratados com PR durante a VA (N=51)	55
Figura 15 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=109)	64

Figura 16 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão de ERG em biópsia de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=83).....	66
Figura 17 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão de PTEN em biópsia de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=68).....	67
Figura 18 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=68)	68
Figura 19 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão de ERG no espécime cirúrgico de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=93).....	68
Figura 20 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão de PTEN no espécime cirúrgico de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=93).....	69
Figura 21 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=93)	70

RESUMO

Yorioka MAW. O emprego da fusão TMPRSS2:ERG e da deleção do PTEN como biomarcadores de prognóstico no manejo do câncer de próstata de muito baixo risco em vigilância ativa [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: A vigilância ativa (VA) é uma opção terapêutica para o câncer de próstata (CaP) de baixo risco no entanto cerca de 40% dos pacientes progridem durante o seguimento; e até o momento não existem marcadores validados que identifiquem previamente com boa acurácia os pacientes com maior chance de progressão. O objetivo foi correlacionar as expressões de ERG e PTEN em biópsia de próstata por imuno-histoquímica (IH) com a chance de progressão e o prognóstico de pacientes com CaP de muito baixo risco em protocolo de VA. **MÉTODOS:** Avaliamos retrospectivamente 120 pacientes com diagnóstico de CaP de muito baixo risco em protocolo de VA em nossa instituição entre 2013 e 2018. Correlacionamos a expressão proteica por IH de PTEN e ERG na biópsia representativa do CaP ISUP I com a chance de progressão durante a vigilância, com os fatores clássicos de prognóstico e com o escore PI-RADS da ressonância magnética. A progressão foi estabelecida pela progressão histopatológica na rebiópsia, definida por aumento do escore de Gleason ≥ 7 ou elevação do PSA acima de 10 ng/mL ou mais de 3 fragmentos positivos ou mais de 50% de acometimento de um fragmento. Nos pacientes com progressão e tratados com cirurgia correlacionamos a expressão dos marcadores em biópsia e espécime cirúrgico dispostos em *tissue microarray* com a sobrevida livre de recidiva bioquímica (SLRB). Em outra coorte de 109 pacientes com CaP de muito baixo risco e candidatos a VA, mas que foram tratados diretamente com cirurgia em nosso serviço, correlacionamos a expressão dos mesmos marcadores na biópsia e no espécime cirúrgico com os fatores de prognóstico e com a SLRB. **RESULTADOS:** Dos 120 pacientes iniciais da série de VA, 101 foram avaliados e 81 (80%) apresentaram progressão durante seguimento médio de 4,1 anos. O principal critério de progressão foi o aumento do escore de Gleason ≥ 7 , em 59 casos (72,8%). Dos 72 pacientes tratados com cirurgia ou radioterapia, 7 apresentaram recidiva bioquímica no seguimento médio de 39,7 meses. Observamos na biópsia expressão positiva de ERG em 38 casos (39,6%) e expressão negativa de PTEN em 12 (12,6%). Perda da expressão de PTEN na biópsia foi associada a maior chance de progressão por aumento do escore de Gleason ≥ 7 (OR=9,750, IC95%=1,203-78,987, $p=0,011$). A expressão positiva de ERG na biópsia esteve associada a PI-RADS ≥ 4 durante a VA (OR=2,841, IC95%=1,113-7,252, $p=0,026$); enquanto que a expressão negativa de ERG com expressão positiva de PTEN na biópsia associou-se a menor chance de PI-RADS ≥ 4 (OR=0,313, IC95%=0,125-0,783, $p=0,011$). Aumento da porcentagem de fragmentos acometidos e escore de PI-RADS ≥ 4 foram fatores preditores independentes para progressão por escore de Gleason durante a VA (OR=4,78, IC95%=1,21-18,84, $p=0,001$ e OR=17,76, IC95%=5,93-53,23, $p<0,001$, respectivamente). Na

coorte de 109 pacientes com CaP de muito baixo risco e tratados com cirurgia, analisamos a expressão de ERG e PTEN na biópsia em 89 casos, sendo observado expressão positiva de ERG em 16 casos (19,3%) e expressão negativa de PTEN em 5 pacientes (7,4%). Em 49 meses de seguimento médio, 7 pacientes apresentaram recidiva bioquímica. A expressão positiva de ERG na biópsia esteve associada a pior SLRB em 5 anos (71,4% vs. 93,9%, $p=0,002$). A co-expressão positiva de ERG e PTEN na biópsia associou-se também a pior SLRB (68,4% vs. 92,8% em 5 anos, $p=0,004$). No espécime cirúrgico a expressão negativa do PTEN se correlacionou com maior escore de Gleason (OR=2,941, IC95%=1,234-7,009, $p=0,014$). **CONCLUSÃO:** Observamos que a perda de PTEN e a expressão positiva de ERG estão associados ao pior prognóstico de pacientes com CaP de muito baixo risco em VA, sendo, portanto, potenciais candidatos a biomarcadores de prognóstico neste cenário.

Palavras-chave: Biomarcadores tumorais. Neoplasias da próstata. Conduta expectante. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Yorioka MAW. The use of TMPRSS2:ERG fusion and PTEN deletion as prognostic biomarkers in the management of very-low risk prostate cancer on active surveillance [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Active surveillance (AS) is a therapeutic option for low-risk prostate cancer (PCa) although around 40% of patients progress during follow-up; to date there are no validated markers that can early identify with high accuracy patients more prone to progression. To correlate ERG and PTEN expressions in prostate samples by immunohistochemistry (IHC) with the chance of progression and prognosis of very low-risk prostate cancer patients on an active surveillance program. **METHODS:** We retrospectively studied 120 very low-risk prostate cancer patients in an AS program in our Institution from 2013 to 2018. We correlated the protein expression by IHC of PTEN and ERG in representative ISUP 1 PCa biopsy with chance of progression during surveillance, with classical prognostic factors and magnetic resonance imaging PI-RADS score. Progression was established by histopathological progression on rebiopsy, defined as Gleason score increase ≥ 7 or PSA rise above 10 ng/mL or more than 3 positive cores or more than 50% positivity in each core. In patients with progression and surgically treated we correlated markers expression in biopsy and surgical specimen arranged on tissue microarray with biochemical recurrence-free survival (BCRFS). In another cohort of 109 very low-risk prostate cancer patients and AS candidates in our institution but upfront surgically treated, we correlated these markers expression in biopsy and surgical specimen with the prognostic factors and BCRFS. **RESULTS:** From initial 120 AS patients, 101 were evaluated and 81 (80%) showed progression during mean follow-up of 4.1 years. Main progression criterion was Gleason score increase ≥ 7 , in 59 cases (72.8%). From 72 treated patients with surgery or radiotherapy, 7 presented with biochemical recurrence during 39.7-month follow-up. We observed in biopsy ERG-positive expression in 38 cases (39.6%) and PTEN-negative expression in 12 (12.6%). Loss of PTEN expression in biopsy was associated with higher chance of progression by Gleason score increase ≥ 7 (OR=9.750, 95%CI=1.203-78.987, $p=0.011$). ERG-positive expression in biopsy was associated with PI-RADS score ≥ 4 during AS (OR=2.841, 95%CI=1.113-7.252, $p=0.026$); while presence of ERG-negative with PTEN-positive in biopsy associated to lower chance of PI-RADS score ≥ 4 (OR=0.313, 95%CI=0.125-0.783, $p=0.011$). Increase of core positivity and PI-RADS score ≥ 4 were independent predictive factors for Gleason score progression during AS (OR=4.78, 95%CI=1.21-18.84, $p=0.001$ and OR=17.76, 95%CI=5.93-53.23, $p<0,001$). In the cohort of 109 very low-risk PCa patients and surgically treated, we observed ERG and PTEN expressions in biopsy of 89 cases, with a positive ERG expression in 16 cases (19.3%) and a negative PTEN expression in 5 patients (7.4%). In a 49-month follow-up, seven patients had biochemical recurrence. ERG-positive expression in biopsy had worse BCRFS in 5 years (71.4% vs 93.9%, $p=0.002$). Positive co-

expression of ERG and PTEN in biopsy also had worse BCRFS (68.4% vs 92.8% in 5 years, $p=0.004$). PTEN-negative in surgical specimen correlated to higher Gleason score (OR=2.941, 95%CI=1.234-7.009, $p=0.014$). **CONCLUSION:** We observed that loss of PTEN and positive ERG expression are associated with worse prognosis in very low-risk PCa patients on AS, therefore they are potential candidates for prognostic biomarkers in this scenario.

Keywords: Biomarkers tumor. Prostatic neoplasms. Watchful waiting. Immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de próstata

A última estimativa mundial apontou o Câncer de Próstata (CaP) como a segunda neoplasia sólida não cutânea mais frequente em homens, com 1,4 milhões de casos novos no ano de 2021 (1). Aproximadamente 70% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em países desenvolvidos. As maiores taxas de incidência foram observadas na Austrália/Nova Zelândia, Europa Ocidental e América do Norte. Esse aumento parece ser reflexo, em grande parte, das práticas de rastreamento pelo teste sérico do Antígeno Prostático Específico (PSA). Nos Estados Unidos da América (EUA), a incidência de CaP para o ano de 2021 foi estimada em 248.530 casos novos, com a mortalidade estimada de 34.130 (2). Devido à ampla adoção do rastreamento na prática clínica, houve também uma importante mudança no grau e no estágio do CaP, com mais de 90% dos homens diagnosticados com tumor clinicamente localizado (3).

No Brasil, o aumento da expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos e da qualidade dos sistemas de informação do país, bem como a ocorrência de diagnóstico desnecessário, em função da disseminação do rastreamento com PSA e toque retal (TR), podem explicar o aumento das taxas de incidência, com estimativa de 71.730 casos novos, no ano de 2023 (Incidência – 30,0%). É o segundo tumor mais frequente em homens, perdendo apenas para o câncer de pele não-melanoma, e representa na população brasileira a segunda causa de óbito por câncer em homens, com 15.983 óbitos em 2019 (4). O diagnóstico do CaP é estabelecido pela biópsia de próstata e está indicada em pacientes com níveis séricos de PSA > 2,5 ng/mL ou toque retal suspeito (5-7).

Em relação à história natural, os tumores da próstata apresentam comportamento clínico heterogêneo, existindo tumores com potencial de agressividade variável. Numa extremidade do espectro temos os tumores com baixo potencial de progressão que são denominados de indolentes ou insignificantes, nos quais o tratamento pode, às vezes, trazer sequelas mais

sérias que a própria neoplasia; enquanto na outra extremidade existem tumores com alto potencial de agressividade e disseminação, e que ameaçam a vida do paciente a despeito de qualquer tratamento que venha a ser oferecido. Logo, a avaliação prognóstica tem papel fundamental no manejo dos pacientes com esta neoplasia.

O rastreamento do CaP baseado em PSA permite o diagnóstico precoce e o tratamento curativo de tumores de próstata clinicamente significantes, porém ao mesmo tempo está associado ao diagnóstico de número considerável de tumores de baixa agressividade o que é denominado de diagnóstico desnecessário. Dados do estudo europeu multicêntrico e prospectivo que avaliou os resultados do rastreamento com PSA em 182 mil homens acompanhados por 16 anos mostrou que o rastreamento reduziu significativamente em 21% a chance de morte por CaP (8). Porém nesse mesmo estudo foi necessário rastrear 570 homens e diagnosticar 18 para evitar um óbito pela neoplasia em 16 anos de seguimento. O braço holandês do estudo recentemente atualizou o seguimento de 42.376 homens em 21 anos, com redução da mortalidade câncer-específica em 27%, com necessidade de se rastrear 240 homens e diagnosticar 14 para evitar um óbito (9), denotando que alguns dos tumores detectados pelo PSA apresentam características indolentes (10).

Estima-se que nos EUA cerca de 70% dos casos diagnosticados se traduzem por doença de baixo risco, portanto de curso indolente (11). Diante deste cenário, muito se discute na literatura sobre o excesso de diagnóstico de tumores clinicamente insignificantes, com quase 2/3 dos doentes sendo tratados desnecessariamente e que possivelmente não evoluiriam a óbito em decorrência da doença (12). Tal observação ressalta a importância da avaliação prognóstica na seleção de pacientes para o tratamento curativo.

Os principais fatores prognósticos do CaP são os níveis séricos de PSA, o estadiamento, e o escore de Gleason, como principal fator (13). Outros fatores considerados importantes são o volume tumoral, bem como a presença e a porcentagem dos padrões 4 e 5 de Gleason (14). Mais recentemente, a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP), em Conferência de Consenso sobre grau tumoral, criou nova classificação em substituição ao

escore de Gleason, devido melhor correlação com prognóstico e tratamento, sendo esta dividida em 5 grupos de grau (GG), com o GG 1 (escore de Gleason ≤ 6), o GG 2 (escore 3+4), GG 3 (escore 4+3), GG 4 (escore de Gleason 8) e GG 5 (escore de Gleason 9 ou 10) (15).

A avaliação conjunta dos principais fatores de prognóstico permite a classificação dos pacientes em grupos de risco baixo, intermediário e alto como o proposto por D'Amico, onde são considerados de baixo risco quando o estágio clínico for T1c ou T2a e PSA < 10 ng/mL e escore de Gleason ≤ 6 , risco intermediário se estágio clínico T2b ou PSA entre 10 e 20 ng/mL ou escore de Gleason 7 e risco alto se estágio clínico T2c ou PSA >20 ng/mL ou escore de Gleason ≥ 8 . Considera-se que no grupo de baixo risco encontra-se a maior chance de existirem os tumores indolentes que poderiam ser poupados do tratamento desnecessário (16). Posteriormente, dividiu-se a classificação de baixo risco em muito baixo risco e baixo risco, onde são considerados de muito baixo risco todos os seguintes em conjunto: estágio clínico T1c, escore de Gleason ≤ 6 , PSA < 10 ng/mL, até 3 fragmentos positivos na biópsia, até 50% de acometimento de cada fragmento e densidade de PSA $< 0,15$; e os pacientes de baixo risco com estágio clínico até T2a, escore de Gleason ≤ 6 e PSA < 10 ng/mL (17).

Com o mesmo intuito de melhorar a avaliação prognóstica, Epstein avaliou achados patológicos e clínicos, e desenvolveu os critérios para prever a existência de tumor insignificante: escore de Gleason ≤ 6 , densidade de PSA $< 0,15$, menos de 3 fragmentos positivos na biópsia prostática, e presença de até 50% de acometimento em um fragmento (18).

No entanto, estes fatores e grupos de risco têm-se mostrado insuficientes para o correto grupamento prognóstico dos tumores. Observa-se que mesmo quando os fatores clássicos são avaliados em conjunto, a definição prognóstica é considerada aquém do desejado (19). As diferentes estratificações de risco pré-tratamento foram comparadas em uma revisão sistemática com 139.515 homens, e observou-se que alguns métodos como o nomograma do MSKCC - *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* e o escore de CAPRA - *Cancer of the Prostate Risk Assessment* proposto pela Universidade da Califórnia, São

Francisco (UCSF) discriminaram melhor a chance de morte por CaP que a classificação de D'Amico ou classificação proposta pelas Sociedades Européia e Americana de Urologia (20). Este fato é relevante uma vez que após o diagnóstico vem a decisão de conduta expectante *versus* vigilância ativa *versus* as modalidades terapêuticas, tanto curativas quanto paliativas, que apresentam graus expressivos de morbidade; o que ressalta a importância da definição prognóstica.

1.2 Vigilância ativa

A vigilância ativa (VA) surgiu como uma opção terapêutica para os tumores de baixo e muito baixo risco e representa ferramenta útil para a manutenção dos benefícios da detecção precoce baseada em PSA e também para a redução do tratamento desnecessário dos tumores indolentes detectados pelo rastreamento. Atualmente, de acordo com o consenso da Associação Americana de Urologia, a VA tornou-se a opção preferencial para os tumores de baixo risco (21). Os critérios de inclusão mais aceitos na literatura incluem: ISUP grau 1, estágio clínico \leq cT2a, PSA < 10 ng/mL e densidade de PSA $< 0,15$ ng/mL/cc, com algumas séries incluindo número de fragmentos positivos até 3 e porcentagem de envolvimento de cada fragmento $< 50\%$ (critérios de Epstein) (22). Nos últimos anos os critérios de inclusão foram expandidos sendo possível atualmente a indicação de VA para qualquer paciente com escore de Gleason 3+3 visto existirem dados atestando a segurança da vigilância para esses pacientes; e mais recentemente tem sido considerada a inclusão até para casos selecionados com escore de Gleason 3+4 favoráveis (23-25).

Os pacientes em protocolo de VA são acompanhados com PSA e toque retal (TR) semestralmente, e com rebiópsias com intervalos de 1 até 3 anos (26, 27). A ressonância magnética multiparamétrica da próstata (RM) foi incorporada no monitoramento destes pacientes, e a presença de alterações como o aumento no escore PI-RADS, tamanho da lesão, além da progressão no TR ou PSA, também indicam a repetição ou antecipação da biópsia (28). De acordo com as principais séries, os critérios de progressão do CaP durante VA mais comumente utilizados são escore Gleason > 6 (GG > 1), número de fragmentos

positivos > 3, porcentagem de acometimento do fragmento > 50% e elevação de PSA >10 ng/mL; retirando-se o paciente da VA e instituindo tratamento caso um desses eventos ocorram (29). Tais protocolos de VA garantem mortalidades câncer-específica menores que 1% em 10 anos; logo, além de reduzir o tratamento desnecessário em pacientes com doença clinicamente insignificante, a vigilância mantém a opção de terapia definitiva em pacientes reclassificados para doença de risco intermediário ou alto durante o seguimento (30-33). Mais recentemente, a progressão do escore de Gleason tem sido o critério mais aceito e eventualmente o único para reclassificação e gatilho para tratamento definitivo (34).

Porém é importante ressaltar a necessidade de uma seleção adequada dos pacientes para o protocolo de VA, já que mesmo adotando esses critérios cerca de 30 a 40% dos casos apresentam reclassificação do risco na rebiópsia durante o seguimento. Alguns casos reclassificados o são por progressão da neoplasia, porém outros podem ter sido mal selecionados e refletem as limitações dos critérios empregados atualmente para a seleção dos candidatos para VA (33).

Em relação aos resultados da VA, uma das séries com maior tempo de seguimento foi publicada pelo grupo de Toronto liderado pelo Dr. Klotz *et al.* que desde 1995 acompanham prospectivamente 993 pacientes com CaP de risco baixo e intermediário. Nesse estudo o PSA era realizado semestralmente, a biópsia confirmatória em 12 meses e a cada 2 - 3 anos, e com RM desde 2012. A intervenção foi oferecida quando o tempo de duplicação de PSA foi menor que 3 anos ou progressão do escore de Gleason nas biópsias de seguimento ou progressão clínica. Entre 1995 e 1999, foram incluídos pacientes de baixo risco (escore de Gleason ≤ 6 e PSA ≤ 10 ng/mL) e homens com mais de 70 anos com PSA ≤ 15 ng/mL ou escore de Gleason $\leq 3+4$. A partir de 2000, foi restrito a pacientes de baixo risco ou com risco intermediário "favorável" (PSA entre 10 e 20 ng/mL e/ou escore de Gleason 3+4) com comorbidades significativas e expectativa de vida menor que 10 anos. A sobrevida global foi de 80% em 10 anos e 62% em 15 anos, com 15 mortes por CaP (mortalidade câncer-específica de 1,5%) (35). Neste estudo, 267 (27%) receberam tratamento local devido à progressão e destes, 25% apresentaram recorrência bioquímica, representando

6% de toda coorte (63 de 993 pacientes), com taxa de sobrevida livre de recorrência bioquímica (SLRB) em 10 anos de 60%. Assim, a vigilância feita nestes moldes foi falha, já que se perdeu a janela de oportunidade de cura nestes 25% dos pacientes com recidiva bioquímica, e nota-se então que os critérios de seleção e também de progressão do CaP indolente não são suficientes.

A atualização do estudo multicêntrico PRIAS (*The Prostate Cancer Research International Active Surveillance*), que avaliou os resultados da VA em 5302 pacientes com CaP de baixo risco, encontrou sobrevida específica de 94% em seguimento de 10 anos. O estudo mostrou taxas de reclassificação de 52% em 5 anos, alguns por seleção inadequada. Adicionalmente, 1/3 dos pacientes submetidos à prostatectomia radical (PR) tinham características anátomo-patológicas não-agressivas como escore de Gleason 3+3 e estágio pT2 (36). O estudo confirma a segurança da VA como opção de tratamento do CaP de baixo risco, mas ao mesmo tempo indica a necessidade de melhorar os critérios de seleção e progressão.

Nesse sentido, Ross *et al.* observaram 35% de progressão do escore de Gleason em 290 pacientes em VA, onde o tempo de duplicação do PSA e a velocidade do PSA não foram suficientes em prever progressão do escore de Gleason nas rebiópsias durante o seguimento, denotando a necessidade de novos marcadores de prognóstico nestes pacientes de baixo e muito baixo risco que identifiquem previamente aqueles pacientes com maior potencial de progressão (37).

Em série de 1086 pacientes em VA, Reese *et al.* avaliaram 130 pacientes, que ao progredirem durante o protocolo, foram submetidos à PR. Destes, 75% realizaram o tratamento cirúrgico por terem apresentado reclassificação da doença na biópsia de seguimento, sendo o aumento do número de fragmentos positivos acima de 2 o principal fator reclassificador. No entanto, somente 24% dos pacientes, cuja reclassificação na rebiópsia fora em decorrência do aumento do número de fragmentos positivos, tiveram desfechos patológicos desfavoráveis nos espécimes cirúrgicos, contra 45% dos pacientes onde o fator reclassificador fora o escore de Gleason; demonstrando que nem todos os fatores usados para reclassificar a doença na rebiópsia são capazes de prever desfechos patológicos desfavoráveis em espécimes cirúrgicos de PR (38).

Nosso grupo avaliou retrospectivamente uma série de 93 pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com cirurgia e observamos resultados desfavoráveis em um terço dos casos, sendo 25% de escore de Gleason ≥ 7 , 8% de extensão extracapsular, 7% de margens cirúrgicas comprometidas e também de invasão de vesículas seminais e 1,2% de invasão de colo vesical. Nossos achados evidenciam a necessidade de melhorar a seleção de pacientes para VA (39).

Em resumo, torna-se clara a necessidade de identificação de características biológicas que estejam associadas a maior chance de progressão do CaP de baixo risco e que possibilitem a melhor seleção e manejo de pacientes para protocolos de VA. A pesquisa continua no sentido de se estabelecer novos fatores prognósticos no CaP, e o enfoque principal tem sido dado ao estudo de biomarcadores moleculares (40).

1.3 Marcadores moleculares

Uma variedade de biomarcadores moleculares em CaP foram desenvolvidos e comercializados no foco de personalizar e melhorar a estratificação de risco; e tornar o manejo de decisões clínicas mais precisas, no sentido que existem expressões gênicas relacionadas a maior chance de progressão e agressividade da neoplasia de próstata (41, 42). Poucos painéis moleculares foram validados, porém algumas assinaturas gênicas são disponíveis e fornecem informações adicionais na seleção de pacientes com CaP em VA: *Oncotype Dx Prostate*, *Prolaris*, *Decipher* e *ProMark*. Cada uma parece melhorar a acurácia prognóstica de modelos de estratificação de risco para doença significativa, no entanto tal benefício não foi demonstrado prospectivamente e não há dados comparativos indicando superioridade de uma assinatura à outra (43). A assinatura *Decipher*, por exemplo, foi originalmente desenvolvida para prever o risco de metástases pós-prostatectomia radical (44). Outro ponto de forte impacto em nossa realidade brasileira é o alto custo destes exames, em média de 4 a 5 mil dólares americanos, o que dificulta a aplicação em nosso meio.

Fusões gênicas são eventos frequentes em várias neoplasias malignas, sendo o cromossomo Filadélfia um dos exemplos mais conhecidos. Esta fusão corresponde a uma translocação cromossômica recíproca envolvendo os braços longos dos cromossomos 9 e 22 (45), e ocorre em mais de 90% dos casos de leucemia mielóide crônica; sendo, portanto, um marcador de diagnóstico nesta neoplasia.

No CaP a fusão gênica mais comumente encontrada é a TMPRSS2:ERG, que ocorre em 40 a 80% dos casos. O *Transmembrane Protease Serine 2* (TMPRSS2) é um gene que codifica uma proteína de membrana, cuja área promotora é regulada por andrógenos. A fusão deste gene com o oncogene ERG (*ETS-related gene*), da família ETS (*Erythroblast transformation-specific*) está presente em 50% dos casos de CaP e resulta em hiperexpressão de genes relacionados à carcinogênese, como aumento da proliferação celular, crescimento invasivo e aumento da motilidade celular (46-48). O status da fusão gênica pode ser demonstrado através da Fluorescência por Hibridização *in situ* (FISH) na amostra tecidual, *Real-Time* PCR (RT-PCR) na urina ou por imunohistoquímica (IH) através da análise da expressão da proteína ERG (49). A técnica de IH para expressão de ERG tem alta sensibilidade 95,7 - 97,5% e especificidade 96,5 - 99,4% em relação ao achado de fusão gênica por FISH (50, 51).

A fusão TMPRSS2:ERG foi inicialmente estudada como marcador de diagnóstico (52). Robert *et al.* observaram a ocorrência de fusão gênica TMPRSS2:ERG em amostras de urina comparando-se homogeneamente grupos de tecido prostático normal (48 casos), com hiperplasia prostática benigna (32 casos) e com CaP (48 casos), e encontraram presença da fusão em 8,3% dos casos com hiperplasia, em contraste a 50% nos casos de neoplasia de próstata (53). Porém pesquisas recentes têm indicado também um possível papel da fusão como marcador de prognóstico no CaP, uma vez que foi observada associação da maior ocorrência da fusão com a progressão do tumor e com a evolução para a resistência à castração (54, 55).

Demichelis *et al.* avaliaram o status da fusão TMPRSS2:ERG em amostras teciduais de ressecção transuretral de próstata, por FISH ou por RT-PCR, em pacientes em “*watchful-waiting*”, e correlacionaram a presença da

fusão com a história natural da doença; demonstrando que nos pacientes com presença da fusão foi observada maior incidência de morte por CaP, com incidência cumulativa de 2,7 ($p < 0,01$, IC95%=1,3 - 5,8) (56). Caso estes achados iniciais sejam confirmados, a análise da fusão pode potencialmente ajudar na estratificação de risco e conseqüentemente melhorar o manejo dos pacientes com CaP.

Em contraposição, Brooks *et al.*, em estudo multicêntrico, avaliaram a expressão na peça cirúrgica de ERG e SPINK1 em coorte de 1067 pacientes submetidos à PR, correlacionando a imunoexpressão com os achados anátomo-patológicos. Contraditoriamente, não se observou associação da expressão desses biomarcadores com desfechos patológicos desfavoráveis, como extensão extracapsular, margens cirúrgicas positivas e invasão das vesículas seminais. Além disso, pacientes ERG positivos na análise IH tenderam a ser mais jovens, a terem menor escore de Gleason, assim como menor valor de PSA pré-operatório, quando comparados aos pacientes ERG negativos (57).

Uma vez que a fusão se mostrou associada ao prognóstico, postulou-se o uso como marcador de seleção e prognóstico em pacientes com CaP de baixo risco em protocolos de VA. Em estudo prospectivo com pacientes com CaP de baixo risco selecionados para protocolo de VA, Lin *et al.* correlacionaram os escores dos marcadores urinários PCA3 e TMPRSS2:ERG por RT-PCR em 413 homens do estudo PASS, com os escores de Gleason e volume tumoral na rebiópsia, e notaram que maior escore de TMPRSS2:ERG na urina foi observado em pacientes com maior chance de reclassificação da biópsia quanto ao escore de Gleason (“*Upgrading*”), OR 1,24 (IC95%=1,01 – 1,53, $p=0,05$), e ao volume do tumor, caracterizado pelo percentual de envolvimento em cada fragmento positivo, OR 1,28 (IC95%=1,10 – 1,49, $p=0,001$) (58). Cabe ressaltar que este estudo possui limitações, como a sub-amostragem de CaP inerente à biópsia prostática, a variabilidade inter-observador no laudo do escore de Gleason, e o menor poder estatístico por representar uma coorte com baixa amostragem de casos com progressão para escores de Gleason ≥ 7 (8%).

Berg *et al.*, utilizando-se de uma coorte de 265 pacientes em VA com seguimento de 10 anos, analisaram retrospectivamente a expressão da proteína ERG em amostra tecidual da primeira biópsia e correlacionaram com os

desfechos em termos de reclassificação histopatológica nas rebiópsias durante o seguimento. Dos pacientes considerados ERG positivos, 58% sofreram progressão e, portanto, saíram do protocolo de VA, contra 22% dos pacientes ERG negativos. Na análise multivariada, a razão de chance dos pacientes ERG positivos de sofrerem progressão global foi de 2,45 (OR=2,45, IC95%=1,62 – 3,72, $p < 0,0001$), concluindo os autores que a expressão tecidual de ERG é um potencial marcador de seleção para VA (59). No entanto, o estudo é limitado no que condiz à sua natureza observacional, além de inclusão de pacientes fora dos critérios estritos de VA, mas principalmente quanto à biópsia de próstata utilizada ter sido guiada por ultrassom e com amostragem randômica sem o uso de RM e técnicas cognitivas ou de fusão de imagens para biópsias guiadas, que representam a modalidade adequada de biópsia de acordo com o consenso Europeu de Urologia (27).

PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog on chromosome 10*) é um dos genes de supressão tumoral mais frequentemente sub expressos em cânceres humanos e tem sido descrito em mais de dois terços dos pacientes com CaP avançado/agressivo. Especificamente, a perda do PTEN em células tumorais decorre principalmente de deleções genômicas da região cromossômica 10q23, onde o gene reside (60, 61). O PTEN desfosforila intermediários de sinalização de lipídeos, resultando em desativação da via *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) de sinalização, controlando assim a proliferação e crescimento tumoral (62). Perda ou alteração (mutação) genética de pelo menos um alelo do PTEN, comumente identificada através de FISH, tem sido reportada em aproximadamente 10% a 70% dos casos de CaP primário (63-67). Em amostras teciduais comprometidas por tumor, foi possível encontrar forte concordância entre a perda do PTEN obtida pela IH e a deleção de um ou dois alelos do PTEN acessados por FISH (68).

Em uma coorte de 4699 pacientes, analisando-se os espécimes de PR, e 57 casos de tumor resistente à castração, Krohn *et al.* demonstraram que a deleção do PTEN, analisada por FISH e IH, estava associada com características clínico-patológicas adversas e alto risco de recidiva bioquímica (69). Chaux *et al.*, em estudo retrospectivo envolvendo 902 pacientes com CaP tratados com PR, analisaram a expressão tecidual do PTEN no espécime

cirúrgico por IH. Os pacientes que sofreram recidiva da doença apresentaram alta proporção de expressão negativa do PTEN (16% contra 11%, $p=0,05$) e PTEN marcadamente diminuído (40% contra 31%, $p=0,02$) quando comparados ao grupo controle, permitindo concluir que pacientes com PTEN negativo e/ou diminuído tem maiores chances de sofrerem recorrência da doença, independentemente dos achados clínico-patológicos (70).

Em amostras teciduais de PR, biópsias prostáticas em pacientes tratados com hormonoterapia primária, ressecções transuretrais em pacientes com CaP castração-resistente e metástases de CaP castração-resistente de 701 pacientes, Leinonen *et al.* demonstraram alta frequência da deleção do PTEN em casos mais avançados, além da forte associação com a baixa sobrevida livre de progressão; entretanto, tais achados foram observados apenas nos casos em que os pacientes eram concomitantemente ERG positivo, sugerindo associação entre os dois genes (71).

Contraditoriamente aos achados de Leinonen *et al.*, a deleção do PTEN demonstrou utilidade prognóstica semelhante independente da expressão do ERG no estudo conduzido por Reid *et al.*, com 308 pacientes com CaP manejados conservadoramente, onde os autores demonstraram que a deleção do PTEN em conjunto com ausência de fusão TMRSS2:ERG, ambos avaliados por FISH, esteve associada a menor sobrevida câncer-específica em 11 anos de seguimento (13,7% vs. 85,5% na presença de deleção de PTEN associada à presença da fusão TMRSS2:ERG) (72). Como Leinonen, outros estudos observaram pior sobrevida na deleção do PTEN associada à fusão TMRSS2:ERG (71, 73, 74).

Em relação ao uso do PTEN como biomarcador nos pacientes em VA, a literatura é escassa existindo apenas duas séries publicadas. Tosoian *et al.*, em estudo caso-controle utilizando pacientes da coorte de VA com CaP de baixo risco da Johns Hopkins, avaliaram 67 amostras teciduais de biópsia prostática com reclassificação para escores de Gleason 3+4 ou 4+3. Comparativamente aos 65 controles com escore de Gleason 6 e seguimento mínimo de 8 anos em VA, os autores observaram que a perda de PTEN avaliada por IH não esteve associada a maior chance de progressão do escore de Gleason (75).

Embora existam dados sobre a fusão TMRSS2:ERG como marcador de prognóstico no CaP, percebe-se que ainda existem resultados díspares e controversos quanto à sua utilização no manejo dos pacientes em protocolos de VA - em razão dos achados descritos serem diversos e oriundos de séries retrospectivas. Semelhantemente, a presença de poucos estudos e a ocorrência de resultados contraditórios justificam a realização de novos estudos sobre a expressão do PTEN e o prognóstico do CaP. Nenhum estudo avaliou em conjunto o papel destes dois biomarcadores em conjunto com os resultados da ressonância multiparamétrica como preditores de doença de maior agressividade e reclassificação na rebiópsia de pacientes em protocolo de VA. Acreditamos que algumas respostas necessitam serem respondidas quanto ao real papel destes biomarcadores como fator de prognóstico em pacientes com doença de muito baixo risco e postulamos que a perda de PTEN e a presença da fusão TMRSS2:ERG estão associadas à maior chance de progressão e ao prognóstico dos pacientes em VA.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Correlacionar a ocorrência da fusão TMPRSS2:ERG caracterizada pela expressão proteica de ERG e a expressão do PTEN por imuno-histoquímica em amostras de biópsias prostáticas com a chance de progressão, com o escore de PI-RADS da RM e com os fatores de prognóstico de pacientes com CaP de muito baixo risco em vigilância ativa.

Correlacionar os fatores de prognósticos clássicos e a sobrevida livre de recorrência bioquímica com a expressão proteica de ERG e PTEN por imuno-histoquímica na biópsia e no espécime cirúrgico dos pacientes com CaP de muito baixo risco que progrediram durante a vigilância ativa e que foram tratados com cirurgia.

2.2 Objetivo secundário

Correlacionar a ocorrência da fusão TMPRSS2:ERG caracterizada pela expressão proteica de ERG e a expressão do PTEN por imuno-histoquímica em amostras de biópsias e espécimes cirúrgicos com os fatores de prognóstico e a sobrevida livre de recorrência bioquímica de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados diretamente com cirurgia, com o objetivo de validar os achados da série de vigilância ativa.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Pacientes e amostras

Analizamos a expressão proteica de ERG e PTEN em amostras teciduais de material parafinado de duas séries; a primeira de pacientes com CaP de muito baixo risco em protocolo de vigilância ativa que são seguidos prospectivamente em nossa instituição, e a segunda de pacientes com diagnóstico de CaP de muito baixo risco que eram candidatos a VA, mas que foram tratados imediatamente com cirurgia (PR), no intuito de validar os resultados dos biomarcadores testados na primeira série.

3.2 Série de pacientes em vigilância ativa

Avaliamos retrospectivamente todos os pacientes incluídos em protocolo de VA para CaP de muito baixo risco em acompanhamento no Serviço de Urologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) a partir de 2013. O primeiro paciente incluso no nosso estudo foi em 06 de Fevereiro de 2013, e o último paciente recrutado ocorreu em 10 de Agosto de 2018. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, exclusão e que concordaram em participar do estudo preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, apêndice 1), e foram selecionados para o estudo.

3.2.1 Critérios de inclusão

- 1) Idade entre 50 e 75 anos;
- 2) Biópsia inicial com no mínimo 12 fragmentos; mais fragmentos guiados cognitivamente se área suspeita PI-RADS ≥ 3 na RM;
- 3) Câncer de próstata escore de Gleason ≤ 6 ; confirmado na revisão de lâmina em nossa instituição;
- 4) PSA total ≤ 10 ng/mL;
- 5) Densidade de PSA $\leq 0,15$ ng/mL/cm³;

- 6) Presença de ≤ 3 fragmentos positivos;
- 7) $\leq 50\%$ de envolvimento neoplásico em cada fragmento;
- 8) Estádio clínico ao toque retal $\leq cT2a$;
- 9) Realização de RM.

3.2.2 Critérios de exclusão

- 1) Recusa em participar do protocolo de VA;
- 2) Impossibilidade de recuperação das lâminas e blocos das biópsias originais;
- 3) Expectativa de vida menor que 10 anos;
- 4) Radioterapia pélvica prévia;
- 5) Antecedente de amputação abdomino-perineal de reto pela dificuldade de realização de biópsias no seguimento;
- 6) Ausência de tecido tumoral suficiente para realização da análise imunohistoquímica.

Cento e vinte pacientes foram selecionados para o protocolo de VA. Foi realizada revisão de lâmina por uro-patologista único (LC) em todos os casos em que o diagnóstico de CaP foi estabelecido por biópsia externa ao complexo HCFMUSP. Todos os pacientes selecionados neste protocolo de VA foram também submetidos à nova biópsia de próstata confirmatória em até 6 meses; conforme preconizam os consensos de VA (76, 77). Todos os pacientes realizaram RM multiparamétrica de próstata com aparelho 3 Teslas, onde as áreas suspeitas para câncer foram classificadas de acordo com a classificação PI-RADS v2.1 (78). Todos os laudos de RM foram revistos por uro-radiologista experiente (PV).

Os pacientes que mantinham os critérios de CaP de muito baixo risco permaneciam em VA, com avaliações periódicas de PSA a cada 6 meses, exame físico com toque retal anual, RM a cada 1 - 2 anos, e rebiópsia de próstata a cada 1 - 2 anos ou elevação de PSA > 10 ng/mL ou piora do toque retal (cT2b) ou se piora do PI-RADS na RM.

Foi definido, no protocolo à época, que a taxa de progressão geral da neoplasia se daria pelo surgimento de pelo menos um dos seguintes critérios durante o seguimento: a) PSA sérico >10 ng/mL, b) progressão do estágio clínico > cT2a, c) número de fragmentos positivos na rebiópsia > 3, d) escore de Gleason da rebiópsia > 6, e) presença de > 50% de envolvimento de qualquer fragmento acometido. Os pacientes que preencheram pelo menos um dos critérios de progressão foram re-estadiados e oferecidos tratamento curativo por prostatectomia radical ou radioterapia externa. Os pacientes tratados foram acompanhados periodicamente com dosagens de PSA seriadas (3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 meses e após anualmente), e considerados com recidiva bioquímica àqueles operados com PSA > 0,2 ng/mL ou PSA maior que 2,0 ng/mL acima do nadir naqueles tratados com radioterapia externa.

Foram avaliadas as expressões das proteínas ERG e PTEN através de IH em biópsia de próstata com área tumoral representativa do tumor Gleason 6 que poderia ser oriunda da biópsia inicial ou das biópsias confirmatória ou de seguimento. Nos casos com progressão e que foram tratados com cirurgia, as expressões das proteínas ERG e PTEN também foram avaliadas nos espécimes cirúrgicos, em amostra representativa do escore de Gleason global dado pelo patologista na revisão de lâminas do caso.

3.3 Série de candidatos à vigilância ativa e tratados com cirurgia

Avaliamos retrospectivamente a biópsia e achados intraoperatórios de 109 pacientes com CaP localizado de muito baixo risco candidatos a VA, mas que foram tratados diretamente com cirurgia em nossa instituição, e com seguimento pós-operatório mínimo de 12 meses; sendo o primeiro caso operado em 12 de fevereiro de 2007 e o último em 14 de dezembro de 2012.

3.3.1 Critérios de inclusão

- 1) Idade entre 50 e 75 anos;
- 2) Biópsia inicial com no mínimo 12 fragmentos;

- 3) Câncer de próstata escore de Gleason ≤ 6 ; confirmado na revisão de lâmina em nossa instituição;
- 4) PSA total ≤ 10 ng/mL;
- 5) Densidade de PSA $\leq 0,15$ ng/mL/cm³;
- 6) Presença de ≤ 3 fragmentos positivos;
- 7) $\leq 50\%$ de envolvimento neoplásico em cada fragmento;
- 8) Estádio clínico ao toque retal \leq cT2a.

3.3.2 Critérios de exclusão

- 1) Impossibilidade de recuperação das lâminas e blocos das biópsias originais;
- 2) Radioterapia pélvica prévia;
- 3) Ausência de tecido tumoral suficiente para realização da análise imuno-histoquímica.

De modo semelhante ao que fizemos na série de VA, avaliamos as expressões das proteínas ERG e PTEN através de IH em biópsia de próstata com área tumoral representativa do tumor Gleason 6 e no espécime cirúrgico. O critério de recorrência bioquímica após tratamento cirúrgico foi o mesmo adotado na série de VA.

3.4 Análise da expressão das proteínas ERG e PTEN por IH

As análises para a imunexpressão nuclear da proteína ERG e para a perda da imunexpressão nuclear e citoplasmática da proteína PTEN foram realizadas conforme descrito previamente na literatura (49, 59, 68, 70). As reações imuno-histoquímicas foram realizadas em fragmentos selecionados de biópsias de próstata apresentando adequada representatividade tumoral e no espécime cirúrgico, também em área representativa do escore de Gleason global dado pelo patologista na revisão do caso. Os blocos de parafina foram obtidos a partir dos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP e do Setor de Anatomia Patológica do ICESP. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: (1) ERG (clone EP111 monoclonal de coelho, *Medaysis*), na titulação

de 1:400; e (2) PTEN (clone D4.3 monoclonal de coelho, *Cell Signalling*), na titulação de 1:50, ambos com polímero *Novolink*. O procedimento imunohistoquímico seguiu as seguintes etapas técnicas:

1. Desparafinização dos cortes de 3 μ de espessura do material incluído em parafina; incubação com xilol a 60°C por 20 minutos, seguida de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 20 minutos.
2. Hidratação dos cortes em concentrações de Etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, Etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada.
3. Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de tampão Tris-EDTA, pH 9.0 (PMB1-125) *Spring Bioscience* – para PTEN e ERG, em panela a vapor (após a fervura da água da panela com a cuba de solução de recuperação), colocando o suporte de lâminas por 35 minutos. Esfriamento por 20 minutos à temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada.
4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída em metanol, em três banhos de 10 minutos cada. Lavagens em água corrente e água destilada. Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM em pH 7,4 por 5 minutos.
5. Bloqueio de proteínas com *Cas BlockTM* (*Invitrogen by Life Technologies*) por 10 minutos a 37°C. Escorreamento e incubação com o anticorpo primário.
6. Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37°C e, em seguida, 18 horas (*overnight*) a 4°C. Lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
7. Incubação em estufa com o anticorpo pós-primário (*Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Ltd*), Ref. RE7 159, por 30 minutos a 37°C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
8. Incubação com polímero marcado com enzima peroxidase de rábano silvestre (HRP) (*NovoLink Polimer, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica*

Biosystems, Newcastle Ltd), Ref. RE7161, por 30 minutos a 37°C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.

9. Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (*Labsynth*) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37°C. Lavagens em água corrente e água destilada.

10. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.

11. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol (3 trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (*Entellan, Merck*, cod. 1.07961.0100) com lamínula.

Realizamos as reações imuno-histoquímicas das amostras de biópsia prostática de forma convencional conforme descrito acima, após selecionar adequada representatividade tumoral em revisão de lâmina do caso e marcação do bloco de parafina original. Para a análise IH dos espécimes cirúrgicos da série de VA e série de validação, utilizamos a técnica de *tissue microarray* (TMA), a fim de otimizar as reações, com diminuição do uso de reagentes e anticorpos, com economia de tempo e uniformidade das reações, e preservando o uso direto dos blocos originais (figura 1).

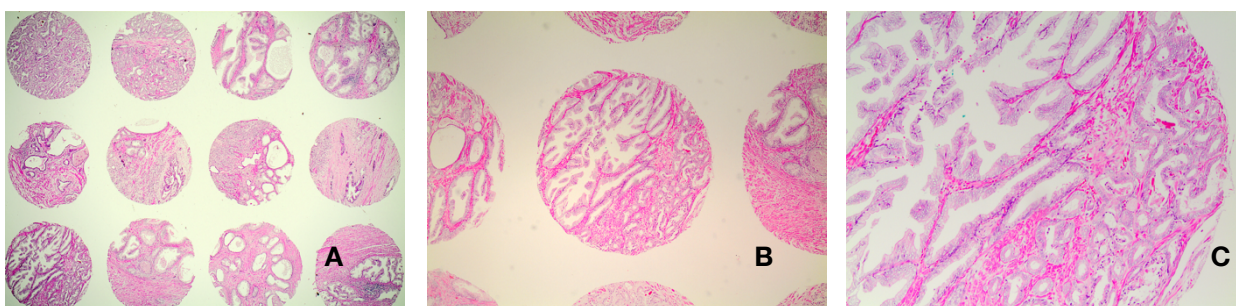
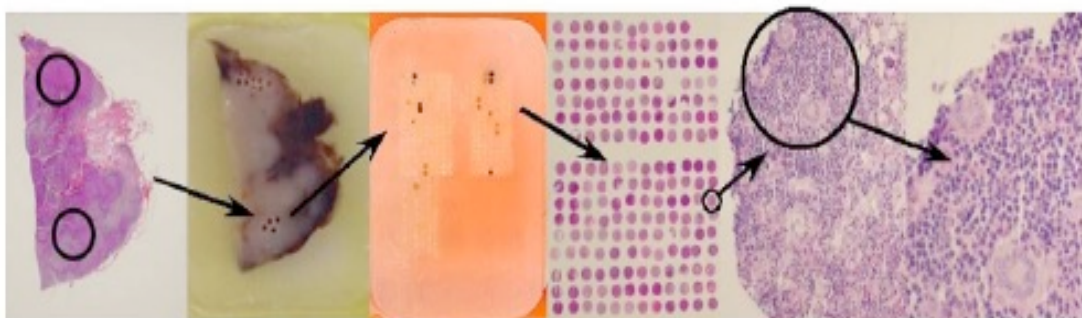


Figura 1 – TMA evidenciando *spot* tumoral de CaP Gleason 6. A) Vista panorâmica do TMA exibindo *spots* tumorais e não tumorais. H&E, 20x. B) *Spot* tumoral contendo cerca de 40% de carga tumoral representada por Gleason padrão 6(3+3). H&E, 40x. C) Detalhe do mesmo *spot* tumoral anterior H&E, 100x.

Confeccionamos os blocos receptores de TMA de acordo com a técnica usual com parafina de pureza elevada à 56°C, em molde com cassete comum, sendo mantidos em estufa à 60°C *overnight*. Após, foram levados à geladeira para rápida solidificação. Posteriormente, receberam acabamento em micrótomo rotativo para assegurar superfície reta e lisa. Dessa maneira, determinada a profundidade entre 0,8 e 0,9 cm, o bloco receptor ficou apto a receber cilindros doadores de 1 mm de diâmetro. Todas as amostras dos espécimes cirúrgicos foram marcadas por um único uropatologista (LC) em área tumoral representativa, tanto na lâmina de H&E quanto nos blocos respectivos de parafina, fazendo-se então a planilha-mapa contendo os números de cada bloco doador. Na figura 2 mostramos as etapas de construção do TMA.

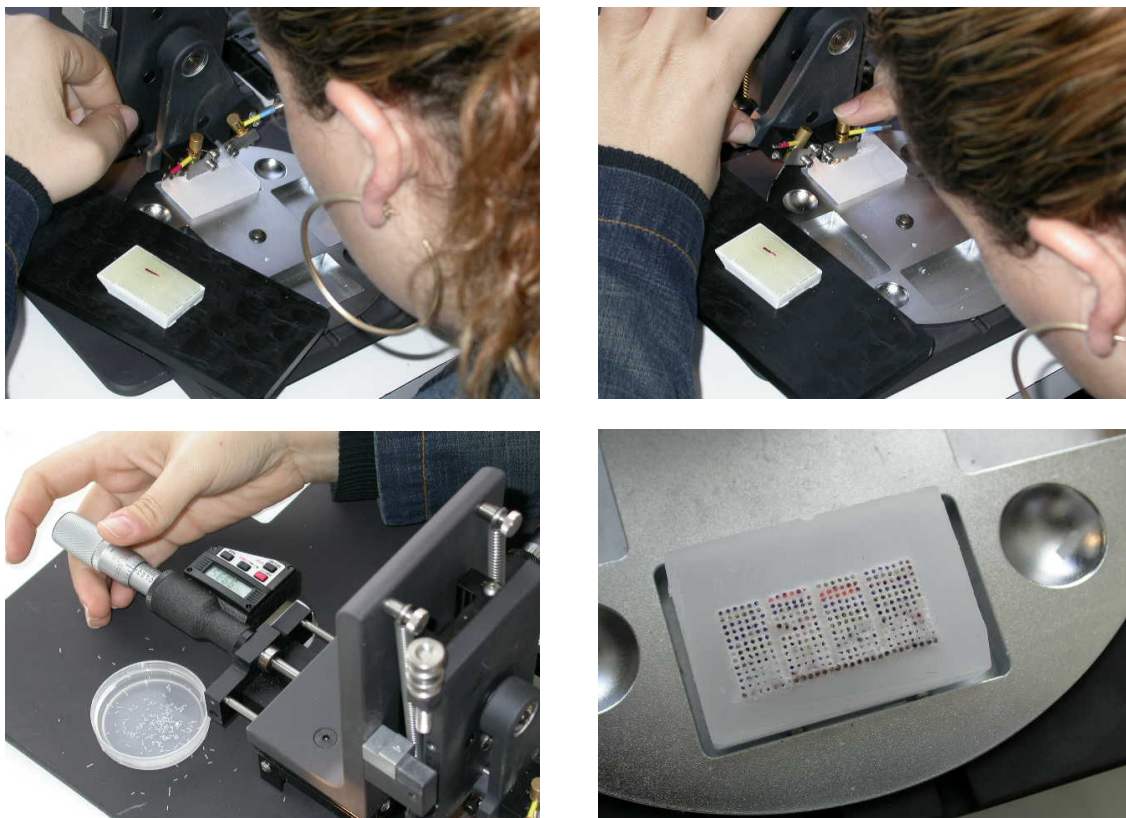


FONTE: Pontes JR, J, 2009.

Figura 2 – Etapas da confecção do TMA.

Foram mantidos os espaçamentos de mesma medida horizontal e vertical. O bloco receptor então foi fixado na base do aparelho, com ajuste adequado dos eixos X e Y para centralização do TMA no bloco receptor. Seguiu-se a perfuração do bloco receptor com agulha azul, desprezo da parafina extraída e posicionamento do bloco doador, com perfuração exata da região marcada pelo patologista, com agulha vermelha. Ocorreu então a transferência do material para o bloco receptor; e após todos os *spots* transferidos, o bloco foi nivelado em superfície lisa sob estufa a 60°C (figuras 03 e 04). O bloco de TMA continha sequencialmente 3 amostras de tecido tumoral prostático do mesmo bloco doador/paciente, intercalados com 2 amostras de tecido não-maligno, perfazendo 5 *spots* de cada caso. Cada *spot* mediu 1 mm de diâmetro. Cada bloco de TMA abrigou cerca de 150 *spots* de leitura. Para o presente estudo

foram produzidos 5 diferentes blocos de TMA. Prosseguiu-se então a secção dos blocos de TMA com micrótopo e realizamos as reações IH previamente descritas.



FONTE: Pontes JR, J, 2009.

Figura 3 – Amostragem e inclusão no bloco receptor.

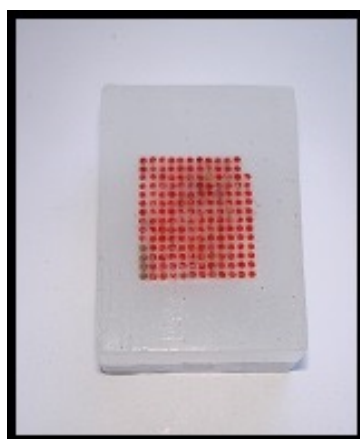


Figura 4 – Bloco receptor do TMA contendo os cilindros com as amostras do tecido a ser estudado.

As lâminas contendo os cortes histológicos submetidos às reações IH foram avaliadas em microscópio óptico por um único uropatologista (LC), desprovido de informações clínicas ou evolutivas. Foi realizada análise dicotômica (positiva ou negativa) para a avaliação da imunoposição nuclear de ERG e qualquer intensidade de expressão em lâmina de biópsia ou de *spots* tumorais foi considerada como expressão positiva. As células endoteliais com imunomarcção nuclear foram usadas como controle interno positivo (49, 59) (figura 5).

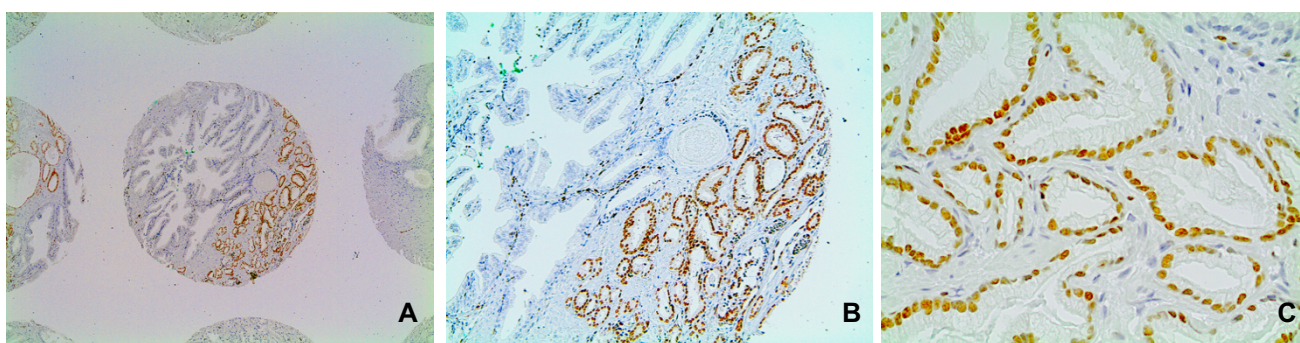


Figura 5 – Expressão de ERG por IH de espécime cirúrgico e biópsia prostática. A) Exemplo de expressão nuclear positiva de ERG por IH em *spot* com amostra tumoral de espécime cirúrgico em TMA (Gleason 3+3). Imunoperoxidase, 40x. B) Detalhe do *spot* tumoral do caso anterior. Imunoperoxidase, 100x. C) Expressão positiva de ERG por IH em amostra de biópsia prostática por agulha. Imunoperoxidase, 400x.

A avaliação da perda de imunomarcção nuclear e citoplasmática da proteína PTEN também foi realizada com categorização dicotômica (positivo= manutenção ou negativo= perda). O epitélio glandular adjacente e/ou os *spots* não-tumorais serviram como controle interno positivo (figura 6). O padrão anômalo de imunoposição consistiu na ausência ou intensa redução da marcação nuclear ou citoplasmática em todas as células tumorais da amostra (68, 70). A perda de expressão na lâmina de biópsia ou em qualquer um dos 3 *spots* tumorais de cada caso foi considerado como PTEN negativo.

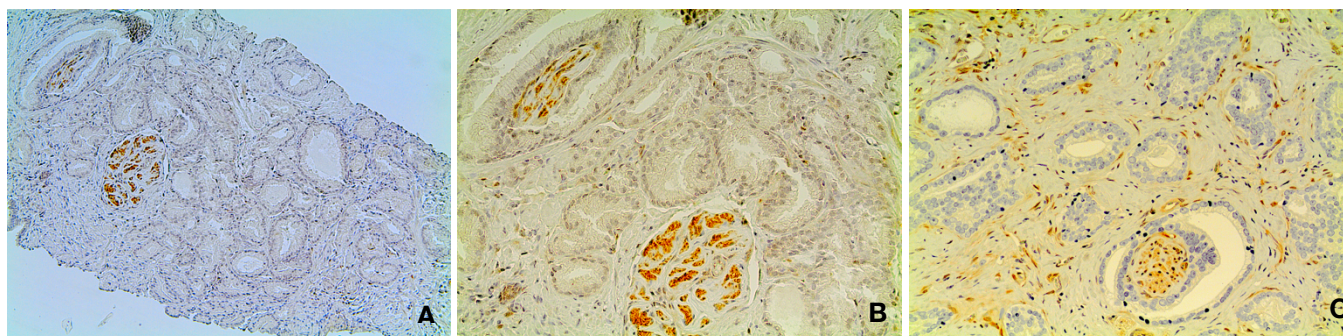


Figura 6 – Expressão de PTEN por IH em biópsia prostática. A) Amostra tumoral (Gleason 3+3) apresentando perda da imunoexpressão nuclear de PTEN. Podemos observar o contraste com o filete nervoso (controle interno) circundado por tumor. Immunoperoxidase, 100x. B) Detalhe do caso A. Immunoperoxidase, 400x. C) Contraste da neoplasia com os elementos estromais e a perda de expressão do PTEN. Immunoperoxidase, 200x.

3.5 Correlação prognóstica da fusão TMPRSS2:ERG e da perda do PTEN no câncer de próstata de muito baixo risco

3.5.1 Série de vigilância ativa

As expressões das proteínas ERG e PTEN no tumor Gleason 6 na biópsia de próstata, analisadas isoladamente e em conjunto, foram correlacionadas com os critérios de progressão abaixo descritos, durante a VA, a fim de caracterizá-los como marcadores de prognóstico no CaP de muito baixo risco:

- Escore de Gleason > 6 na biópsia confirmatória ou nas biópsias de seguimento;
- Número de fragmentos positivos > 3 na biópsia confirmatória ou nas biópsias de seguimento;
- Presença de > 50% de envolvimento de qualquer fragmento acometido na biópsia confirmatória ou nas biópsias de seguimento;
- Surgimento de PSA >10 ng/mL ou progressão do estágio clínico > cT2a durante o seguimento.

As expressões de ERG e PTEN na biópsia e espécime cirúrgico também foram correlacionadas com a ocorrência dos seguintes achados desfavoráveis

no produto de PR nos casos com progressão tratados com cirurgia: escore de Gleason ≥ 7 , estágio patológico $\geq pT3$, margens cirúrgicas positivas e diâmetro tumoral > 19 mm do nódulo dominante.

O significado da quantificação tumoral no prognóstico do CaP é controverso, inclusive com falta de consenso para o melhor método para avaliação. As maneiras mais comumente utilizadas são a estimativa visual do volume tumoral e máximo diâmetro tumoral (MDT) do nódulo índice. O parâmetro de volume tumoral no espécime cirúrgico como fator prognóstico permanece assunto controverso na literatura. Diversos autores não encontraram associação do volume tumoral com piores desfechos anátomo-patológicos, em análise multivariada (79-82). Porém encontramos descrição de volume tumoral como preditor independente de pior desfecho (14, 83-85). Uma das dificuldades em se avaliar o volume tumoral é o procedimento dispendioso e demorado, além da necessidade de análise complexa por meio de métodos computadorizados. Um trabalho clássico de Stamey (86), baseado em espécimes cirúrgicos de cistoprostatectomia radical para tratamento do câncer de bexiga, descreveu o cut-off de volume tumoral de $0,5 \text{ cm}^3$ para definição de câncer significativo, e que foi confirmado por outros autores (87). O MDT do nódulo dominante é uma medida simples e comum (88, 89), e mostrou impacto na recorrência bioquímica em algumas grandes séries (89-91). No entanto, MDT também não se correlacionou com maior falha bioquímica em outras séries (92-94). Devido à controvérsia do papel da quantificação tumoral no CaP, no nosso estudo consideramos o MDT do nódulo dominante, devido sua objetividade e simplicidade, e fácil reprodutibilidade (92, 95).

Correlacionamos as expressões de PTEN e ERG, isoladamente e em conjunto, na biópsia e espécime cirúrgico com a sobrevida livre de recidiva bioquímica, que foi definida por PSA $> 0,2$ ng/mL nos pacientes submetidos à PR e aumento absoluto de PSA de 2 ng/mL acima do nadir nos pacientes submetidos à radioterapia externa. Comparamos também as imunoexpressões de ERG *versus* PTEN na biópsia e no espécime cirúrgico nos pacientes com progressão tratados com cirurgia.

Correlacionamos a piora da classificação de PI-RADS com as expressões proteicas de ERG e PTEN na biópsia. Realizamos análise univariada e

multivariada dos preditores de progressão por escore de Gleason durante a VA, incluindo dados clínico-patológicos (PSA, PSA_d, número de fragmentos, porcentagem do fragmento acometido), escore de PI-RADS e imunoexpressão de ERG e PTEN.

3.5.2 Série de candidatos à vigilância ativa e tratados com cirurgia

A análise das expressões das proteínas ERG e PTEN na biópsia de próstata e no espécime cirúrgico de prostatectomia radical, isoladamente e em conjunto, foram correlacionadas com os seguintes dados anátomo-patológicos desfavoráveis: escore de Gleason ≥ 7 , estágio patológico pT3, margens cirúrgicas positivas e diâmetro tumoral $> 19\text{mm}$, além da recidiva bioquímica e da sobrevida livre de recidiva bioquímica. Igualmente à série de VA, avaliamos as imunoexpressões de ERG *versus* PTEN, tanto na biópsia quanto no espécime cirúrgico.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa STATA versão 16.0 (StataCorp LP, *College Station*, Texas). A distribuição de frequências (número de casos e percentual) foi utilizada para descrever as variáveis categóricas e as medidas de tendência central (média e mediana) e de variabilidade (variação e desvio-padrão) para as variáveis numéricas. O teste de frequências do qui-quadrado foi empregado para explorar as associações entre PTEN e ERG com as variáveis clínicas e patológicas em tabelas de contingência, e o teste exato de Fisher em tabelas 2x2 quando pelo menos uma frequência esperada foi menor que 5. O modelo de regressão logística foi considerado para estimar a razão de chances (*Odds Ratio*) e respectivo intervalo de confiança (IC) de 95% a fim de verificar o grau de associação/impacto entre as variáveis. Verificou-se a associação entre a expressão destes marcadores com a progressão durante a VA de acordo com os 4 critérios adotados e a classificação de PI-RADS. Para análise da razão de chances na progressão por escore de Gleason, foram utilizados modelos de regressão logística univariada e

multivariada, incluindo ou não a RM, através da técnica *stepwise* e seleção *backward*.

Nos casos com progressão e que foram tratados com cirurgia ou radioterapia, a técnica de Kaplan Meier foi utilizada para estimar a probabilidade de sobrevida livre de recidiva bioquímica e as curvas de sobrevida das variáveis foram comparadas através do teste de *logrank*. Os riscos relativos (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% foram estimados através do modelo de regressão de Cox.

Na série de pacientes com critérios para vigilância ativa e que foram operados, as mesmas análises estatísticas foram aplicadas, com exceção da correlação com a progressão, já que nenhum destes pacientes foi conduzido com vigilância ativa.

O nível de significância de 5% foi considerado para todos os testes estatísticos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Série de pacientes em vigilância ativa

4.1.1 Características clínico-demográficas e seguimento

Dos 120 pacientes iniciais, excluimos 3 pela impossibilidade de recuperação da biópsia original externa, 1 pela ausência de neoplasia maligna na revisão anátomo-patológica, e 1 por reclassificação para ISUP grau 2 na revisão de lâmina. E por fim em outros 14 pacientes havia material insuficiente na biópsia inicial para prosseguir com as análises imuno-histoquímicas. A tabela 1 mostra as características demográficas e clínicas dos 101 pacientes inclusos no protocolo de VA, e a tabela 2 mostra os resultados das biópsias iniciais, confirmatórias e rebiópsias durante o seguimento.

Tabela 1 – Características clínico-demográficas dos pacientes em VA

		Pacientes (n=101)
Idade à entrada do estudo, em anos,	Média (Desvio Padrão)	66,49 (6,18)
	Mediana (mínima - máxima)	67 (50 - 75)
Volume próstata*, em mL	Média (Desvio Padrão)	57,9 (22,15)
	Mediana (mínima - máxima)	55,0 (22,5 - 137)
PSA, em ng/mL,	Média (Desvio Padrão)	6,1 (2,16)
	Mediana (mínima - máxima)	6,0 (1,2 - 10,0)
PSAd**,	Média (Desvio Padrão)	0,11 (0,04)
	Mediana (mínima – máxima)	0,12 (0,03 - 0,15)

PSA= Antígeno prostático específico. *medido por Ultrassonografia Trans-retal.

**densidade de PSA (valor PSA/volume da próstata).

Tabela 2 – Características das biópsias no protocolo de VA

	ausência de tumor	Escore de Gleason				Número de fragmentos positivos		Porcentagem dos fragmentos acometidos	
		3+3	3+4	4+3	4+4	≤3	>3	≤50%	>50%
biópsia original (N=101)	-	101	-	-	-	101	-	101	-
biópsia confirmatória (N=101)	17	38	32	12	2	48	36	60	24
2ª re-biópsia (N=27)	8	9	8	1	1	12	7	14	5
3ª re-biópsia (N=9)	2	5	2	-	-	5	2	6	1

Dados são N (números).

O tempo máximo de permanência dos pacientes no protocolo de VA, da data do recrutamento até a análise dos dados, foi de 7 anos. A progressão geral durante o seguimento é mostrada na figura 7. Durante os primeiros 12 meses de vigilância, dos 101 pacientes iniciais, 59 apresentaram algum dos 4 critérios de progressão, com 57 pacientes sendo retirados do protocolo e submetidos à intervenção (tabela 3).

Durante o seguimento médio de 4,1 anos, 81 pacientes apresentaram algum critério de progressão, sendo 60 deles com progressão do escore de Gleason (com ou sem outros critérios associados). Após a terceira re-biópsia, 23 pacientes permaneceram em VA no seguimento médio de 61,8 meses; e 74 pacientes foram submetidos a tratamento curativo (53 com PR e 21 com RDT), com 2 pacientes tratados com hormonioterapia definitiva devido comorbidades clínicas (um com progressão por escore de Gleason e outro por elevação de PSA). Dos pacientes submetidos à PR, 3 foram tratados por desejo do paciente e sem critérios de progressão. Dois pacientes operados evoluíram a óbito (um deles 42 dias após PR por evento coronariano agudo, e outro 3 anos após a prostatectomia radical por neoplasia de reto metastático).

Dos 53 pacientes operados, 2 realizaram procedimento cirúrgico em serviço externo. Dos 51 restantes e avaliados, 10 apresentaram no espécime cirúrgico escore de Gleason 6 e 41 escore de Gleason ≥ 7 ; 37 apresentaram estágio patológico pT2 e 14 estágio pT3; 39 apresentaram margens cirúrgicas livres e 12 margens cirúrgicas positivas; e 35 tinham diâmetro tumoral ≤ 19 mm e 16 diâmetro tumoral > 19 mm.

No seguimento pós-tratamento médio de 39,7 meses, 7 pacientes apresentaram recidiva bioquímica. Nenhum dos 21 pacientes submetidos à radioterapia externa apresentou RB.

Tabela 3 – Seguimento durante VA (continua)

Tempo de Seguimento	VA	Status durante/ao final do período	Progressão até o final do período		
Primeiro ano (biópsia confirmatória)	101	manteve VA tratamento curativo	42*	sem progressão	42**
			57**	qualquer progressão	59
		PR	42	apenas progressão por escore Gleason	14
		RDT	15	apenas progressão por n. fragmentos	7
		HT	2***	apenas progressão por % fragmentos acometidos	1
				apenas progressão por PSA	1
		progressão por Gleason e n. fragmentos	9		
		progressão por Gleason e % fragmentos acometidos	3		
		progressão por n. e % fragmentos acometidos	3		
		progressão por Gleason, n. fragmentos e % fragmentos acometidos	16		
		progressão por n. fragmentos e PSA	1		
		progressão por Gleason e PSA	3		
		progressão por Gleason, % fragmentos e PSA	1		
		progressão por todos os critérios	0		

Tabela 3 – Seguimento durante VA (conclusão)

Tempo de Seguimento	VA	Status durante/ao final do período	Progressão até o final do período		
Segundo ao	42	mantteve VA tratamento curativo	27	Sem progressão	24
Terceiro ano			14	qualquer progressão	17
(2ª re-biópsia)		PR	9	apenas progressão por escore Gleason	1
		RDT	5	apenas progressão por n. fragmentos	1
		Óbito	1****	apenas progressão por PSA	4
				progressão por Gleason e n. fragmentos	3
				progressão por Gleason e % fragmentos acometidos	2
		progressão por n. e % fragmentos acometidos	1		
		progressão por Gleason, n. fragmentos e % fragmentos acometidos	3		
		progressão por Gleason e PSA	2		
Quarto ao	27	mantteve VA tratamento curativo	23	sem progressão	22
Quinto ano			3	qualquer progressão	5
(3ª re-biópsia)		PR	2	apenas progressão por escore Gleason	1
		RDT	1	apenas progressão por n. fragmentos	1
		perda de seguimento	1	apenas progressão por PSA	1
				progressão por Gleason, n. fragmentos e % fragmentos acometidos	1
				progressão por Gleason e n. fragmentos	1

VA= Vigilância Ativa; PR= Prostatectomia Radical; RDT= Radioterapia Externa; HT=Hormonioterapia; PSA= Antígeno prostático específico; Dados em números.

*3 pacientes com progressão optaram manter VA; **3 pacientes optaram por tratamento curativo (cirurgia) sem nenhum fator de progressão; 2 realizaram cirurgia em serviço externo; ***devido comorbidades clínicas (cardiovasculares + insuficiência renal); ****óbito por cirrose hepática no seguimento.

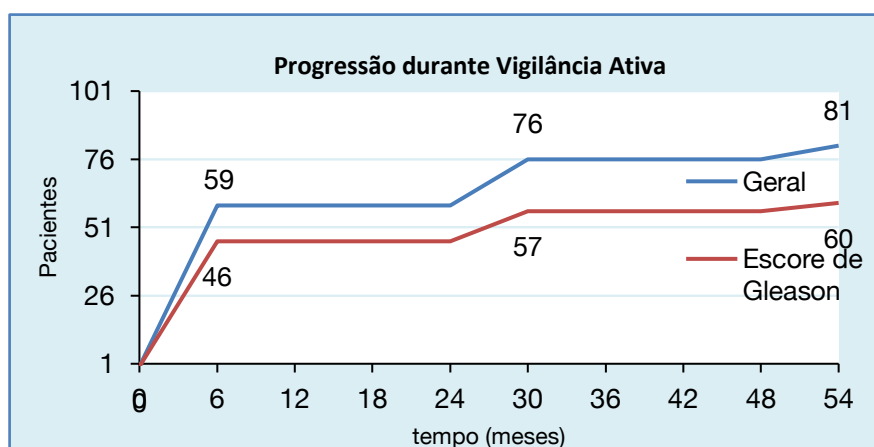


Figura 7 – Progressão geral e por escore de Gleason durante Vigilância Ativa em 101 pacientes com CaP de muito baixo risco

4.1.2 Imunoexpressões de ERG e PTEN em biópsia e espécime cirúrgico na série de vigilância ativa

Dos 101 casos, 6 apresentaram resultado não-avaliável para PTEN e 5 para ERG na biópsia, devido ausência de tumor na lâmina (N=1) ou impossibilidade de leitura da reação (N=10). As expressões de ERG, PTEN e suas combinações, em biópsia, são mostradas na tabela 4. Observamos que a expressão positiva de ERG ocorreu em 38 (39,6%) dos casos, e ausência de expressão em 58 (60,4%) casos. Já expressão negativa (perda) de PTEN foi vista em 12 (12,6%) casos, com expressão positiva em 83 (87,4%) casos.

Dos 51 pacientes operados nesta série, encontramos expressão positiva de ERG no espécime cirúrgico em 18 (35,3%) casos, e expressão negativa em 33 (64,7%) dos casos. Em relação ao PTEN, foi observada expressão negativa em 21 (41,2%) casos, e expressão positiva em 30 (58,8%) casos (tabela 5).

Tabela 4 – Imunoexpressão de ERG e PTEN em biópsia, em 101 pacientes em VA

ERG	N (%)	PTEN	N (%)
Positivo	38 (39,6)	Positivo	83 (87,4)
Negativo	58 (60,4)	Negativo	12 (12,6)
NA	5	NA	6
ERG – / PTEN +	51 (53,7)		
ERG + / PTEN +	32 (33,7)		
ERG – / PTEN –	6 (6,3)		
ERG + / PTEN –	6 (6,3)		

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; NA= não avaliável.

Tabela 5 – Imunoexpressão de ERG e PTEN no espécime cirúrgico, em 51 pacientes operados na série de VA

ERG	N (%)	PTEN	N (%)
Positivo	18 (35,3)	Positivo	30 (58,8)
Negativo	33 (64,7)	Negativo	21 (41,2)
ERG – / PTEN +	18 (35,3)		
ERG + / PTEN +	12 (23,5)		
ERG – / PTEN –	15 (29,4)		
ERG + / PTEN –	6 (11,8)		

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; NA= não avaliável.

4.1.3 Correlação da imunoexpressão de ERG em biópsia com os critérios de progressão e os fatores prognósticos na série de vigilância ativa

Na tabela 6 estão as correlações entre a expressão de ERG na biópsia e chance de progressão geral e também de acordo com os 4 critérios de progressão adotados, enquanto a tabela 7 mostra a correlação com a classificação de PI-RADS da RM. Não houve associação entre a expressão positiva de ERG com a chance de progressão geral durante a VA (78,9% contra 74,1%, $p=0,589$).

Encontramos tendência ($p=0,173$) à progressão por aumento do escore de Gleason no grupo ERG positivo (65,8% contra 51,7%). Não encontramos diferença significativa quanto aos critérios de progressão número de fragmentos acometidos, porcentagem de acometimento ou elevação de PSA >10 ng/mL. Em relação ao aumento do escore de PI-RADS, notamos diferença significativa entre os grupos, com percentual maior de PIRADS ≥ 4 no grupo com expressão positiva de ERG (78,9% contra 56,9%, $p=0,026$). Pelo *Odds Ratio*, temos que a chance de aumento do PI-RADS com a expressão positiva de ERG é 2,8 vezes maior que no grupo ERG negativo (tabela 7).

Tabela 6 – Correlação da imunoexpressão de ERG em biópsia de acordo com os critérios de progressão durante a VA em 96 pacientes

Variável	Categoria	ERG Bx		p-valor	OR	IC95%
		Positivo N (%)	Negativo N (%)			
Progressão geral	Sim	30 (78,9)	43 (74,1)	0,589	1,308	0,493 ; 3,474
	Não	8 (21,1)	15 (25,9)			
Progressão por escore de Gleason	≥ 7	25 (65,8)	30 (51,7)	0,173	1,795	0,771 ; 4,179
	≤ 6	13 (34,2)	28 (48,3)			
Progressão por número fragmentos	> 3	18 (47,4)	20 (34,5)	0,207	1,710	0,741; 3,945
	≤ 3	20 (52,6)	38 (65,5)			
Progressão por % fragmentos	> 50	12 (31,6)	14 (24,1)	0,422	1,450	0,583 ; 3,607
	≤ 50	26 (68,4)	44 (75,9)			
Progressão por PSA	> 10	5 (13,2)	9 (15,5)	0,749	0,825	0,254 ; 2,682
	≤ 10	33 (86,8)	49 (84,5)			

ERG= *ETS-related gene*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; PSA= antígeno prostático específico.
p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Tabela 7 – Correlação da imunoexpressão de ERG em biópsia de acordo com escore de PI-RADS durante a VA em 96 pacientes

Variável	Categoria	ERG Bx		p-valor	OR	IC95%
		Positivo N (%)	Negativo N (%)			
PI-RADS	≥ 4	30 (78,9)	33 (56,9)	0,026	2,841	1,113 ; 7,252
	< 4	8 (21,1)	25 (43,1)			

ERG= *ETS-related gene*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; PI-RADS= *Prostate Image Reporting and Data System*.
p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Nos 51 pacientes tratados com cirurgia, encontramos expressão positiva de ERG na biópsia em 21 deles, e expressão negativa em 29 deles (e um caso com ERG não-avaliável). Dos 21 casos tratados com radioterapia por progressão, encontramos expressão positiva de ERG na biópsia em 8 deles, e expressão negativa em 13 deles.

Na tabela 8 estão as correlações entre a expressão de ERG na biópsia e os fatores prognósticos do espécime cirúrgico. Observamos tendência à margem cirúrgica positiva com a expressão positiva de ERG ($p=0,189$). Não encontramos correlações significativas no restante das comparações.

Tabela 8 – Correlação da imunexpressão de ERG em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 50 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG Bx		p-valor	OR	IC95%
		Positivo N (%)	Negativo N (%)			
Escore de Gleason	≥7	16 (76,2)	24 (82,8)	0,723	0,667	0,166 ; 2,681
	≤6	5 (23,8)	5 (17,2)			
Estádio patológico	PT3	5 (23,8)	9 (31)	0,574 *	0,694	0,194 ; 2,487
	PT2	16 (76,2)	20 (69)			
Margem cirúrgica	Positiva	7 (33,3)	5 (17,2)	0,189 *	2,400	0,639 ; 9,015
	Negativa	14 (66,7)	24 (82,8)			
Diâmetro tumoral	>19mm	8 (38,1)	8 (27,6)	0,432 *	1,615	0,487 ; 5,361
	≤19mm	13 (61,9)	21 (72,4)			

ERG= *ETS-related gene*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança. p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

4.1.4 Correlação da imunexpressão de ERG no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos na série de vigilância ativa

Avaliamos a expressão de ERG no espécime cirúrgico por TMA em 51 pacientes e encontramos 18 casos com expressão positiva de ERG e 33 com expressão negativa. Não encontramos correlações com as características anátomo-patológicas (tabela 9).

Tabela 9 – Correlação da imunexpressão de ERG no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 51 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG PR		p-valor	OR	IC95%
		Positivo N (%)	Negativo N (%)			
Escore de Gleason	≥7	13 (72,2)	28 (84,8)	0,296	0,464	0,114 ; 1,889
	≤6	5 (27,8)	5 (15,2)			
Estádio patológico	PT3	5 (27,8)	9 (27,3)	0,969 *	1,026	0,284 ; 3,707
	PT2	13 (72,2)	24 (72,7)			
Margem cirúrgica	Positiva	6 (33,3)	6 (18,2)	0,304	2,250	0,601 ; 8,424
	Negativa	12 (66,7)	27 (81,8)			
Diâmetro tumoral	>19mm	7 (38,9)	9 (27,3)	0,393 *	1,697	0,502 ; 5,740
	≤19mm	11 (61,1)	24 (72,7)			

ERG= *ETS-related gene*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

4.1.5 Correlação da imunexpressão de PTEN em biópsia com os critérios de progressão e os fatores prognósticos na série de vigilância ativa

A expressão de PTEN por IH nas 101 biópsias, excluindo os 6 casos não-avaliáveis, foi positiva em 83 casos e negativa em 12 casos (tabela 4). As correlações da expressão do PTEN com a progressão são mostradas na tabela 10. Não foi encontrada correlação entre progressão geral durante VA com expressão negativa de PTEN na biópsia. Já em relação à progressão pelo aumento do escore de Gleason, notamos diferença significativa entre os grupos, com percentual maior de Gleason ≥7 no grupo com expressão negativa de PTEN (91,7% contra 53%, $p=0,011$). Observamos que a chance de progressão por aumento do escore de Gleason foi 9,7 vezes maior nos pacientes com expressão negativa de PTEN. No restante das correlações com os outros critérios, não foram vistas diferenças significativas, com tendência a maior escore de PI-RADS com expressão de PTEN negativo ($p=0,055$), tabela 11.

Tabela 10 – Correlação da imunoposição de PTEN em biópsia de acordo com os critérios de progressão durante a VA em 95 pacientes

Variável	Categoria	PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		Negativo N (%)	Positivo N (%)			
Progressão geral	Sim	11 (91,7)	61 (73,5)	0,282	3,967	0,484 ; 32,538
	Não	1 (8,3)	22 (26,5)			
Progressão por escore de Gleason	≥7	11 (91,7)	44 (53)	0,011 *	9,750	1,203 ; 78,987
	≤6	1 (8,3)	39 (47)			
Progressão por número fragmentos	>3	6 (50)	32 (38,5)	0,449 *	1,594	0,473 ; 5,370
	≤3	6 (50)	51 (61,5)			
Progressão por % fragmentos	>50	4 (33,3)	22 (26,5)	0,730	1,386	0,379 ; 5,064
	≤50	8 (66,7)	61 (73,5)			
Progressão por PSA	>10	2 (16,7)	11 (13,3)	0,667	1,309	0,252 ; 6,785
	≤10	10 (83,3)	72 (86,7)			

PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; N=número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; PSA= antígeno prostático específico.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Tabela 11 – Correlação da imunoposição de PTEN em biópsia de acordo com escore de PI-RADS durante a VA em 95 pacientes

Variável	Categoria	PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		Negativo N (%)	Positivo N (%)			
PI-RADS	≥4	11 (91,7)	52 (62,6)	0,055	6,558	0,807; 53,277
	<4	1 (8,3)	31 (37,4)			

PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; N=número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; PI-RADS= *Prostate Image Reporting and Data System*.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Nos 51 pacientes tratados com cirurgia, a expressão positiva de PTEN na biópsia ocorreu em 45 deles, e expressão negativa em 4 casos, sendo 2 casos não-avaliáveis. Dos 21 casos tratados com radioterapia por progressão, encontramos expressão positiva de PTEN na biópsia em 15 deles, e expressão negativa em 6. Na tabela 12 estão as correlações entre a expressão do PTEN

na biópsia e os fatores prognósticos do espécime cirúrgico. Não foi encontrada nenhuma correlação significativa.

Tabela 12 – Correlação da imunexpressão de PTEN em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 49 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		Negativo N (%)	Positivo N (%)			
Escore de Gleason	≥7	4 (100,0)	36 (80,0)	1,000	—	— ; —
	≤6	0 (0,0)	9 (20,0)			
Estádio patológico	PT3	2 (50,0)	12 (26,7)	0,568	2,750	0,347 ; 21,757
	PT2	2 (50,0)	33 (73,3)			
Margem cirúrgica	Positiva	1 (25,0)	11 (24,4)	0,999	1,030	0,097 ; 10,946
	Negativa	3 (75,0)	34 (75,6)			
Diâmetro tumoral	>19mm	2 (50,0)	13 (28,9)	0,576	2,461	0,313 ; 19,376
	≤19mm	2 (50,0)	32 (71,1)			

PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N=número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

4.1.6 Correlação da imunexpressão de PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos na série de vigilância ativa

No espécime cirúrgico de 51 pacientes, encontramos 21 com expressão negativa de PTEN e 30 com expressão positiva (tabela 5). Correlacionamos a imunexpressão com as características anátomo-patológicas de escore de Gleason, estágio patológico, margem cirúrgica e diâmetro tumoral, e não obtivemos nenhuma correlação significativa (tabela 13).

Tabela 13 – Correlação da imunoexpressão de PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 51 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		Negativo N (%)	Positivo N (%)			
Escore de Gleason	≥7	17 (81,0)	24 (80,0)	0,933	1,062	0,259 ; 4,350
	≤6	4 (19,0)	6 (20,0)			
Estádio patológico	PT3	6 (28,6)	8 (26,7)	0,881 *	1,100	0,316 ; 3,822
	PT2	15 (71,4)	22 (73,3)			
Margem cirúrgica	Positiva	6 (28,6)	6 (20,0)	0,478 *	1,600	0,435 ; 5,886
	Negativa	15 (71,4)	24 (80,0)			
Diâmetro tumoral	>19mm	6 (28,6)	10 (33,3)	0,718 *	0,800	0,238 ; 2,692
	≤19mm	15 (71,4)	20 (66,7)			

PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N=número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

4.1.7 Avaliação conjunta da imunoexpressão de ERG e PTEN em biópsia com os critérios de progressão e fatores prognósticos na série de vigilância ativa

Na tabela 14, mostramos a distribuição dos pacientes, considerando-se as combinações entre expressão de ERG e PTEN por IH em amostras de biópsia com a chance de progressão durante a VA. A baixa amostragem das combinações ERG positivo e PTEN negativo (N=6) e ERG negativo e PTEN negativo (N=6) prejudicaram a análise das correlações nestes dois subgrupos.

Tabela 14 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de acordo com os critérios de progressão e escore de PI-RADS em 95 pacientes durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx			
		ERG Positivo + PTEN Negativo (%)	ERG Positivo + PTEN Positivo (%)	ERG Negativo + PTEN Positivo (%)	ERG Negativo + PTEN Negativo (%)
Progressão geral	Sim	6 (100,0)	24 (75,0)	37 (72,5)	5 (83,3)
	Não	0 (00,0)	8 (25,0)	14 (27,5)	1 (16,7)
Progressão por escore de Gleason	≥7	6 (100,0)	19 (59,4)	25 (49,0)	5 (83,3)
	≤6	0 (00,0)	13 (40,6)	26 (51,0)	1 (16,7)
Progressão por número fragmentos	>3	3 (50,0)	15 (46,9)	17 (33,3)	3 (50,0)
	≤3	3 (50,0)	17 (53,1)	34 (66,7)	3 (50,0)
Progressão por % fragmentos	>50%	2 (33,3)	10 (31,2)	12 (23,5)	2 (33,3)
	≤50%	4 (66,7)	22 (68,8)	39 (76,5)	4 (66,7)
Progressão por PSA	>10	1 (16,7)	4 (12,5)	7 (13,7)	1 (16,7)
	≤10	5 (83,3)	28 (87,5)	44 (86,3)	5 (83,3)
PI-RADS	≥4	6 (100,0)	24 (75,0)	28 (54,9)	5 (83,3)
	<4	0 (00,0)	8 (25,0)	23 (45,1)	1 (16,7)

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N=número; PSA= Antígeno prostático específico; PI-RADS= *Prostate Image Reporting and Data System*.

Considerando a chance de progressão geral, não houve correlação significativa entre uma combinação específica (tabela 15 e anexos A, B, C). Em relação ao PI-RADS, observamos que a expressão negativa de ERG e positiva de PTEN se correlacionou com a classificação de PI-RADS menor que 4 ($p=0,011$), tabela 16. Pelo critério de progressão pelo aumento do escore de Gleason, encontramos significância marginal entre a combinação de expressão negativa de ERG e positiva de PTEN com menor escore de Gleason ($p=0,059$). Encontramos também tendência ao menor número de fragmentos acometidos com a combinação ERG negativo e PTEN positivo ($p=0,153$).

Tabela 15 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG negativo e PTEN positivo em biópsia com os critérios de progressão em 95 pacientes durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Positivo	Restante			
Progressão Geral	Sim	37 (72,5)	35 (79,5)	0,427	0,679	0,261 ; 1,768
	Não	14 (27,5)	9 (20,5)			
Progressão por escore de Gleason	≥7	25 (49,0)	30 (68,2)	0,059	0,449	0,194 ; 1,038
	≤6	26 (51,0)	14 (31,8)			
Progressão por número fragmentos	>3	17 (33,3)	21 (47,7)	0,153	0,548	0,239 ; 1,256
	≤3	34 (66,7)	23 (52,3)			
Progressão por %fragmentos	>50	12 (23,5)	14 (31,8)	0,366	0,659	0,266 ; 1,632
	≤50	39 (76,5)	30 (68,2)			
Progressão por PSA	>10	7 (13,7)	6 (13,6)	0,999	1,007	0,311 ; 3,258
	≤10	44 (86,3)	38 (86,4)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; dados em número e (%); PSA= Antígeno prostático específico.
p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Tabela 16 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG negativo e PTEN positivo em biópsia com escore de PI-RADS em 95 pacientes durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Positivo	Restante			
PI-RADS	≥4	28 (54,9)	35 (79,6)	0,011	0,313	0,125 ; 0,783
	<4	23 (45,1)	9 (20,5)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; dados em número e (%); PI-RADS= Prostate Image Reporting and Data System.
p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

Na expressão conjunta dos dois marcadores na biópsia com os fatores prognósticos no espécime cirúrgico em 49 pacientes operados, não encontramos diferenças significativas (tabela 17 e anexos D, E, F, G). No grupo ERG positivo e PTEN negativo, vimos tendência a pior estadiopatológico ($p=0,193$) (anexo D). Na combinação ERG positivo e PTEN positivo, observamos tendência quanto a melhor estadiopatológico ($p=0,160$) (anexo E).

Tabela 17 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de acordo com os fatores prognósticos patológicos de 49 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx			
		ERG Positivo + PTEN Negativo	ERG Positivo + PTEN Positivo	ERG Negativo + PTEN Positivo	ERG Negativo + PTEN Negativo
Escore de Gleason	≥7	3 (100,0)	13 (72,2)	23 (85,2)	1 (100,0)
	≤6	0 (00,0)	5 (27,8)	4 (14,8)	0 (00,0)
Estádio patológico	PT3	2 (66,7)	3 (16,7)	9 (33,3)	0 (00,0)
	PT2	1 (33,3)	15 (83,3)	18 (66,7)	1 (100,0)
Margem cirúrgica	Positiva	1 (33,3)	6 (33,3)	5 (18,5)	0 (00,0)
	Negativa	2 (66,7)	12 (66,7)	22 (81,5)	1 (100,0)
Diâmetro tumoral	>19mm	2 (66,7)	6 (33,3)	7 (25,9)	0 (00,0)
	≤19mm	1 (33,3)	12 (66,7)	20 (74,1)	1 (100,0)

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia, dado em número e (%).

4.1.8 Avaliação conjunta da imunoexpressão de ERG e PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos na série de vigilância ativa

Comparamos as expressões conjuntas de PTEN e ERG em amostras do espécime cirúrgico dispostas em TMA com os fatores prognósticos escore de Gleason, estágio patológico, margem cirúrgica e diâmetro tumoral (distribuição das expressões na tabela 18). Nenhum grupo de expressão conjunta apresentou associação significativa nas correlações entre as expressões e os fatores analisados (anexos H, I, J, K), mas observamos tendência a maior chance de margem positiva nos pacientes ERG positivo e PTEN negativo (anexo H).

Tabela 18 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico de acordo com os fatores prognósticos patológicos de 51 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG Positivo + PTEN Negativo	ERG + PTEN PR		
			ERG Positivo + PTEN Positivo	ERG Negativo + PTEN Positivo	ERG Negativo + PTEN Negativo
Escore de Gleason	≥7	5 (83,3)	8 (66,7)	16 (88,9)	12 (80,0)
	≤6	1 (16,7)	4 (33,3)	2 (11,1)	3 (20,0)
Estádio patológico	PT3	3 (50,0)	2 (16,7)	6 (33,3)	3 (20,0)
	PT2	3 (50,0)	10 (83,3)	12 (66,7)	12 (80,0)
Margem cirúrgica	Positiva	3 (50,0)	3 (25,0)	3 (16,7)	3 (20,0)
	Negativa	3 (50,0)	9 (75,0)	15 (83,3)	12 (80,0)
Diâmetro tumoral	>19mm	2 (33,3)	5 (41,7)	5 (27,8)	4 (26,7)
	≤19mm	4 (66,7)	7 (58,3)	13 (72,2)	11 (73,3)

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; dados em número e (%).

4.1.9 Análise univariada e multivariada dos preditores de progressão por escore de Gleason na série de vigilância ativa

Por ser considerado atualmente o principal fator de progressão do CaP de muito baixo risco em VA, correlacionamos o critério “progressão de Gleason” com os fatores preditores clínicos PSA, PSA_d e escore PI-RADS; preditores patológicos número de fragmentos >3 e porcentagem de fragmentos > 50%, e imunoexpressão de ERG e PTEN na biópsia.

Através do modelo de regressão logística univariada, encontramos que aumento do número de fragmentos ($p=0,004$, OR=3,50), porcentagem de fragmentos > 50% ($p=0,001$, OR=6,63), PI-RADS ≥4 ($p<0,001$, OR=20,51) e perda de PTEN na biópsia ($p=0,011$, OR=9,75) se correlacionaram significativamente com progressão de escore de Gleason ≥7 durante a VA (tabela 19). PSA_d como variável numérica não se correlacionou ($p=0,566$, OR=0,49 e IC95%=0,001-219,86).

No modelo de regressão multivariado através da técnica *stepwise* e seleção *backward*, as variáveis de risco independentes de progressão por

escore de Gleason foram a porcentagem de fragmentos maior que 50% ($p=0,001$, $OR=4,78$) e a presença de PI-RADS ≥ 4 ($p<0,001$, $OR=17,76$) (tabela 20). Excluindo-se o escore de PI-RADS da análise multivariada, as variáveis de risco independentes de progressão por escore de Gleason foram a porcentagem de fragmentos maior que 50% ($p=0,001$, $OR=6,24$) e a perda de expressão de PTEN na biópsia ($p=0,011$, $OR=10,43$) (tabela 21).

Tabela 19 – Modelo de regressão logística univariado dos fatores preditores de progressão por escore de Gleason na série de 101 pacientes em VA

Variável	Categoria	Progressão Gleason		p-valor	OR	IC95%
		G6 ou menor N (%)	G7 ou maior N (%)			
ERG Bx	Negativo	28 (68,3)	30 (54,6)	0,173	1,0	Ref.
	Positivo	13 (31,7)	25 (45,4)		1,80	0,77 ; 4,18
PTEN Bx	Positivo	39 (97,5)	44 (80,0)	0,011	1,0	Ref.
	Negativo	1 (2,5)	11 (20,0)		9,75	1,20 ; 79,99
Número de fragmentos	≤ 3	35 (77,8)	28 (50,0)	0,004	1,0	Ref.
	> 3	10 (22,2)	28 (50,0)		3,50	1,46 ; 8,41
Porcentagem de fragmentos	$\leq 50\%$	41 (91,1)	34 (60,7)	0,001	1,0	Ref.
	$> 50\%$	4 (8,9)	22 (39,3)		6,63	2,08 ; 21,12
PSA	≤ 10	37 (82,2)	50 (89,3)	0,307	1,0	Ref.
	> 10	8 (17,8)	6 (10,7)		0,55	0,18 ; 1,74
PI-RADS	< 4	32 (71,1)	6 (10,7)	<0,001	1,0	Ref.
	≥ 4	13 (28,9)	50 (89,3)		20,51	7,08 ; 59,46

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; PSA= Antígeno prostático específico; PI-RADS= *Prostate Image Reporting and Data System*; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Ref.= valor de referência.
p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Tabela 20 – Modelo de regressão logística multivariado dos fatores preditores de progressão por escore de Gleason na série de 101 pacientes em VA

Variável	Categoria	Progressão Gleason		p-valor	Multivariado	
		G6 ou menor N (%)	G7 ou maior N (%)		OR	IC95%
Porcentagem de fragmentos	≤50%	41 (91,1)	34 (60,7)	0,001	1,0	Ref. 1,21 ; 18,84
	>50%	4 (8,9)	22 (39,3)		4,78	
PI-RADS	<4	32 (71,1)	6 (10,7)	<0,001	1,0	Ref. 5,93 ; 53,23
	≥4	13 (28,9)	50 (89,3)		17,76	

N= número; PI-RADS= *Prostate Image Reporting and Data System*; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Ref.= valor de referência.
p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Tabela 21 – Modelo de regressão logística multivariado dos fatores de progressão por escore de Gleason, com exclusão do escore de PI-RADS, na série de 101 pacientes em VA

Variável	Categoria	Progressão Gleason		p-valor	Multivariado	
		G6 ou menor N (%)	G7 ou maior N (%)		OR	IC95%
Porcentagem de fragmentos	≤50%	41 (91,1)	34 (60,7)	0,001	1,0	Ref. 1,90 ; 20,49
	>50%	4 (8,9)	22 (39,3)		6,24	
PTEN Bx	Positivo	39 (97,5)	44 (80,0)	0,011	1,0	Ref. 1,24 ; 87,56
	Negativo	1 (2,5)	11 (20,0)		10,43	

N= número; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Ref.= valor de referência.
p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

4.1.10 Sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com as imunexpressões de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico de pacientes com progressão e tratados na série de vigilância ativa

Do total de 72 casos tratados em nossa instituição com cirurgia e radioterapia, o tempo de seguimento variou de 1 a 72 meses, com mediana de 42 meses e média (DP) de 39,7 (18,5) meses. A probabilidade de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos foi de 86,9% (figura 8). Ocorreram 7 recidivas bioquímicas no período variando de 18 a 36 meses, com mediana de 24 meses e média (DP) de 26,6 (9,1) meses.

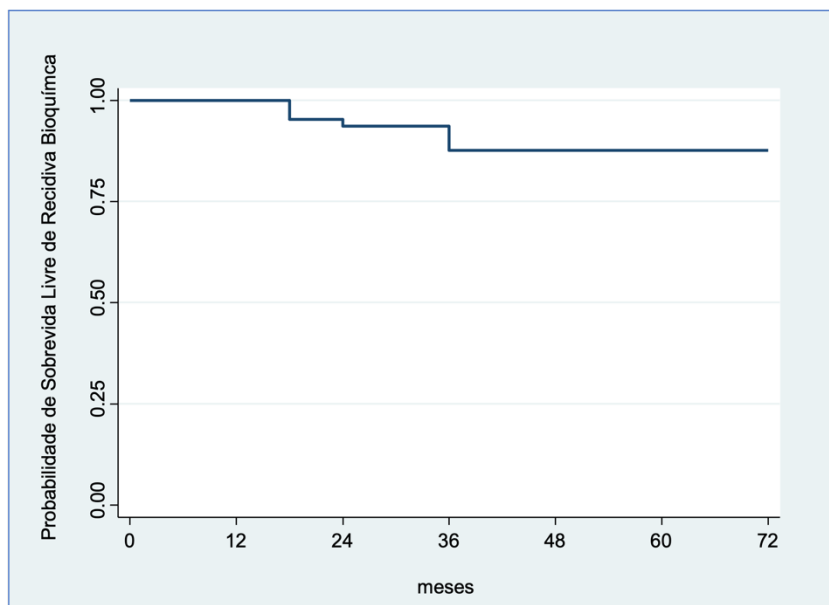


Figura 8 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de pacientes tratados com PR ou RDT durante a VA (N=72)

Tanto expressão positiva de ERG na biópsia quanto no espécime cirúrgico mostraram tendência a pior sobrevida livre de recidiva bioquímica (tabela 22). Modelos de regressão de Cox univariados não puderam ser realizados na análise conjunta de ERG negativo + PTEN negativo na biópsia e espécime cirúrgico devido ausência de recidivas nestas categorias.

Tabela 22 – Probabilidade de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos nos pacientes tratados na série de VA de acordo com a imunexpressão de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico

Variável	Categoria (N casos, N recidiva)	Probabilidade (%) 5-anos	p-valor	RR	IC95%
ERG Bx	Negativo (n=42; n=2)	94,4	0,133	1,0	Ref.
	Positivo (n=29; n=5)	77,3		3,22	0,62 ; 16,6
PTEN Bx	Positivo (n=60; n=6)	86,7	0,865	1,0	Ref.
	Negativo (n=10; n=1)	86,7		0,83	0,10 ; 6,94
ERG Bx + PTEN Bx	Negativo+Positivo (n=37; n=2)	93,6	0,512	1,0	Ref.
	Negativo+Negativo (n=4; n=0)	100,0		-	-
	Positivo+Negativo (n=6; n=1)	77,8		2,38	0,21 ; 26,30
	Positivo+Positivo (n=23; n=4)	77,2		2,87	0,53 ; 15,70
ERG Bx + PTEN Bx	Negativo+Negativo (n=4; n=0)	100,0	0,485	NA	NA
	Restante (n=66 ; n=7)	85,8			
ERG Bx + PTEN Bx	Restante (n=33; n=5)	80,1	0,268	1,0	Ref.
	Negativo+Positivo (n=37; n=2)	93,6		0,41	0,08 ; 2,13
ERG Bx + PTEN Bx	Restante (n=64; n=6)	87,6	0,726	1,0	Ref.
	Positivo+Negativo (n=6; n=1)	77,8		1,45	0,17 ; 12,03
ERG Bx + PTEN Bx	Restante (n=47; n=3)	91,7	0,194	1,0	Ref.
	Positivo+Positivo (n=23; n=4)	77,2		2,56	0,57 ; 11,46
ERG PR	Negativo (n=33)	93,3	0,053	1,0	Ref.
	Positivo (n=18)	69,0		4,28	0,83 ; 22,14
PTEN PR	Positivo (n=30; n=5)	78,4	0,387	1,0	Ref.
	Negativo (n=21; n=2)	88,0		0,50	0,10 ; 2,58
ERG PR + PTEN PR	Negativo+Positivo (n=18; n=2)	87,5	0,193	1,0	Ref.
	Negativo+Negativo (n=15; n=0)	100,0		-	-
	Positivo+Negativo (n=6; n=2)	66,7		2,40	0,34 ; 17,12
	Positivo+Positivo (n=12; n=3)	70,0		2,03	0,34 ; 12,25
ERG PR + PTEN PR	Negativo+Negativo (n=15; n=0)	100,0	0,069	NA	NA
	Restante (n=36; n=7)	76,0			
ERG PR + PTEN PR	Restante (n=33; n=5)	80,8	0,845	1,0	Ref.
	Negativo+Positivo (n=18; n=2)	87,5		0,85	0,16 ; 4,41
ERG PR + PTEN PR	Restante (n=45; n=5)	85,3	0,225	1,0	Ref.
	Positivo+Negativo (n=6; n=2)	66,7		2,60	0,50 ; 13,42
ERG PR + PTEN PR	Restante (n=39; n=4)	87,6	0,220	1,0	Ref.
	Positivo+Positivo (n=12; n=3)	70,0		2,43	0,54 ; 10,89

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; PR= prostatectomia radical; n= número; RR= risco relativo; IC= intervalo de confiança; Ref.= valor de referência; NA= não avaliável.

p-valor obtido pelo teste de *logrank*.

Na figura 9, observamos que os pacientes com expressão de ERG positiva na biópsia apresentaram tendência a menor tempo médio de SLRB em 5 anos quando comparados aos pacientes com expressão negativa - 77,3% vs. 94,4% ($p=0,133$ Log Rank test).

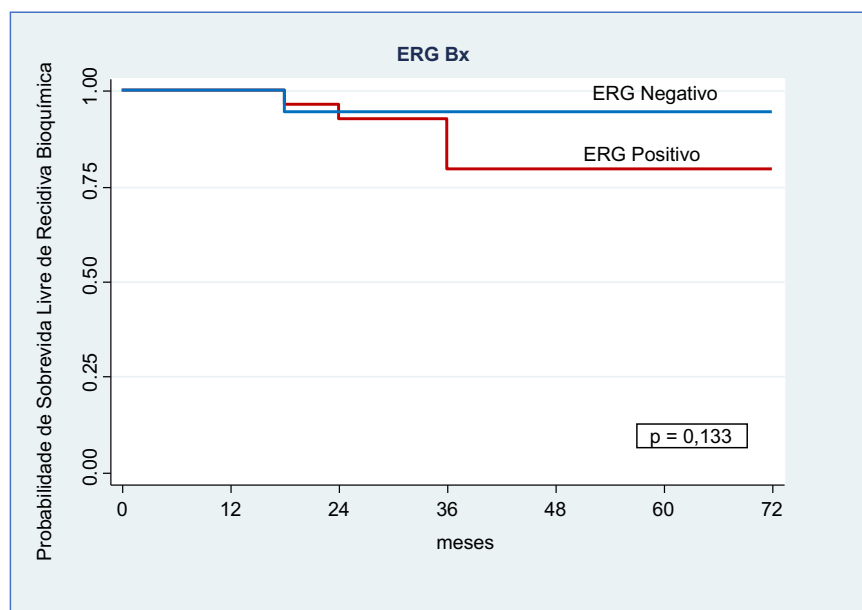


Figura 9 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunoposição de ERG em biópsia de pacientes tratados com PR ou RDT durante a VA (N=71)

Na análise da curva de SLRB de acordo com a expressão de ERG no espécime cirúrgico, observamos novamente que a expressão positiva de ERG apresentou correlação marginal com menor tempo livre de recorrência bioquímica em 5 anos (69% contra 93,3% em 60 meses, $p=0,053$ Log Rank test) (figura 10).

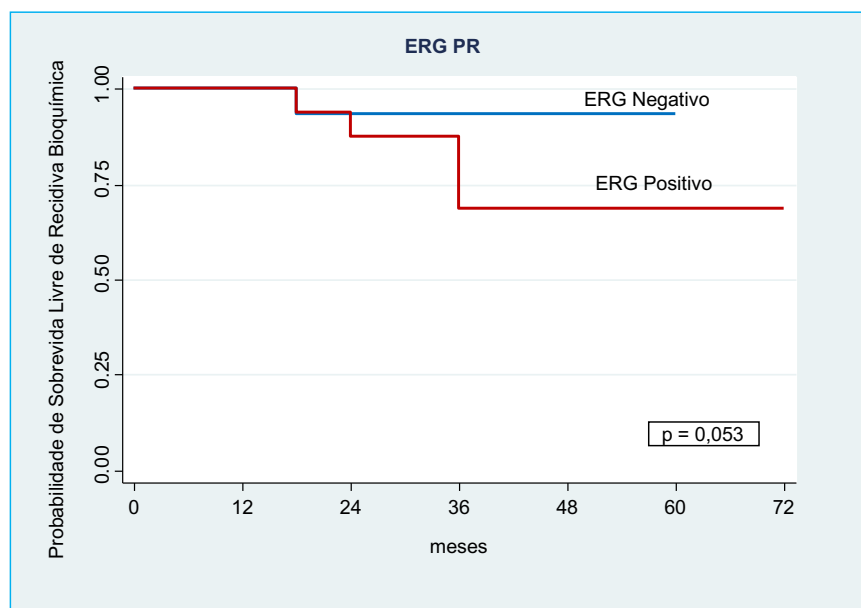


Figura 10 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunopressão de ERG no espécime cirúrgico de pacientes tratados com PR durante a VA (N=51)

Correlacionamos a imunopressão de PTEN na biópsia com o tempo de SLRB nos pacientes submetidos a tratamento curativo durante a VA (N=70) e mostramos na figura 11 que o tempo de SLRB foi igual entre PTEN negativo e positivo (86,7% em 60 meses).

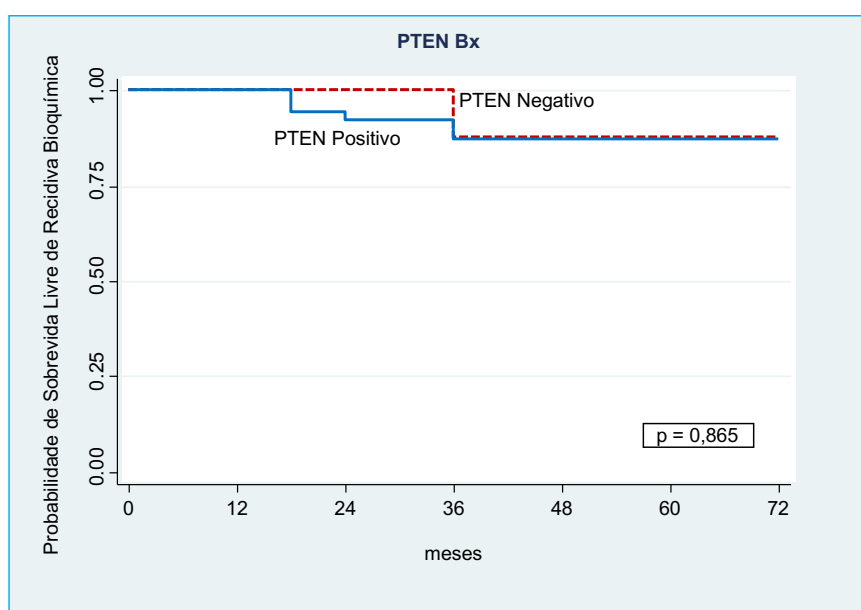


Figura 11 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunopressão de PTEN em biópsia de pacientes tratados com PR ou RDT durante a VA (N=70)

Não observamos associação entre a expressão de PTEN no espécime cirúrgico com o tempo médio de SLRB. A SLRB em relação à expressão de PTEN no espécime cirúrgico foi de 88% em 60 meses nos pacientes PTEN negativo *versus* 78,4% nos casos com PTEN positivo (figura 12).

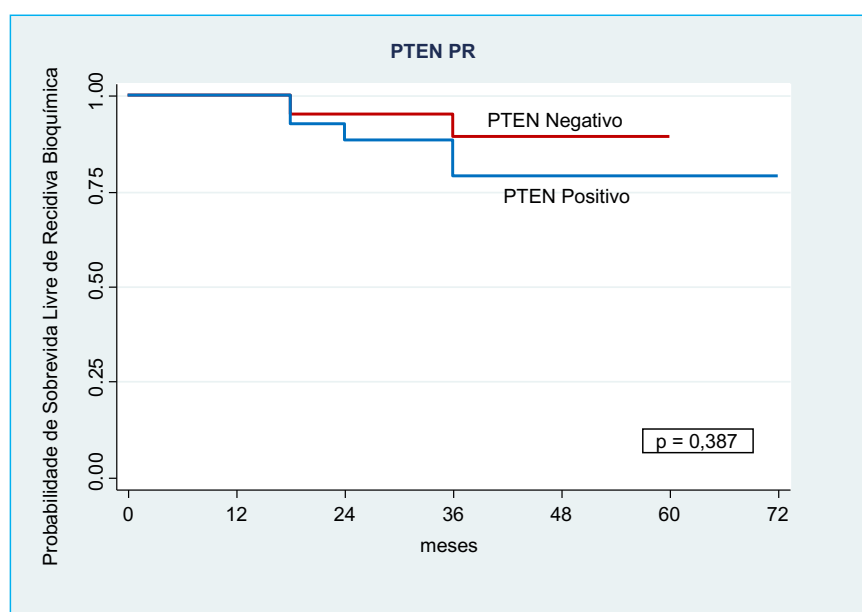


Figura 12 – Curva Kaplan Meier de de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão de PTEN no espécime cirúrgico de pacientes tratados com PR durante a VA (N=51)

Na figura 13, avaliando-se em conjunto a imunoexpressão de ERG e PTEN na biópsia nos pacientes com progressão durante a VA e tratados com PR ou RDT (N=70), não houve diferença entre os grupos quanto à SLRB ($p=0,512$). O grupo ERG positivo e PTEN positivo apresentou a mais baixa SLRB, 77,2% em 60 meses. O grupo ERG negativo e PTEN negativo apresentou SLRB de 100% em 60 meses. O grupo ERG negativo e PTEN positivo apresentou SLRB de 93,6% em 60 meses. E o grupo ERG positivo e PTEN negativo mostrou SLRB de 77,8% em 60 meses.

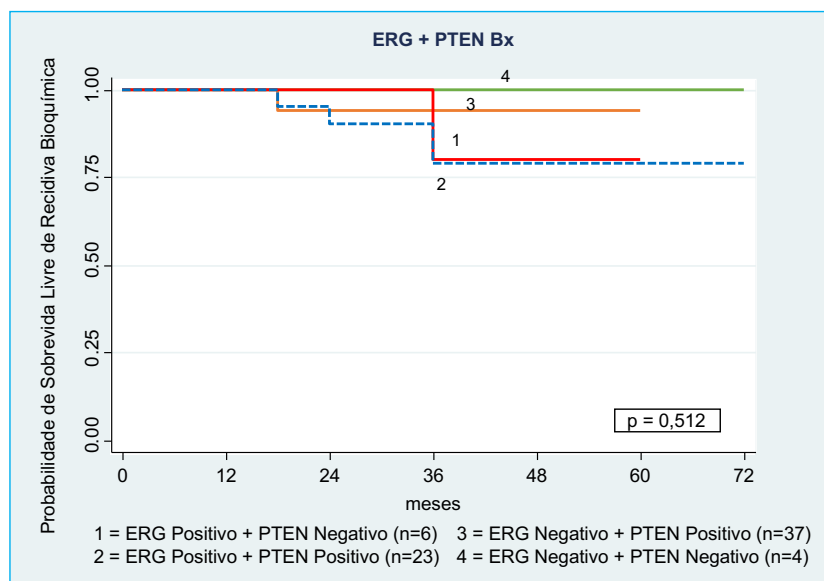


Figura 13 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunoeexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de pacientes tratados com PR ou RDT durante a VA (N=70)

Na expressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico, a SLRB na presença de ERG positivo e PTEN negativo foi de 66,7% em 60 meses; no grupo ERG negativo e PTEN positivo encontramos SLRB de 87,5% em 60 meses. No grupo ERG negativo e PTEN negativo a SLRB foi de 100% em 60 meses. Por fim, no grupo ERG positivo e PTEN positivo, a SLRB foi de 70% em 60 meses (figura 14). Houve tendência de diferença entre os grupos ($p=0,193$).

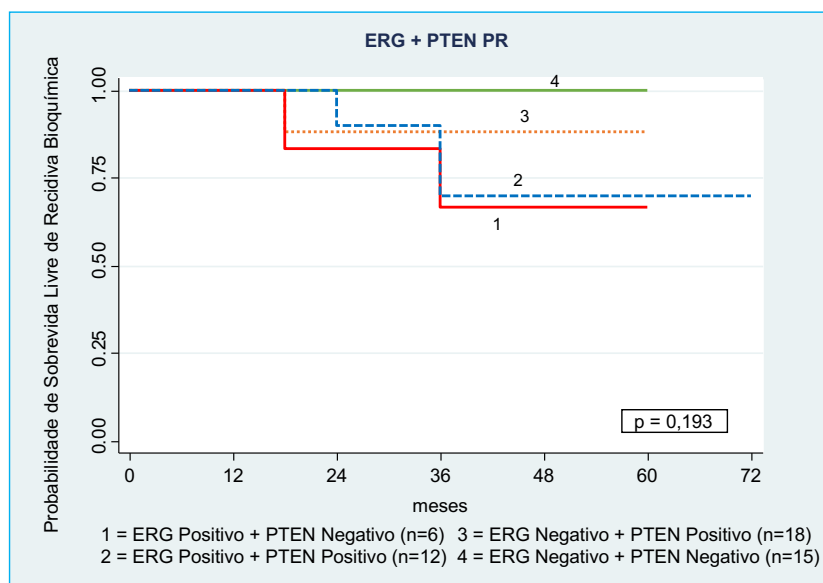


Figura 14 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico de pacientes tratados com PR durante a VA (N=51)

4.1.11 Correlação entre a imunoexpressão do ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico na série de vigilância ativa

Avaliamos a hipótese da expressão de ERG positiva se correlacionar com a perda de PTEN. Mas, tanto na biópsia quanto no espécime cirúrgico, não encontramos correlação significativa nessas associações (tabela 23).

Tabela 23 – Correlação da imunoexpressão positiva de ERG com a imunoexpressão negativa de PTEN em biópsia (N=95) e no espécime cirúrgico (N=51) de pacientes durante a VA

Variável	Categoria	PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		Negativo N (%)	Positivo N (%)			
ERG Bx	Positivo	6 (50,0)	32 (38,5)	0,449	1,594	0,473 ; 5,370
	Negativo	6 (50,0)	51 (61,5)			
PTEN PR						
ERG PR	Positivo	6 (28,6)	12 (40,0)	0,401	0,600	0,181 ; 1,984
	Negativo	15 (71,4)	18 (60,0)			

ERG= ETS-related gene; PTEN= Phosphatase and Tensin Homologue; Bx= biópsia; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= odds ratio; IC= intervalo de confiança. p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

4.2 Série de candidatos à vigilância ativa e tratados com cirurgia

4.2.1 Características clínico-demográficas, seguimento e imunoexpressões de ERG e PTEN na série de pacientes tratados com cirurgia

Dos 109 pacientes incluídos nessa série de validação, em 14 não foi possível a recuperação das lâminas e/ou blocos de parafina das biópsias (tabela 24). Em 6 casos o material na biópsia foi insuficiente para prosseguir com a realização das reações de IH.

Tabela 24 – Características clínico-demográficas dos 109 pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR

		Pacientes (n=109)
Idade à entrada do estudo, em anos,	Média (Desvio Padrão)	65,1 (4,3)
	Mediana (mínima - máxima)	65 (57 - 75)
Volume próstata*, em mL,	Média (Desvio Padrão)	54,7 (14,9)
	Mediana (mínima - máxima)	56,0 (23,0 – 100,0)
PSA, em ng/mL,	Média (Desvio Padrão)	5,7 (2,3)
	Mediana (mínima - máxima)	5,3 (0,9 – 10,0)
PSAd**,	Média (Desvio Padrão)	0,10 (0,03)
	Mediana (mínima – máxima)	0,10 (0,03 – 0,15)

PSA= Antígeno prostático específico. *medido por Ultrassonografia Trans-retal.

**densidade de PSA (valor PSA/volume da próstata).

Prosseguimos nestes 89 pacientes então com a realização das reações de IH para expressão de ERG e PTEN nas biópsias. Vinte e um casos apresentaram resultado não-avaliável para expressão de PTEN e 6 para expressão de ERG, devido ausência de tumor na lâmina (N=1) ou impossibilidade de leitura da reação (N=26), e foram excluídos da análise estatística. A amostra final em biópsia para a expressão de ERG foi de 83 casos e para PTEN de 68 casos (tabela 25).

Obtivemos, dos 109 pacientes iniciais, 93 amostras dos espécimes cirúrgicos para análise IH, sendo possível a análise da expressão dos biomarcadores em todos (tabela 26). O tempo de seguimento variou de 1 a 108 meses, com mediana de 30 meses e média (DP) de 49,2 (43,6) meses. Dos 109 pacientes iniciais, encontramos no espécime cirúrgico os seguintes achados anátomo-patológicos: 71 casos Gleason 6 *versus* 38 casos Gleason \geq 7, 104 casos pT2 *versus* 5 casos pT3, 80 casos margens negativas *versus* 29 casos margens positivas, e 98 casos com diâmetro tumoral \leq 19 mm *versus* 11 casos com diâmetro $>$ 19 mm. Apenas 7 pacientes apresentaram recidiva bioquímica, e o período para ocorrência variou de 12 a 108 meses, com mediana de 30 meses e média (DP) de 44,2 (37,8 meses).

Tabela 25 – Imunoexpressões de ERG e PTEN em 89 biópsias, na série de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR

ERG	N (%)	PTEN	N (%)
Positivo	16 (19,3%)	Positivo	63 (92,6%)
Negativo	67 (80,7%)	Negativo	5 (7,4%)
NA	6	NA	21
ERG – / PTEN +	48 (70,6%)		
ERG + / PTEN +	15 (22%)		
ERG – / PTEN –	4 (5,9%)		
ERG + / PTEN –	1 (1,5%)		

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; NA= não avaliável.

Tabela 26 – Imunoexpressões de ERG e PTEN em 93 espécimes cirúrgicos, na série de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR

ERG	N (%)	PTEN	N (%)
Positivo	41 (44%)	Positivo	57 (61,3%)
Negativo	52 (56%)	Negativo	36 (38,7%)
ERG – / PTEN +	26 (28%)		
ERG + / PTEN +	31 (33,3%)		
ERG – / PTEN –	26 (28%)		
ERG + / PTEN –	10 (10,7%)		

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*.

4.2.2 Correlações da imunexpressão de ERG e PTEN em biópsia com os fatores prognósticos patológicos na série de pacientes tratados com cirurgia

As tabelas 27 e 28 mostram as correlações da expressão de ERG e PTEN na biópsia, respectivamente, com os fatores prognósticos patológicos do espécime cirúrgico. Não encontramos correlação significativa tanto para a expressão positiva de ERG, quanto para a expressão negativa de PTEN.

Tabela 27 – Correlação da imunexpressão de ERG em biópsia com os fatores prognósticos patológicos do espécime cirúrgico em 83 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG Bx		p-valor	OR	IC95%
		Positivo N (%)	Negativo N (%)			
Escore de Gleason	≥7	5 (31,3)	25 (37,3)	0,650	0,764	0,238 ; 2,454
	≤6	11 (68,7)	42 (62,7)			
Estádio patológico	PT3	2 (12,5)	3 (4,5)	0,245*	3,048	0,465 ; 19,979
	PT2	14 (87,5)	64 (95,5)			
Margem cirúrgica	Positiva	5 (31,3)	18 (26,9)	0,760*	1,237	0,378 ; 4,056
	Negativa	11 (68,8)	49 (73,1)			
Diâmetro tumoral	>19mm	2 (12,5)	8 (11,9)	0,999*	1,053	0,201 ; 5,516
	≤19mm	14 (87,5)	59 (88,1)			

ERG= *ETS-related gene*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança. p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Tabela 28 – Correlação da imunexpressão de PTEN em biópsia com os fatores prognósticos patológicos do espécime cirúrgico em 68 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		Negativo N (%)	Positivo N (%)			
Escore de Gleason	≥7	3 (60,0)	23 (36,5)	0,363	2,609	0,406 ; 16,779
	≤6	2 (40,0)	40 (63,5)			
Estádio patológico	PT3	1 (20,0)	3 (4,8)	0,269	5,00	0,419; 22,494
	PT2	4 (80,0)	60 (95,2)			
Margem cirúrgica	Positiva	1 (20,0)	17 (27,0)	0,999	0,676	0,071 ; 6,488
	Negativa	4 (80,0)	46 (73,0)			
Diâmetro tumoral	>19mm	1 (20,0)	8 (12,7)	0,520	1,719	0,170 ; 17,375
	<19mm	4 (80,0)	55 (87,3)			

PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx=biópsia; N=número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

4.2.3 Correlações da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia com os fatores prognósticos patológicos na série de pacientes tratados com cirurgia

Na tabela 29, mostramos a distribuição dos pacientes, considerando-se as combinações entre ERG e PTEN (ERG positivo + PTEN negativo, ERG positivo + PTEN positivo, ERG negativo + PTEN negativo, ERG negativo + PTEN positivo) para as características já mencionadas. Como na série de pacientes em Vigilância Ativa, a baixa amostragem das combinações ERG positivo + PTEN negativo (N=1, impossibilitando análise estatística) e ERG negativo + PTEN negativo (N=4) prejudicaram o achado de presença de diferença significativa. No grupo ERG negativo e PTEN positivo (tabela 30), encontramos tendência a menor estágio patológico (p=0,073); nas demais correlações, não encontramos associação significativa com a expressão conjunta dos biomarcadores na biópsia (anexos L, M).

Tabela 29 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de acordo com os fatores prognósticos patológicos do espécime cirúrgico em 68 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx			
		ERG Negativo + PTEN Negativo	ERG Negativo + PTEN Positivo	ERG Positivo + PTEN Negativo	ERG Positivo + PTEN Positivo
Escore de Gleason	≥7	2 (50,0)	19 (39,6)	1 (100,0)	4 (26,7)
	≤6	2 (50,0)	29 (60,4)	0	11 (73,3)
Estádio patológico	PT3	1 (25,0)	1 (2,1)	0	2 (13,3)
	PT2	3 (75,0)	47 (97,9)	1 (100,0)	13 (86,7)
Margem cirúrgica	Positiva	1 (25,0)	12 (25,0)	0	5 (33,3)
	Negativa	3 (75,0)	36 (75,0)	1 (100,0)	10 (66,7)
Diâmetro tumoral	>19mm	1 (25,0)	6 (12,5)	0	2 (13,3)
	≤19mm	3 (75,0)	42 (87,5)	1 (100,0)	13 (86,7)

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; dados em número e (%).

Tabela 30 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG negativo e PTEN positivo em biópsia com os fatores prognósticos patológicos do espécime cirúrgico em 68 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo / PTEN Positivo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	19 (39,6)	7 (35,0)	0,723 *	1,217	0,411 ; 3,604
	≤6	29 (60,4)	13 (65,0)			
Estádio patológico	PT3	1 (2,1)	3 (15,0)	0,073	0,120	0,012 ; 1,239
	PT2	47 (97,9)	17 (85,0)			
Margem cirúrgica	Positiva	12 (25,0)	6 (30,0)	0,670 *	0,778	0,244 ; 2,477
	Negativa	36 (75,0)	14 (70,0)			
Diâmetro tumoral	>19mm	6 (12,5)	3 (15,0)	0,999	0,809	0,181 ; 3,614
	<19mm	42 (87,5)	17 (85,0)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

*p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

4.2.4 Correlações da imunexpressão de ERG e PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos na série de pacientes tratados com cirurgia

Comparamos a expressão de ERG no espécime cirúrgico por TMA com os fatores prognósticos patológicos escore de Gleason, estágio patológico, margem cirúrgica e diâmetro tumoral (tabela 31). Encontramos tendência para a expressão de ERG negativo com escore de Gleason ≥ 7 (48,1% *versus* 29,3%), com $p=0,066$.

Tabela 31 – Correlação da imunexpressão de ERG no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG PR		p-valor	OR	IC95%
		Positivo N (%)	Negativo N (%)			
Escore de Gleason	≥ 7	12 (29,3)	25 (48,1)	0,066	0,447	0,188 ; 1,062
	≤ 6	29 (70,7)	27 (51,9)			
Estádio patológico	PT3	1 (2,4)	4 (7,7)	0,379 *	0,300	0,032 ; 2,793
	PT2	40 (97,6)	48 (92,3)			
Margem cirúrgica	Positiva	11 (26,8)	15 (28,8)	0,830	0,904	0,362 ; 2,258
	Negativa	30 (73,2)	37 (71,2)			
Diâmetro tumoral	$>19\text{mm}$	4 (9,8)	7 (13,5)	0,583	0,695	0,189 ; 2,558
	$\leq 19\text{mm}$	37 (90,2)	45 (86,5)			

ERG= *ETS-related gene*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Já na análise da expressão de PTEN no espécime cirúrgico, observamos correlação de maior escore de Gleason com a expressão negativa de PTEN (55,6% *versus* 29,8% $p=0,014$), com 2,9 vezes mais chance de tumor agressivo nos pacientes com expressão negativa. Estádio patológico, margem cirúrgica e diâmetro tumoral não diferiram entre os grupos (tabela 32).

Tabela 32 – Correlação da imunexpressão de PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		Negativo N (%)	Positivo N (%)			
Escore de Gleason	≥7	20 (55,6)	17 (29,8)	0,014	2,941	1,234 ; 7,009
	≤6	16 (44,4)	40 (70,2)			
Estádio patológico	PT3	3 (8,3)	2 (3,5)	0,372 *	2,500	0,397 ; 15,749
	PT2	33 (91,7)	55 (96,5)			
Margem cirúrgica	Positiva	11 (30,6)	15 (26,3)	0,657	1,232	0,490 ; 3,098
	Negativa	25 (69,4)	42 (73,7)			
Diâmetro tumoral	>19mm	5 (13,9)	6 (10,5)	0,745 *	1,371	0,386 ; 4,872
	≤19mm	31 (86,1)	51 (89,5)			

PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

* p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

4.2.5 Correlações da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos na série de pacientes tratados com cirurgia

As distribuições das expressões conjuntas de ERG e PTEN no espécime cirúrgico por TMA, com os fatores prognósticos patológicos escore de Gleason, estágio patológico, margem cirúrgica e diâmetro tumoral são mostradas na tabela 33. Nas comparações entre os grupos, a combinação de expressão ERG negativo e PTEN negativo mostrou correlação significativa com o escore de Gleason ($p=0,008$), com chance 3,5 vezes maior de Gleason ≥ 7 em relação às outras combinações (tabela 35). Na combinação ERG positivo e PTEN positivo (tabela 34), encontramos tendência a menor escore de Gleason ($p=0,051$). No restante das análises não foram observadas correlações significativas (anexos N, O).

Tabela 33 – Imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico de acordo com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG + PTEN PR			
		ERG Negativo + PTEN Negativo	ERG Negativo + PTEN Positivo	ERG Positivo + PTEN Negativo	ERG Positivo + PTEN Positivo
Escore de Gleason	≥7	16 (61,5)	9 (34,6)	4 (40,0)	8 (25,8)
	≤6	10 (38,5)	17 (65,4)	6 (60,0)	23 (74,2)
Estádio patológico	PT3	2 (7,7)	2 (7,7)	1 (10,0)	0
	PT2	24 (92,3)	24 (92,3)	9 (90,0)	31 (100,0)
Margem cirúrgica	Positiva	7 (26,9)	8 (30,8)	4 (40,0)	7 (22,6)
	Negativa	19 (73,1)	18 (69,2)	6 (60,0)	24 (77,4)
Diâmetro tumoral	>19mm	5 (19,2)	2 (7,7)	0	4 (12,9)
	≤19mm	21 (80,8)	24 (92,3)	10 (100,0)	27 (87,1)

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; dados em número e (%).

Tabela 34 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN positivos no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG + PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		ERG Positivo + PTEN Positivo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	8 (25,8)	29 (46,8)	0,051 *	0,396	0,153 ; 1,020
	≤6	23 (74,2)	33 (53,2)			
Estádio patológico	PT3	0 (00,0)	5 (8,1)	0,165	--	--
	PT2	31 (100,0)	57 (91,9)			
Margem cirúrgica	Positiva	7 (22,6)	19 (30,6)	0,414 *	0,660	0,243 ; 1,795
	Negativa	24 (77,4)	43 (69,4)			
Diâmetro tumoral	>19mm	4 (12,9)	7 (11,3)	0,999	1,164	0,313 ; 4,323
	<19mm	27 (87,1)	55 (88,7)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

*p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

Tabela 35 – Correlação da imunoeexpressão conjunta de ERG e PTEN negativos no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos de 93 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG + PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Negativo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	16 (61,5)	21 (31,3)	0,008 *	3,505	1,364 ; 9,006
	≤6	10 (38,5)	46 (68,7)			
Estádio patológico	PT3	2 (7,7)	3 (4,5)	0,617	1,778	0,280 ; 11,303
	PT2	24 (92,3)	64 (95,5)			
Margem cirúrgica	Positiva	7 (26,9)	19 (28,4)	0,890 *	0,930	0,337 ; 2,572
	Negativa	19 (73,1)	48 (71,6)			
Diâmetro tumoral	>19mm	5 (19,2)	6 (8,9)	0,281	1,033	0,187 ; 5,691
	<19mm	21 (80,8)	61 (91,1)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

*p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

4.2.6 Sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com as imunoeexpressões de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico na série de pacientes tratados com cirurgia

A probabilidade de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos para os 109 casos foi de 90,4% (figura 15).

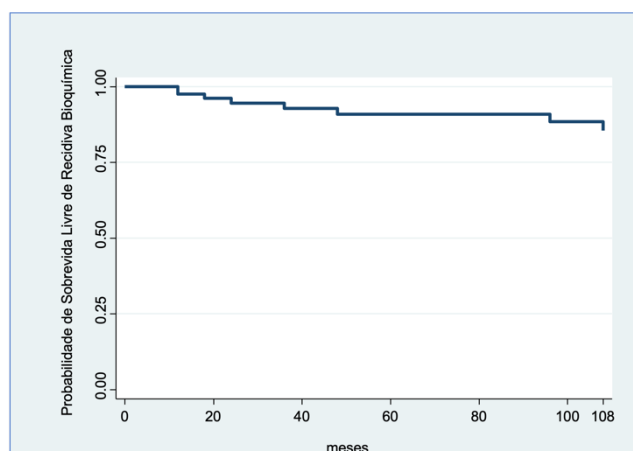


Figura 15 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=109)

A expressão positiva de ERG na biópsia esteve associada a pior sobrevida livre de recidiva bioquímica, com 7,6 vezes maior risco de recidiva quando comparado à expressão negativa de ERG na biópsia. A expressão conjunta de ERG positivo + PTEN positivo na biópsia também mostrou risco maior de recidiva, com RR de 6,94 quando comparado ao restante das expressões conjuntas (tabela 36). Modelos de regressão de Cox univariados não puderam ser realizados para expressão de PTEN na biópsia e na análise conjunta de ERG negativo + PTEN negativo e ERG positivo + PTEN negativo na biópsia devido ausência de recidivas nestas categorias.

Tabela 36 – Probabilidade de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos de acordo com a imunexpressão de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico nos pacientes tratados com PR (continua)

Variável	Categoria (N casos; N recidiva)	Probabilidade (%) 5-anos	p- valor	RR	IC95%
ERG Bx	Negativo (n=67; n=3)	93,9		1,0	Ref.
	Positivo (n=16; n=4)	71,4	0,002	7,65	1,68 ; 34,71
PTEN Bx	Negativo (n=5; n=0)	100,0		NA	NA
	Positivo (n=63; n=7)	86,4	0,383		
ERG Bx + PTEN Bx	Negativo+Positivo (n=48; n=3)	91,6		1,0	Ref.
	Negativo+Negativo (n=4; n=0)	100,0		-	-
	Positivo+Negativo (n=1; n=0)	100,0		-	-
	Positivo+Positivo (n=15; n=4)	68,4	0,034	6,13	1,35 ; 27,76
ERG Bx + PTEN Bx	Restante (n=20; n=4)	77,8		1,0	Ref.
	Negativo+Positivo (n=48; n=3)	91,6	0,063	0,27	0,06 ; 1,19
ERG Bx + PTEN Bx	Restante (n=53; n=3)	92,8		1,0	Ref.
	Positivo+Positivo (n=15; n=4)	68,4	0,004	6,94	1,53 ; 31,48
ERG PR	Negativo (n=52; n=3)	89,5		1,0	Ref.
	Positivo (n=41; n=4)	91,6	0,925	1,07	0,24 ; 4,81
PTEN PR	Positivo (n=57; n=4)	88,4		1,0	Ref.
	Negativo (n=36; n=3)	92,6	0,891	0,90	0,20 ; 4,05
ERG PR + PTEN PR	Negativo+Positivo (n=26; n=2)	85,2		1,0	Ref.
	Negativo+Negativo (n=26; n=2)	94,3		0,94	0,13 ; 6,75
	Positivo+Negativo (n=10; n=1)	89,5		0,95	0,09 ; 10,48
	Positivo+Positivo (n=31; n=2)	92,3	0,999	1,09	0,15 ; 7,82
ERG PR + PTEN PR	Restante (n=67; n=5)	88,9		1,0	Ref.
	Negativo+Negativo (n=26; n=2)	94,3	0,917	0,90	0,18 ; 4,75

Tabela 36 – Probabilidade de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos de acordo com a imunexpressão de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico nos pacientes tratados com PR (conclusão)

Variável	Categoria (N casos; N recidiva)	Probabilidade (%) 5-anos	p-valor	RR	IC95%
ERG PR +	Restante (n=67; n=5)	92,7		1,0	Ref.
PTEN PR	Negativo+Positivo (n=26; n=2)	85,2	0,998	1,00	0,19 ; 5,19
ERG PR +	Restante (n=83; n=6)	90,4		1,0	Ref.
PTEN PR	Positivo+Negativo (n=10; n=1)	89,5	0,954	0,94	0,11 ; 7,81
ERG PR +	Restante (n=62; n=5)	89,6		1,0	Ref.
PTEN PR	Positivo+Positivo (n=31; n=2)	92,3	0,879	1,14	0,22 ; 5,86

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; PR= prostatectomia radical; n= número; RR= risco relativo; IC= intervalo de confiança; Ref.= valor de referência; NA= não avaliável.

p-valor obtido pelo teste de *logrank*.

Na figura 16, observamos que pacientes com expressão de ERG positiva na biópsia apresentaram menor tempo médio de sobrevida livre de recorrência bioquímica em 5 anos quando comparados aos pacientes com expressão negativa (71,4% versus 93,9%, $p=0,002$ Log Rank test).

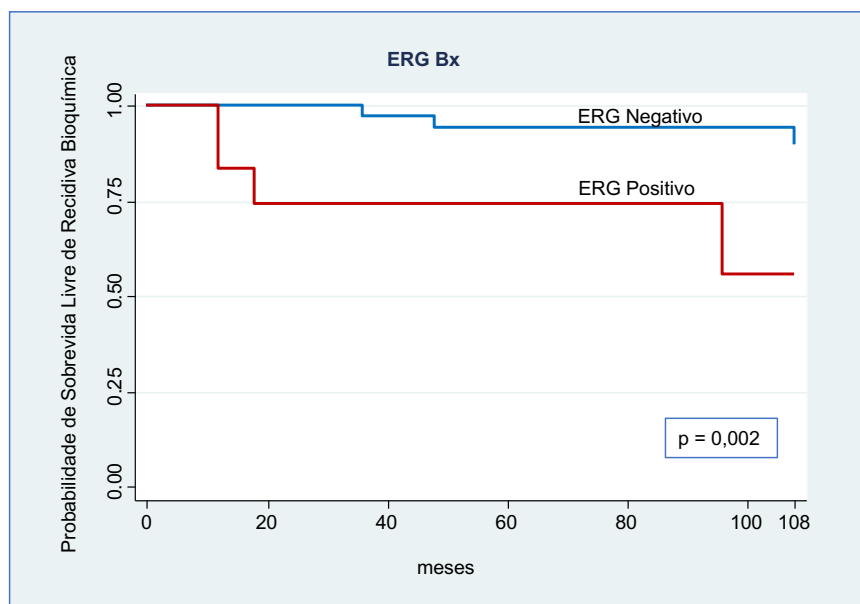


Figura 16 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunexpressão de ERG em biópsia de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=83)

A figura 17 mostra que expressão negativa de PTEN na biópsia apresentou SLRB em 60 meses de 100%, em comparação a 86,4% nos casos com expressão positiva, sem diferença significativa ($p=0,383$).

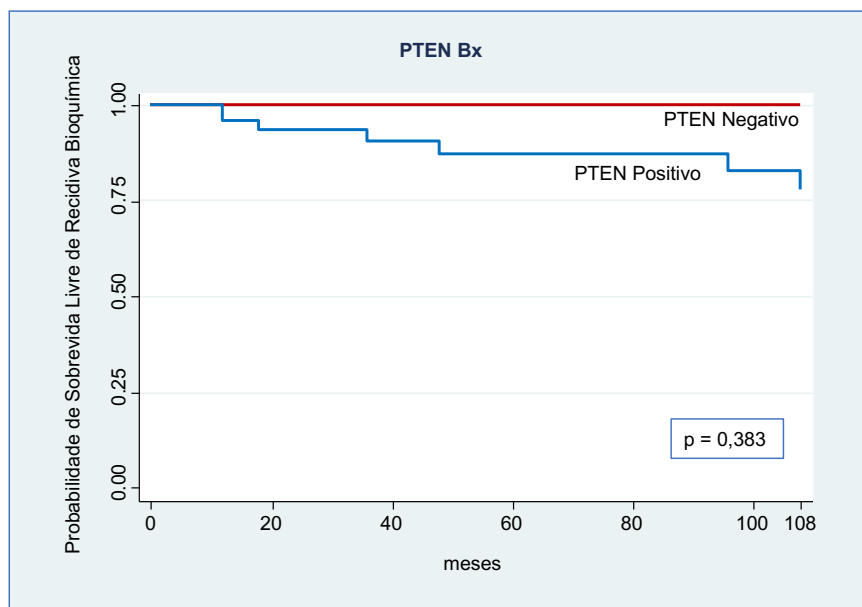


Figura 17 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão de PTEN em biópsia de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=68)

Em relação à SLRB de acordo com a expressão conjunta de ERG e PTEN na biópsia, observamos após seguimento médio de 49,2 meses que o tempo de SLRB foi significativamente menor nos pacientes com expressão ERG positivo + PTEN positivo (68,4% em 60 meses). Os grupos de expressão ERG negativo + PTEN negativo e o grupo ERG positivo + PTEN negativo apresentaram 100% de SLRB, e o grupo de expressão ERG negativo + PTEN positivo 91,6% no mesmo período (figura 18).

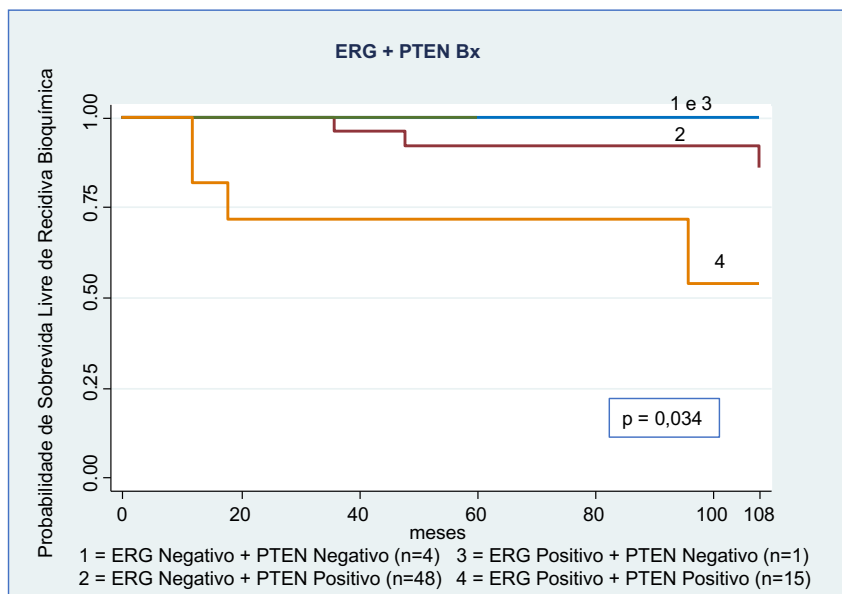


Figura 18 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com a imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN em biópsia de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=68)

Considerando a expressão de ERG no espécime cirúrgico, notamos que não houve diferença entre expressão negativa *versus* positiva de ERG quanto à SLRB (91,6% de pacientes sem recidiva em 60 meses se expressão de ERG positivo e 89,5% se ERG negativo, $p=0,925$) (figura 19).

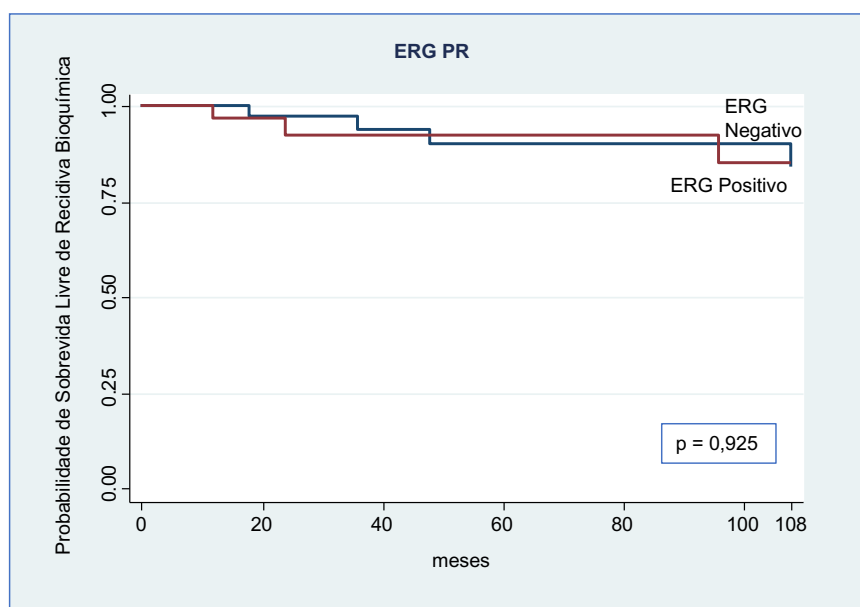


Figura 19 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão de ERG no espécime cirúrgico de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=93)

A expressão negativa de PTEN no espécime cirúrgico também não mostrou correlação com a SLRB pois nos casos com expressão negativa de PTEN 92,6% não apresentaram recorrência em 60 meses, *versus* 88,4% nos casos com expressão positiva, $p=0,891$ (figura 20).

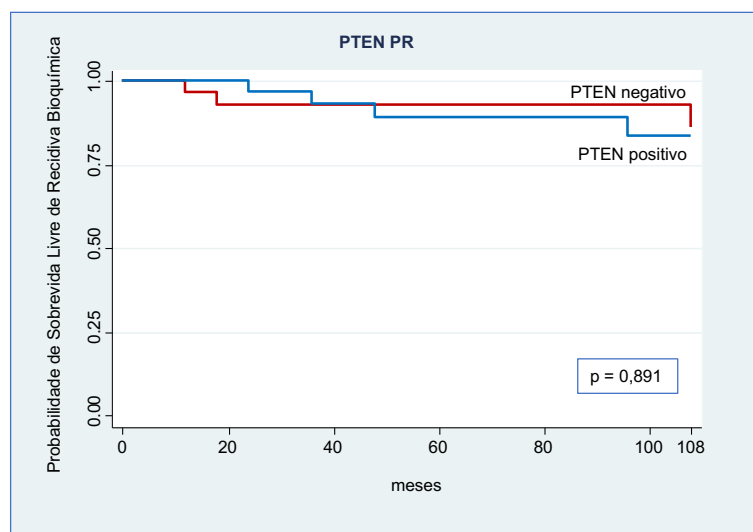


Figura 20 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão de PTEN no espécime cirúrgico de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=93)

Na análise da expressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico, não observamos diferença significativa entre os quatro grupos na correlação com a SLRB ($p=0,999$), figura 21.

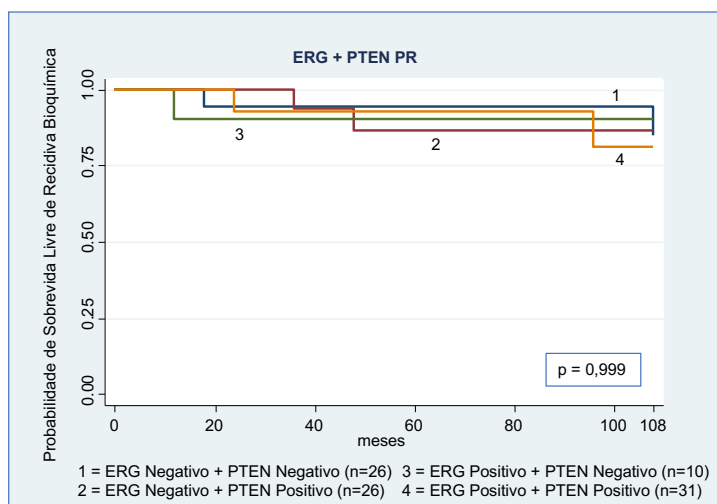


Figura 21 – Curva Kaplan Meier de sobrevida livre de recidiva bioquímica de acordo com imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN no espécime cirúrgico de pacientes com CaP de muito baixo risco tratados com PR (N=93)

4.2.7 Correlação entre a imunoexpressão de ERG e PTEN em biópsia e no espécime cirúrgico na série de pacientes tratados com cirurgia

Avaliamos a hipótese da expressão de ERG positiva se correlacionar com a expressão negativa de PTEN. Não houve essa correlação nas 68 biópsias da série. No espécime cirúrgico, houve correlação significativa entre expressão positiva de ERG com expressão de PTEN positiva ($p=0,012$) (tabela 37).

Tabela 37 – Correlação da imunoexpressão positiva de ERG com a imunoexpressão negativa de PTEN em biópsia (N=68) e no espécime cirúrgico (N=93) nos pacientes tratados com PR

		PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		Negativo N (%)	Positivo N (%)			
ERG Bx	Positivo	1 (20,0)	15 (23,8)	0,999	0,800	0,0829 ; 7,7180
	Negativo	4 (80,0)	48 (76,2)			
		PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		Negativo	Positivo			
ERG PR	Positivo	10 (27,8)	31 (54,4)	0,012	0,322	0,1316 ; 0,7906
	Negativo	26 (72,2)	26 (45,6)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança. p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Identificamos correlação entre a expressão negativa de PTEN por imunohistoquímica na biópsia prostática com a progressão por escore de Gleason em pacientes com CaP de muito baixo risco em VA; observamos que os pacientes com perda de expressão de PTEN em biópsia tiveram 9,7 vezes mais chance de progressão do escore de Gleason durante a VA, sendo esse o achado mais relevante dos nossos dados. Adicionalmente, observamos de forma inédita que a expressão positiva de ERG na biópsia esteve associada à maior chance de escore de PI-RADS \geq 4 na RM, o que é importante visto o escore de PI-RADS representar fator independente de progressão por escore de Gleason em nossa série de CaP de muito baixo risco em VA.

Não encontramos correlação entre as expressões de PTEN e ERG com a chance de progressão geral durante a VA. Avaliamos esse critério pois as séries iniciais de VA adotavam como critérios de reclassificação e progressão para retirar o paciente da VA os mesmos critérios de elegibilidade, ou seja, o aumento do escore de Gleason \geq 7, ou o aumento de número de fragmentos positivos $>$ 3, ou o aumento da porcentagem do fragmento acometido $>$ 50% ou PSA sérico $>$ 10 ng/mL (30, 36, 96). Na época do estabelecimento da nossa série de VA, a literatura, o nosso serviço e os grupos internacionais reconhecidos favoreciam o uso de tais critérios de progressão; entretanto nos dias atuais o aumento do escore de Gleason é considerado o principal critério adotado para progressão durante a VA, e demonstramos em nossa série que pacientes com perda de expressão de PTEN tem dez vezes mais chance de progressão por esse critério.

Algumas séries reforçaram a hipótese de que a elevação do PSA e o número de fragmentos talvez não fossem bons preditores de progressão, Ross *et al.* e o estudo PRIAS demonstraram que a mudança isolada do PSA (velocidade e tempo de duplicação) parece ser um preditor fraco para reclassificação e progressão de doença (36, 37), não devendo ser utilizado como critério de tratamento de pacientes em VA, visto que PSA, tempo de duplicação

de PSA até 3 anos e número de fragmentos positivos >2 não foram preditores para desfechos intermediário (Gleason 3+4 e pT2) e desfavorável (Gleason \geq 4+3 ou \geq pT3) em PR (36). Em revisão sistemática das práticas mundiais de VA do CaP publicada por Kinsela *et al.* em 2018, não foi vista concordância universal nos gatilhos para intervenção, apesar de 62% dos estudos incluídos concordarem com o aumento do escore de Gleason \geq 7 (97). O estudo europeu DETECTIVE (28) mostrou que o número de fragmentos positivos não foi um indicador de volume e extensão tumoral se biópsias guiadas por fusão de imagem de RM eram realizadas. Diante do exposto, permanece em aberto na literatura quais seriam os melhores critérios a serem utilizados para a reclassificação do CaP de muito baixo risco em VA; porém na atualidade o mais aceito é a progressão do escore de Gleason.

Em nossa série de validação, a perda de expressão de PTEN, associada ou não à expressão negativa de ERG, no espécime cirúrgico avaliado por TMA, também se correlacionou significativamente a escore de Gleason \geq 7, com aumento de 2,9 vezes a chance de achado de escore de Gleason elevado quando comparado a expressão de PTEN positivo, reforçando o papel do PTEN como marcador de prognóstico no CaP de muito baixo risco.

Considerando o aumento do escore de Gleason como o principal fator de progressão durante VA, vimos que os preditores número de fragmentos >3, porcentagem de fragmentos >50%, escore de PI-RADS \geq 4 e expressão negativa de PTEN na biópsia foram significativos em análise univariada, porém na análise multivariada apenas porcentagem de fragmentos e escore de PI-RADS mantiveram-se independentemente associados à progressão do escore de Gleason durante a VA. Como observamos apenas 12 casos de perda de PTEN na biópsia, e apenas um caso de perda de PTEN com manutenção de escore de Gleason 6, não obtivemos poder estatístico suficiente na análise multivariada para demonstrar independência da imunoexpressão de PTEN na progressão do escore de Gleason quando considerado todos os fatores. No entanto, excluindo o escore de PI-RADS da análise multivariada, os fatores independentes para progressão do escore de Gleason durante a VA foram a porcentagem de fragmentos >50% e a perda de PTEN (OR=10,43, IC95%=1,24-87,56).

Não há dúvida sobre o benefício da RM no manejo dos pacientes em VA, tanto que é recomendada pelos consensos e sociedades de urologia (27), porém deve-se lembrar do aspecto econômico e custos desse exame de imagem, que são superiores ao custo de um estudo imuno-histoquímico para análise do marcador PTEN. Além disso a RM não está amplamente disponível em nosso país. Diante disso, podemos ponderar que a avaliação da imunoeexpressão do biomarcador PTEN na biópsia representa custo muito menor e talvez melhor custo-benefício em relação à realização de uma RM; o que representa aspecto importante para a realidade brasileira.

Entre as alterações moleculares presentes no CaP, a perda de PTEN tem se mostrado como um potencial biomarcador de pior prognóstico. Atuando como fosfatase lipídica, PTEN se opõe à cascata de sinalização oncogênica PI3K/AKT. A perda de PTEN então leva à ausência de oposição da atividade de PI3K, família de enzimas que convertem PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) para PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), resultando na ativação e modulação de AKT (Serina/Treonina quinase), e consequente sinalização da cascata de ativação mTOR (rapamicina), a qual possui papel importante na regulação de apoptose, proliferação celular, progressão do ciclo celular, proliferação celular, diferenciação e invasão (98). A perda de PTEN no CaP geralmente se dá por deleção, apesar de rearranjos genômicos e até mutações levarem à inativação de PTEN (99).

Uma meta-análise de sete artigos com 1700 pacientes demonstrou a correlação da deleção de PTEN com maior escore de Gleason, além de maior probabilidade de extensão extracapsular, em pacientes com CaP localizado e tratados com cirurgia (100). Troyer *et al.* selecionaram retrospectivamente amostras teciduais de espécimes de PR de 612 pacientes do estudo *Canary Retrospective Multicenter Prostate Cancer Tissue Microarray* com TMAs de CaP, englobando casos com e sem recorrência bioquímica em 5 anos e com estádios patológicos T1 a T4, mas majoritariamente T2 e T3; e avaliaram a deleção do PTEN, através de FISH, que estava deletado em 18,3% dos casos (101), menor que os 41,2% encontrados nas prostatectomias radicais em nossa série de VA e os 38,7% em nossa série de validação. Associações significativas foram

observadas entre a deleção do PTEN e maior estágio patológico, invasão das vesículas seminais, extensão extracapsular e escore de Gleason. Na regressão logística envolvendo variáveis clínico-patológicas, a deleção do PTEN esteve associada de forma significativa com a extensão extracapsular, com OR=2,32 (IC95%=1,51-3,57, $p<0,0001$), comprometimento das vesículas seminais, com OR=3,39 (IC95%=1,70-6,62, $p=0,0004$) e alto escore de Gleason, com OR=2,32 (IC95%=1,55-3,48, $p<0,0001$) – sendo este último dado muito semelhante à nossa série de validação. Em relação à recidiva bioquímica, deleção de PTEN esteve fortemente associada a pior SLRB (HR=1,64, IC95%=1,13-2,37, $p=0,009$) (101), resultado que não reproduzimos em nossas duas casuísticas.

Apesar dos dados existentes sobre a expressão do PTEN, a própria Sociedade de Patologia Genito-Urinária (GUPS) em 2019 considerou necessários estudos adicionais em coortes de VA para estabelecer o papel da deleção de PTEN neste cenário (102), visto o escasso número de estudos em VA, existindo apenas duas séries publicadas. Tososian *et al.*, abordado na introdução, não encontraram correlação entre expressão de PTEN e progressão (75). Contraditoriamente, Lokman *et al.* avaliaram 190 pacientes recrutados do protocolo de VA para CaP de baixo risco PRIAS, para avaliação da expressão de PTEN por IH na biópsia diagnóstica, encontrando perda de PTEN em 29 homens (15%), similar aos 12,6% encontrados nas biópsias da nossa série de VA. No seguimento de 46 meses, perda de PTEN foi associada à progressão para ISUP GG >1 na biópsia confirmatória, *Hazard Ratio* (HR) de 2,57, IC95%=1,16-5,70, $p=0,02$ (103), corroborando nossos achados. Vale ressaltar que nesta série não houve o uso da RM, diferentemente do nosso estudo.

A RM tem papel na seleção e seguimento dos pacientes com CaP de risco baixo e intermediário em vigilância ativa, e comprovamos que o escore de PI-RADS da RM foi fator preditor independente de progressão do escore de Gleason. Nossos resultados mostraram também que na biópsia a expressão negativa de PTEN teve associação marginal com maior chance de PI-RADS ≥ 4 na RM ($p=0,055$), e que a expressão positiva de ERG correlacionou-se significativamente a escore de PI-RADS ≥ 4 , com 2,8 vezes mais chance que ERG negativo. Biomarcadores no contexto da RM, o que se denomina radiogenômica, foram inicialmente estudados na presença de nódulo visível

(maior que 0,5 cm) em espécimes de PR e equivalente na imagem da RM. Lee *et al.*, analisando 62 nódulos visíveis de CaP operados, observaram que a expressão positiva de ERG e deleção de PTEN no espécime cirúrgico não se correlacionaram com o escore do PI-RADS (104). Posteriormente, Baumgartner *et al.* compararam a expressão de PTEN e ERG em biópsia guiada por fusão de imagens da RM *versus* biópsia sistemática guiada por ultrassom. Em 53 casos que foram submetidos às duas técnicas de biópsia, a guiada por RM foi superior na detecção da perda de PTEN ($p=0,02$), mas não para expressão positiva de ERG. Nas biópsias guiadas por RM, a perda de PTEN foi mais frequente em tumores GG2 que GG1 ($p=0,01$) (105).

A literatura atual sugere que a análise combinada dos biomarcadores ERG e PTEN com a RM e biópsia guiada pode melhorar o desempenho na avaliação prognóstica dos pacientes com CaP localizado. Erickson *et al.*, avaliando 106 pacientes submetidos à biópsia por fusão de imagem de RM e subsequente PR, com 53 casos com biópsia sistemática concomitante ou prévia, demonstraram que o poder preditivo do status de PTEN e ERG na biópsia por fusão é superior à biópsia sistemática, além de maior correlação com o GG na PR e o escore de PI-RADS (106). Porém, Eineluoto *et al.*, em análise retrospectiva de 346 amostras teciduais do espécime cirúrgico correspondentes a lesão visível ou ausência de lesão em RM, dispostas em TMAs, não demonstraram papel da expressão de ERG e PTEN na predição de doença não-órgão confinada e pior RB (107). O estudo-piloto de McCann *et al.* mostra que áreas da zona periférica da próstata com perda de PTEN, avaliada por IH, e maior captação na série de perfusão DCE – *dynamic contrast-enhanced* – na RM tem associação com pior escore de Gleason (108). Nossos resultados, apesar do caráter retrospectivo, analisaram uma série prospectiva de VA e com acompanhamento seriado com RM em todos os casos; e conseguimos demonstrar correlação entre pior escore PI-RADS na RM e a expressão de ERG.

Não encontramos correlação significativa entre imunoexpressão de ERG na biópsia com nenhum dos critérios de progressão durante a vigilância em nosso estudo; entretanto observamos tendência entre a expressão positiva de ERG na biópsia com a progressão do escore de Gleason durante VA. Apenas 3

estudos avaliaram ERG como fator de progressão em VA, e dois observaram relação de expressão positiva de ERG com progressão do CaP indolente durante VA (58, 59). Diferentemente dos nossos achados, Berg *et al.* foram capazes de encontrar correlação de expressão positiva de ERG na biópsia diagnóstica com progressão geral durante VA em análise multivariada (HR=2,45, IC95%=1,62-3,72), porém vale destacar a ausência do uso de RM e também de biópsias guiadas nessa coorte, além da inclusão de alguns pacientes com escore de Gleason 3+4 e PSA > 10 ng/mL (59).

Observamos na VA que nos pacientes com expressão positiva de ERG na biópsia há tendência à menor SRLB em 5 anos (77,3% vs 94,4%). A expressão de ERG-positivo no espécime cirúrgico nos pacientes em vigilância operados por progressão também mostrou tendência à menor SLRB em 5 anos (69% vs 93,3%). Reforçando o papel do ERG como marcador de prognóstico, observamos na série de validação que a expressão positiva de ERG na biópsia esteve significativamente associada a 7 vezes mais chance de menor SLRB em 5 anos (71,4% vs 93,9%). Embora a SLRB represente um desfecho de prognóstico intermediário, ela está associada a maior risco de progressão para metástases, mortalidade câncer-específica e geral (109).

Na literatura, a correlação da expressão de ERG com a RB do CaP tratado com cirurgia tem resultados díspares. Alguns autores encontraram maior chance de RB em pacientes com expressão negativa de ERG (110-112), enquanto outros pesquisadores não encontraram associação de ERG como preditor de recidiva (57, 113-115). Uma meta-análise recentemente publicada avaliando-se 76 artigos, com 2556 pacientes, dos quais 697 tiveram RB e 211 morreram por CaP, não encontrou associação de expressão de ERG com RB após tratamento local (OR=1,09, IC95%=0,91-1,31) ou com mortalidade câncer-específica (OR=1,11, p=0,49) (116). No entanto, a meta-análise incorporou diversas coortes retrospectivas e heterogêneas contendo pacientes com CaP localizado, metastático sensível e resistente à castração, que não incluíam pacientes em VA.

Outros estudos observaram maior mortalidade câncer-específica nos pacientes com expressão positiva de ERG, porém em todos a análise foi

realizada em tecido de ressecção trans-uretral de pacientes com CaP em coorte de *Watchful Waiting* (49, 56, 117). Adicionalmente, Nam *et al.*, analisando 26 pacientes operados por CaP localizado por RT-PCR e sequenciamento de DNA, observaram que a presença da fusão gênica TMPRSS2:ERG teve taxas de recorrência significativamente mais altas quando comparadas à ausência de fusão (79,5% vs 37,5% em cinco anos de seguimento, respectivamente, $p=0,03$) (118), de maneira semelhante aos nossos achados na série de validação. Visto que os principais dados da literatura sobre expressão de ERG e recorrência bioquímica não se baseiam em pacientes de VA, e que estudos sobre a expressão de ERG especificamente em séries de VA são escassos, com apenas 3 séries publicadas (58, 59, 103), nosso trabalho, correlacionando a imunexpressão de ERG com a SLRB pós-tratamento, traz dado importante para a avaliação de progressão de pacientes com CaP de muito baixo durante VA.

A interação de PTEN e ERG nos desfechos clínico-patológicos em CaP tem sido desafiador e complexo e isso foi avaliado por alguns estudos que apresentaram resultados contraditórios. Fallahabadi *et al.* analisaram, em 42 amostras teciduais de espécimes cirúrgicos de PR, a presença da fusão TMPRSS2-ERG em conjunto com o status do gene PTEN, utilizando *Real-time* PCR e método de FISH. Os autores observaram forte correlação desses dois marcadores ($p=0,005$). Todos os casos positivos para a deleção do PTEN apresentavam a fusão TMPRSS2:ERG; porém nem todos os casos de fusão TMPRSS2:ERG tinham a deleção do PTEN, permitindo concluir que a deleção do PTEN ocorreu em concordância com a fusão TMPRSS2:ERG neste estudo (73). Inicialmente, baseado em modelos animais, a interação de inativação de PTEN com o rearranjo de ERG foi considerado como de pior prognóstico entre todas as comparações (71, 74).

Entretanto, estudos adicionais maiores encontraram maior risco de progressão em pacientes com perda de PTEN, independente do status de ERG. Já mencionado nesta discussão, Lokman *et al.* também avaliaram em conjunto os biomarcadores PTEN e ERG na progressão do CaP em VA em 190 biópsias diagnósticas, e encontrou que a perda de PTEN foi significativamente associada, tanto em análise uni quanto multivariada, à progressão do GG na rebiópsia

(HR=2,57), mudança de tratamento (HR=2,31) e achados histopatológicos adversos na PR (HR=4,74), enquanto que a expressão positiva de ERG na biópsia não apresentou correlação (103). Nesse mesmo sentido, Haney *et al.* avaliaram o status PTEN/ERG por IH em 791 espécimes de PR de CaP localizado e observaram perda de PTEN em 25% dos casos e ERG positivo em 43%, próximas ao encontrado em nossas séries. Em análise multivariada, perda de PTEN (HR=1,9, IC95%=1,2-3,0) mas não ERG-positivo (HR=0,6, IC95%=0,4-1,1) associou-se ao risco aumentado de metástase e morte por CaP. E a associação de perda de PTEN com metástase e morte apenas permaneceu nos casos ERG-negativo (HR=2,3, IC95%=1,3-4,1), e não ERG-positivo (HR=1,1, IC95%=0,6-2,1) (119).

Krohn *et al.*, em análise de mais de 4000 amostras de espécimes cirúrgicos de PR dispostas em TMAs com estádios pT2 a pT4, encontraram piores desfechos patológicos como estágio, escore de Gleason, metástase linfonodal ($p < 0,0001$) e recorrência bioquímica precoce ($p = 0,0158$) na presença de perda de PTEN avaliada tanto por FISH quanto IH, independente do status de ERG por IH (69). Porém em outra série quando o desfecho utilizado foi letalidade do CaP e não a recidiva bioquímica, a perda de PTEN foi associada à letalidade somente em pacientes ERG-negativos (HR=3,1, IC95%=1,7-5,7), em coorte de investigação pato-epidemiológica com 1044 amostras teciduais de PR ou ressecção transuretral de CaP (120).

Similarmente, Reid *et al.* avaliaram a expressão de ERG e PTEN por FISH em 308 amostras teciduais de ressecções trans-uretrais dispostas em TMAs, e também encontraram sobrevida global e câncer-específica significativamente pior nos pacientes com deleção de PTEN e expressão negativa de ERG (HR=9,37, IC95%=4,68-18,76), sendo o grupo sem deleção de PTEN e expressão negativa de ERG com a melhores sobrevida específica e global (72). Em nossa série de VA não encontramos interação da imunoexpressão de PTEN e ERG na biópsia com menor SLRB. Já no espécime cirúrgico, vimos que a expressão conjunta de ERG positivo com PTEN negativo apresentou tendência de menor SLRB (66,7% vs 100% em 5 anos), indo de encontro com o postulado

de que a expressão positiva de ERG e a perda de expressão de PTEN se correlaciona a CaP com maiores chances de progressão e agressividade.

Em nossa série de validação a análise da expressão conjunta dos biomarcadores na biópsia encontrou menor SLRB em 5 anos para o grupo ERG positivo + PTEN positivo de 68,4%, comparado com o grupo ERG negativo + PTEN positivo em valor intermediário de 91,6%; e 100% de sobrevida nos outros dois grupos (ERG negativo + PTEN negativo e ERG positivo + PTEN negativo). Aqui, a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa, com os pacientes com imunexpressão positiva de ERG e PTEN com chance 6,9 vezes maior de pior SLRB em relação ao restante. Já no espécime cirúrgico, os grupos de imunexpressão conjunta de ERG e PTEN não apresentaram correlação. Salles *et al.*, em estudo recente de 215 pacientes submetidos à prostatectomia radical, demonstraram que expressão positiva de ERG na margem cirúrgica positiva foi associada a maior risco de recidiva bioquímica em análise multivariada (HR=2,4, IC95%=1,2-4,9), independente do status de PTEN na mesma margem cirúrgica (121). Postulamos, com nossos dados, que pacientes com expressão positiva de ERG, independente do status de PTEN, estão associados a pior SLRB pós tratamento local.

São controversos os estudos prévios mostrando riscos maiores de RB na perda de PTEN com expressão positiva de ERG (71, 74). As séries com seguimento mais longo mostraram que o subgrupo ERG-negativo com perda de PTEN é o que possui risco aumentado para desfecho letal (72, 120). Como a frequência de tumores ERG-positivo com perda de PTEN é maior que tumores ERG-negativo com perda de PTEN nestas séries, estudos menores apresentaram menor poder estatístico para comparar o efeito da perda de PTEN na estratificação do status de ERG, enquanto os estudos maiores não revelaram nenhum efeito do status de ERG na associação com perda de PTEN na RB. Apesar de termos encontrado menos casos de ERG-positivo com perda de PTEN que ERG-negativo com perda de PTEN em ambas de nossas séries, elas representam características diferentes, sendo específicas de CaP de muito baixo risco, permanecendo aberta a discussão da avaliação conjunta de ERG e PTEN neste contexto.

Nosso estudo apresenta como aspectos positivos para alcançarmos os objetivos propostos o uso de critérios claros de seleção, tempo de seguimento suficiente que permitiu observação de progressão em mais da metade dos casos, a revisão central na leitura IH por único uro-patologista experiente e também revisão central das RM multiparamétricas por único uro-radiologista. Outro ponto positivo foi a realização do *tissue microarray*, já que a análise da expressão de cada marcador simultaneamente em todas as amostras através do TMA contribui com a homogeneidade dos resultados da imunoexpressão. O alto volume de pacientes em nossa Instituição a fim de possibilitar a seleção e inclusão em quantidade necessária para observarmos os desfechos; o desenvolvimento estrutural da nossa Instituição, com manejo adequado no acompanhamento do protocolo de VA com a realização de RMs e re-biópsias de próstata periódicas guiadas por esse exame de imagem, procedimentos estes na maioria das vezes inexistentes em outros serviços do SUS em nossa realidade brasileira, representam outros pontos fortes do nosso estudo.

Apesar disso, encontramos limitações em nosso projeto de pesquisa. A primeira foi a presença escassa de tumor representativo nas lâminas/blocos de biópsia prostática em 15 casos, visto que nossa coorte apresenta somente pacientes de muito baixo risco, com escore de Gleason 6, com poucos fragmentos positivos, baixa porcentagem de acometimento dos fragmentos e baixo volume tumoral. Por conta do desgaste de material original, não conseguimos prosseguir com a realização das reações IH em todas as biópsias de seguimento, devido a material insuficiente para a realização das reações.

Um segundo ponto foi a pior qualidade em algumas amostras de biópsia na série de validação de pacientes tratados diretamente com cirurgia, sendo esta coorte representada por algumas biópsias e espécimes cirúrgicos com mais de 10 anos de armazenamento; que apresentam maior chance de problemas pré-analíticos nas amostras. Também limitou a nossa amostra a indisponibilidade de material para análise IH neste grupo de pacientes. Além disso, o baixo número de apenas 12 casos com expressão negativa de PTEN nas nossas biópsias na série de VA e 5 na série de validação pode ter impactado as correlações entre expressão de PTEN com a progressão e prognóstico. Postulamos que talvez a

deleção de PTEN seja evento menos frequente no CaP de muito baixo risco; além de não ser conhecida a frequência dos biomarcadores ERG e PTEN na população brasileira. Tosoian *et al.* já demonstraram que as alterações de ERG e PTEN ocorrem em porcentagens diferentes entre afro-americanos e descendentes europeus (122).

Nosso estudo limitou-se a utilizar como desfecho oncológico a sobrevida livre de recorrência bioquímica, e não mortalidade câncer-específica, já que nosso acompanhamento pós-tratamento teve média de 39,7 meses na série de VA e 49,2 meses na série de validação, aquém do necessário para a avaliação de sobrevida específica considerando casos de CaP de muito baixo risco. Não realizamos análise de sobrevida câncer-específica devido à raridade deste evento. Nossa série de VA apresentou 3 óbitos, nenhum por CaP, sendo um por insuficiência hepática durante seguimento de VA, e dois pós-PR, um por neoplasia de cólon metastática e outro por evento coronariano agudo. Na série de validação não houve óbito.

A não inclusão de pacientes com risco intermediário favorável no nosso estudo, que é recomendada por alguns consensos na atualidade (34), representa um ponto negativo, pois talvez nossos resultados não se apliquem aos pacientes atualmente em seleção para VA. Também os diversos critérios de reclassificação durante VA, com tendência atual a considerar somente a progressão do escore de Gleason na re-biópsia (28) como mudança de tratamento, representam uma crítica. Entretanto, na época do início de nossa série de VA, os critérios de Epstein de CaP insignificante, em conjunto com os critérios clínicos de estágio e PSA, eram os mais aceitos e amplamente utilizados.

Baseado em nossos achados postulamos que a expressão negativa de PTEN e positiva de ERG na biópsia por IH tem potencial valor prognóstico na seleção e seguimento de pacientes com CaP de muito baixo risco em VA. A RM e a porcentagem de fragmentos representam os fatores preditores independentes de progressão por escore de Gleason. Estudos prospectivos, com maior amostra e seguimento adequado, são necessários para avaliarmos o

real papel prognóstico dos biomarcadores ERG e PTEN no contexto do CaP em Vigilância Ativa.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que na biópsia de pacientes com CaP de muito baixo risco a expressão negativa de PTEN está associada à progressão do escore de Gleason durante a VA. A expressão positiva de ERG na biópsia está associada ao maior escore de PI-RADS. A expressão positiva de PTEN associada à expressão negativa de ERG na biópsia associou-se à menor chance de escore de PI-RADS ≥ 4 . A porcentagem de acometimento dos fragmentos da biópsia e o escore de PI-RADS da RM são preditores independentes de progressão por escore de Gleason durante VA.

Na série de validação encontramos que a expressão positiva de ERG associada ou não à expressão positiva de PTEN na biópsia está associada a pior SLRB. No espécime cirúrgico a expressão negativa de PTEN isolada ou em conjunto com expressão negativa de ERG está associada a maior escore de Gleason.

Postulamos que as imunoexpressões negativa de PTEN e positiva de ERG estão associadas ao pior prognóstico de pacientes com CaP de muito baixo risco em VA, sendo, portanto, potenciais candidatos a biomarcadores neste cenário.

7 ANEXOS

Anexo A, Tabela 38 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG positivo e PTEN negativo em biópsia com os critérios de progressão e aumento do PI-RADS em 95 pacientes durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Positivo + PTEN Negativo N (%)	Restante N (%)			
Progressão geral	Sim	6 (100,0)	66 (74,2)	0,330	—	— ; —
	Não	0 (00,0)	23 (25,8)			
Progressão por escore de Gleason	≥7	6 (100,0)	49 (55,1)	0,038	—	— ; —
	≤6	0 (00,0)	40 (44,9)			
Progressão por Número de fragmentos	>3	3 (50,0)	35 (39,3)	0,680	1,543	0,294 ; 8,081
	≤3	3 (50,0)	54 (60,7)			
Progressão por %fragmentos	>50%	2 (33,3)	24 (27,0)	0,664	1,354	0,233 ; 7,877
	≤50%	4 (66,7)	65 (73,0)			
Progressão por PSA	>10	1 (16,7)	12 (13,5)	0,999	1,283	0,138; 11,953
	≤10	5 (83,3)	77 (86,5)			
PI-RADS	≥4	6 (100,0)	57 (64,0)	0,094	—	— ; —
	<4	0 (00,0)	32 (36,0)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; PSA= Antígeno prostático específico; PI-RADS= *Prostate Image Reporting and Data System*, OR= *odds ratio*, IC= interval de confiança; NA= não avaliável.
p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Anexo B, Tabela 39 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN positivos em biópsia com os critérios de progressão e aumento do PI-RADS em 95 pacientes durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Positivo + PTEN Positivo N (%)	Restante N (%)			
Progressão geral	Sim	24 (75,0)	48 (76,2)	0,898	0,937	0,349 ; 2,518
	Não	8 (25,0)	15 (23,8)			
Progressão por escore de Gleason	≥7	19 (59,4)	36 (57,1)	0,835	1,096	0,462 ; 2,601
	≤6	13 (40,6)	27 (42,9)			
Progressão por número de fragmentos	>3	15 (46,9)	23 (36,5)	0,330	1,535	0,647 ; 3,638
	≤3	17 (53,1)	40 (63,5)			
Progressão por % fragmentos	>50	10 (31,2)	16 (25,4)	0,545	1,335	0,522 ; 3,413
	≤50	22 (68,8)	47 (74,6)			
Progressão por PSA	>10	4 (12,5)	9 (14,3)	0,811	0,857	0,242 ; 3,031
	≤10	28 (87,5)	54 (85,7)			
PI-RADS	≥4	24 (75,0)	39 (61,9)	0,202	1,846	0,715 ; 4,764
	<4	8 (25,0)	24 (38,1)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; PSA= Antígeno prostático específico; PI-RADS= *Prostate Image Reporting and Data System*, OR= *odds ratio*, IC= interval de confiança; NA= não avaliável.
p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Anexo C, Tabela 40 – Correlação da imunoeexpressão conjunta de ERG e PTEN negativos em biópsia com os critérios de progressão e aumento do PI-RADS em 95 pacientes durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Negativo N (%)	Restante N (%)			
Progressão geral	Sim	5 (83,3)	67 (75,3)	0,999	1,642	0,182 ; 14,823
	Não	1 (16,7)	22 (24,7)			
Progressão por escore de Gleason	≥7	5 (83,3)	50 (56,2)	0,396	3,900	0,437 ; 34,760
	≤6	1 (16,7)	39 (43,8)			
Progressão por número de fragmentos	>3	3 (50,0)	35 (39,3)	0,680	1,543	0,294 ; 8,081
	≤3	3 (50,0)	54 (60,7)			
Progressão por % fragmentos	>50	2 (33,3)	24 (27,0)	0,664	1,354	0,233 ; 7,877
	≤50	4 (66,7)	65 (73,0)			
Progressão por PSA	>10	1 (16,7)	12 (13,5)	0,999	1,283	0,138 ; 11,953
	≤10	5 (83,3)	77 (86,5)			
PI-RADS	≥4	5 (83,3)	58 (65,2)	0,660	2,672	0,299 ; 23,899
	<4	1 (16,7)	31 (34,8)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; PSA= Antígeno prostático específico; PI-RADS= *Prostate Image Reporting and Data System*, OR= *odds ratio*, IC= interval de confiança; NA= não avaliável.
p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Anexo D, Tabela 41 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG positivo e PTEN negativo em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 49 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Positivo + PTEN Negativo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	3 (100,0)	37 (80,4)	1,000	--	--
	≤6	0 (00,0)	9 (19,6)			
Estádio patológico	PT3	2 (66,7)	12 (26,1)	0,193	5,667	0,470 ; 68,281
	PT2	1 (33,3)	34 (73,9)			
Margem cirúrgica	Positiva	1 (33,3)	11 (23,9)	0,999	1,591	0,131 ; 19,270
	Negativa	2 (66,7)	35 (76,1)			
Diâmetro tumoral	>19mm	2 (66,7)	13 (28,3)	0,218	5,077	0,423 ; 60,915
	≤19mm	1 (33,3)	33 (71,7)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*, IC= intervalo de confiança.
p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Anexo E, Tabela 42 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG e PTEN positivos em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 49 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Positivo + PTEN Positivo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	13 (72,2)	27 (87,1)	0,259	0,385	0,088 ; 1,678
	≤6	5 (27,8)	4 (12,9)			
Estádio patológico	PT3	3 (16,7)	11 (35,5)	0,160 *	0,364	0,086 ; 1,537
	PT2	15 (83,3)	20 (64,5)			
Margem cirúrgica	Positiva	6 (33,3)	6 (19,4)	0,316	2,083	0,544 ; 7,834
	Negativa	12 (66,7)	25 (80,6)			
Diâmetro tumoral	>19mm	6 (33,3)	9 (29,0)	0,753	1,122	0,350 ; 4,265
	≤19mm	12 (66,7)	22 (71,0)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*, IC= intervalo de confiança.
p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Anexo F, Tabela 43 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG negativo e PTEN positivo em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 49 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Positivo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	23 (85,2)	17 (77,3)	0,713	1,691	0,394 ; 7,257
	≤6	4 (14,8)	5 (22,7)			
Estádio patológico	PT3	9 (33,3)	5 (22,7)	0,414 *	1,700	0,473 ; 6,105
	PT2	18 (66,7)	17 (77,3)			
Margem cirúrgica	Positiva	5 (18,5)	7 (31,8)	0,282 *	0,487	0,130 ; 1,827
	Negativa	22 (81,5)	15 (68,2)			
Diâmetro tumoral	>19mm	7 (25,9)	8 (36,4)	0,430 *	0,612	0,180 ; 2,081
	≤19mm	20 (74,1)	14 (63,6)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*, IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Anexo G, Tabela 44 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN negativos em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 49 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Negativo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	1 (100,0)	39 (81,2)	1,000	--	--
	≤6	0 (00,0)	9 (18,8)			
Estádio patológico	PT3	0 (00,0)	14 (29,2)	1,000	--	--
	PT2	1 (100,0)	34 (70,8)			
Margem cirúrgica	Positiva	0 (00,0)	12 (25,0)	1,000	--	--
	Negativa	1 (100,0)	36 (75,0)			
Diâmetro tumoral	>19mm	0 (00,0)	15 (31,2)	1,000	--	--
	≤19mm	1 (100,0)	33 (68,8)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*, IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Anexo H, Tabela 45 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG positivo e PTEN negativo no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 51 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		ERG Positivo + PTEN Negativo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	5 (83,3)	36 (80,0)	0,999	1,250	0,129 ; 12,074
	≤6	1 (16,7)	9 (20,0)			
Estádio patológico	PT3	3 (50,0)	11 (24,4)	0,327	3,091	0,543 ; 17,588
	PT2	3 (50,0)	34 (75,6)			
Margem cirúrgica	Positiva	3 (50,0)	9 (20,0)	0,134	4,000	0,689 ; 23,229
	Negativa	3 (50,0)	36 (80,0)			
Diâmetro tumoral	>19mm	2 (33,3)	14 (31,1)	0,999	1,107	0,181 ; 6,771
	≤19mm	4 (66,7)	31 (68,9)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*, IC= interval de confiança.
p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Anexo I, Tabela 46 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN positivos no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 51 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		ERG Positivo + PTEN Positivo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	8 (66,7)	33 (84,6)	0,218	0,364	0,082 ; 1,601
	≤6	4 (33,3)	6 (15,4)			
Estádio patológico	PT3	2 (16,7)	12 (30,8)	0,471	0,450	0,085 ; 2,375
	PT2	10 (83,3)	27 (69,2)			
Margem cirúrgica	Positiva	3 (25,0)	9 (23,1)	0,999	1,111	0,247 ; 5,000
	Negativa	9 (75,0)	30 (76,9)			
Diâmetro tumoral	>19mm	5 (41,7)	11 (28,2)	0,481	1,818	0,475 ; 6,964
	≤19mm	7 (58,3)	28 (71,8)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*, IC= interval de confiança.
p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Anexo J, Tabela 47 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG negativo e PTEN positivo no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 51 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Positivo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	16 (88,9)	25 (75,8)	0,462	2,560	0,481 ; 13,623
	≤6	2 (11,1)	8 (24,2)			
Estádio patológico	PT3	6 (33,3)	8 (24,2)	0,525	1,562	0,442 ; 5,523
	PT2	12 (66,7)	25 (75,8)			
Margem cirúrgica	Positiva	3 (16,7)	9 (27,3)	0,502	0,533	0,124 ; 2,290
	Negativa	15 (83,3)	24 (72,7)			
Diâmetro tumoral	>19mm	5 (27,8)	11 (33,3)	0,683 *	0,769	0,218 ; 2,712
	≤19mm	13 (72,2)	22 (66,7)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*, IC= interval de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

* p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Anexo K, Tabela 48 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN negativos no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 51 pacientes operados durante a VA

Variável	Categoria	ERG + PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Negativo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	12 (80,0)	29 (80,6)	0,999	0,965	0,213 ; 4,373
	≤6	3 (20,0)	7 (19,4)			
Estádio patológico	PT3	3 (20,0)	11 (30,6)	0,513	0,568	0,133 ; 2,423
	PT2	12 (80,0)	25 (69,4)			
Margem cirúrgica	Positiva	3 (20,0)	9 (25,0)	0,999	0,750	0,172 ; 3,272
	Negativa	12 (80,0)	27 (75,0)			
Diâmetro tumoral	>19mm	4 (26,7)	12 (33,3)	0,640	0,727	0,191 ; 2,771
	≤19mm	11 (73,3)	24 (66,7)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*, IC= interval de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Anexo L, Tabela 49 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN positivos em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 68 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Positivo+ PTEN Positivo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	4 (26,7)	22 (41,5)	0,296 *	0,512	0,144 ; 1,821
	≤6	11 (73,3)	31 (58,5)			
Estádio patológico	PT3	2 (13,3)	2 (3,8)	0,209	3,923	0,504 ; 30,548
	PT2	13 (86,7)	51 (96,2)			
Margem cirúrgica	Positiva	5 (33,3)	13 (24,5)	0,519	1,538	0,444 ; 5,330
	Negativa	10 (66,7)	40 (75,5)			
Diâmetro tumoral	>19mm	2 (13,3)	7 (13,2)	0,999	1,011	0,187 ; 5,467
	<19mm	13 (66,7)	46 (86,8)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*, IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

*p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Anexo M, Tabela 50 – Correlação da imunexpressão conjunta de ERG e PTEN negativos em biópsia com os fatores prognósticos patológicos em 68 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG + PTEN Bx		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Negativo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	2 (50,0)	24 (37,5)	0,633	1,667	0,220 ; 12,618
	≤6	2 (50,0)	40 (62,5)			
Estádio patológico	PT3	1 (25,0)	3 (4,7)	0,220	6,778	0,533 ; 86,174
	PT2	3 (75,0)	61 (95,3)			
Margem cirúrgica	Positiva	1 (25,0)	17 (26,6)	0,999	0,921	0,090 ; 9,473
	Negativa	3 (75,0)	47 (73,4)			
Diâmetro tumoral	>19mm	1 (25,0)	8 (12,5)	0,441	2,333	0,216 ; 25,245
	<19mm	3 (75,0)	56 (87,5)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; Bx= biópsia; N= número; OR= *odds ratio*, IC= intervalo de confiança.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Anexo N, Tabela 51 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG positivo e PTEN negativo no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 93 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG + PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		ERG Positivo + PTEN Negativo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	4 (40,0)	33 (39,8)	0,999	1,010	0,265 ; 3,855
	≤6	6 (60,0)	50 (60,2)			
Estádio patológico	PT3	1 (10,0)	4 (4,8)	0,441	2,194	0,221 ; 21,828
	PT2	9 (90,0)	79 (95,2)			
Margem cirúrgica	Positiva	4 (40,0)	22 (26,5)	0,458	1,848	0,476 ; 7,172
	Negativa	6 (60,0)	61 (73,5)			
Diâmetro tumoral	>19mm	0 (00,0)	11 (13,2)	0,601	--	--
	<19mm	10 (100,0)	72 (86,8)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*, IC= interval de confiança.
p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Anexo O, Tabela 52 – Correlação da imunoexpressão conjunta de ERG negativo e PTEN positivo no espécime cirúrgico com os fatores prognósticos patológicos em 93 pacientes tratados com PR

Variável	Categoria	ERG + PTEN PR		p-valor	OR	IC95%
		ERG Negativo + PTEN Positivo N (%)	Restante N (%)			
Escore de Gleason	≥7	9 (34,6)	28 (41,8)	0,526 *	0,737	0,287 ; 1,893
	≤6	17 (65,4)	39 (58,2)			
Estádio patológico	PT3	2 (7,7)	3 (4,5)	0,617	1,778	0,280 ; 11,303
	PT2	24 (92,3)	64 (95,5)			
Margem cirúrgica	Positiva	8 (30,8)	18 (26,8)	0,707 *	1,210	0,448 ; 3,265
	Negativa	18 (69,2)	49 (73,2)			
Diâmetro tumoral	>19mm	2 (7,7)	9 (13,4)	0,722	0,537	0,108 ; 2,671
	<19mm	24 (92,3)	58 (86,6)			

ERG= *ETS-related gene*; PTEN= *Phosphatase and Tensin Homologue*; PR= prostatectomia radical; N= número; OR= *odds ratio*, IC= interval de confiança.
p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

*p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3).
2. Siegel R, Miller K, Fuchs H, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(1):7-33.
3. Penson D, Chan J. Prostate cancer. *The Journal of urology*. 2007;177(6):2020-9.
4. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2019. <http://www.inca.gov.br>.
5. Richie J, Catalona W, Ahmann F, Hudson M, Scardino P, Flanigan R, et al. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology*. 1993;42(4):365
6. Carvalhal G, Smith D, Mager D, Ramos C, Catalona W. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng./ml. or less. *The Journal of urology*. 1999;161(3):835.
7. Okotie O, Roehl K, Han M, Loeb S, Gashti S, Catalona W. Characteristics of prostate cancer detected by digital rectal examination only. *Urology*. 2007;70(6):1117.
8. Hugosson J, Roobol M, Månsson M, Tammela T, Zappa M, Nelen V, et al. A 16-yr Follow-up of the European Randomized study of Screening for Prostate Cancer. *European urology*. 2019;76(1):43-51.
9. de Vos I I, Meertens A, Hogenhout R, Remmers S, Roobol M. A Detailed Evaluation of the Effect of Prostate-specific Antigen-based Screening on Morbidity and Mortality of Prostate Cancer: 21-year Follow-up Results of the Rotterdam Section of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer. *European urology*. 2023.
10. Lu-Yao G, Albertsen P, Moore D, Shih W, Lin Y, DiPaola R, et al. Outcomes of localized prostate cancer following conservative management. *JAMA*. 2009;302(11):1202.
11. Schröder F, Hugosson J, Roobol M, Tammela T, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *The New England journal of medicine*. 2009;360(13):1320-8.
12. Hayes J, Ollendorf D, Pearson S, Barry M, Kantoff P, Stewart S, et al. Active surveillance compared with initial treatment for men with low-risk prostate cancer: a decision analysis. *JAMA*. 2010;304(21):2373-80.
13. Graefen M, Karakiewicz P, Cagiannos I, Quinn D, Henshall S, Grygiel J, et al. International validation of a preoperative nomogram for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(15):3206-12.

14. Stamey T, McNeal J, Yemoto C, Sigal B, Johnstone I. Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer. *JAMA*. 1999;281(15):1395-440.
15. Epstein J, Egevad L, Amin M, Delahunt B, Srigley J, Humphrey P. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American journal of surgical pathology*. 2016;40(2):244-52.
16. D'Amico A, Whittington R, Malkowicz S, Schultz D, Blank K, Broderick G, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998;280(11):969-74.
17. Schaeffer E, Srinivas S, Antonarakis E. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines (NCCN Guidelines) . Prostate cancer. Version 1.2022. 2022 [
18. Epstein J, Walsh P, Carmichael M, Brendler C. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA*. 1994;271(5):368.
19. Cooperberg M, Broering J, Kantoff P, Carroll P. Contemporary trends in low risk prostate cancer: risk assessment and treatment. *The Journal of urology*. 2007;178(3 Pt 2):S14-S9.
20. Zelic R, Garmo H, Zugna D, Stattin P, Richiardi L, Akre O, et al. Predicting Prostate Cancer Death with Different Pretreatment Risk Stratification Tools: A Head-to-head Comparison in a Nationwide Cohort Study. *European urology*. 2020;77(2):180.
21. Eastham J, Aufferberg G, Barocas D, Chou R, Crispino T, Davis J, et al. Clinically Localized Prostate Cancer: AUA/ASTRO Guideline, Part II: Principles of Active Surveillance, Principles of Surgery, and Follow-Up. *The Journal of urology*. 2022;208(1):19-25.
22. Thomsen F, Brasso K, Klotz L, Røder M, Berg K, Iversen P. Active surveillance for clinically localized prostate cancer--a systematic review. *Journal of surgical oncology*. 2014;109(8):830.
23. Amin M, Lin D, Gore J, Srigley J, Samaratunga H, Egevad L, et al. The critical role of the pathologist in determining eligibility for active surveillance as a management option in patients with prostate cancer: consensus statement with recommendations supported by the College of American Pathologists, International Society of Urological Pathology, Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology, the New Zealand Society of Pathologists, and the Prostate Cancer Foundation. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2014;138(10):1387-405.
24. Sato S, Kimura T, Yoroizu T, Onuma H, Iwatani K, Egawa S, et al. Cases Having a Gleason Score 3+4=7 With <5% of Gleason Pattern 4 in Prostate Needle Biopsy Show Similar Failure-free Survival and Adverse Pathology Prevalence to Gleason Score 6 Cases in a Radical Prostatectomy Cohort. *The American journal of surgical pathology*. 2019;43(11):1560-5.

25. Preisser F, Cooperberg M, Crook J, Feng F, Graefen M, Karakiewicz P, et al. Intermediate-risk Prostate Cancer: Stratification and Management. *European urology oncology*. 2020;3(3):270-80.
26. Litwin M, Tan H. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017;317(24):2532-42.
27. Mottet N, van den Bergh R, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch M, De Santis M, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European urology*. 2021;79(2):243-62.
28. Lam T, MacLennan S, Willemse P, Mason M, Plass K, Shepherd R, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Prostate Cancer Guideline Panel Consensus Statements for Deferred Treatment with Curative Intent for Localised Prostate Cancer from an International Collaborative Study (DETECTIVE Study). *European urology*. 2019;76(6):790-813.
29. Tosoian J, Mamawala M, Epstein J, Landis P, Macura K, Simopoulos D, et al. Active Surveillance of Grade Group 1 Prostate Cancer: Long-term Outcomes from a Large Prospective Cohort. *European urology*. 2020;77(6):675-82.
30. Carlsson S, Benfante N, Alvim R, Sjoberg D, Vickers A, Reuter V, et al. Long-Term Outcomes of Active Surveillance for Prostate Cancer: The Memorial Sloan Kettering Cancer Center Experience. *The Journal of urology*. 2020;203(6):1122-7.
31. Tseng K, Landis P, Epstein J, Trock B, Carter H. Risk stratification of men choosing surveillance for low risk prostate cancer. *The Journal of urology*. 2010;183(5):1779-85.
32. Klotz L. Prostate cancer overdiagnosis and overtreatment. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2013;20(3):204-9.
33. Lund L, Svolgaard N, Poulsen M. Prostate cancer: a review of active surveillance. *Research and reports in urology*. 2014;6:107-12.
34. Walker C, Marchetti K, Singhal U, Morgan T. Active surveillance for prostate cancer: selection criteria, guidelines, and outcomes. *World journal of urology*. 2022;40(1):35-42.
35. Klotz L, Vesprini D, Sethukavalan P, Jethava V, Zhang L, Jain S, et al. Long-term follow-up of a large active surveillance cohort of patients with prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(3):272-76.
36. Bokhorst L, Valdagni R, Rannikko A, Kakehi Y, Pickles T, Bangma C, et al. A Decade of Active Surveillance in the PRIAS Study: An Update and Evaluation of the Criteria Used to Recommend a Switch to Active Treatment. *European urology*. 2016;70(6):954-60.
37. Ross A, Loeb S, Landis P, Partin A, Epstein J, Kettermann A, et al. Prostate-specific antigen kinetics during follow-up are an unreliable trigger for intervention in a prostate cancer surveillance program. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(17):2810-6.

38. Reese A, Feng Z, Landis P, Trock B, Epstein J, Carter H. Predictors of Adverse Pathology in Men Undergoing Radical Prostatectomy Following Initial Active Surveillance. *Urology*. 2015;86(5):991-5.
39. Oliveira I, Pontes-Junior J, Abe D, Crippa A, Dall'oglio M, Nesralah A, et al. Undergrading and understaging in patients with clinically insignificant prostate cancer who underwent radical prostatectomy. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2010;36(3):292-9.
40. Stephenson A, Smith A, Kattan M, Satagopan J, Reuter V, Scardino P, et al. Integration of gene expression profiling and clinical variables to predict prostate carcinoma recurrence after radical prostatectomy. *Cancer*. 2005;104(2):290-8.
41. Sokoll L, Sanda M, Feng Z, Kagan J, Mizrahi I, Broyles D, et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(5):1193-200.
42. Cooperberg M, Simko J, Cowan J, Reid J, Djalilvand A, Bhatnagar S, et al. Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(11):1428-34.
43. Eggener S, Rumble R, Armstrong A, Morgan T, Crispino T, Cornford P, et al. Molecular Biomarkers in Localized Prostate Cancer: ASCO Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(13):1474-94.
44. Kim H, Li P, Huang H, Deheshi S, Marti T, Knudsen B, et al. Validation of the Decipher Test for predicting adverse pathology in candidates for prostate cancer active surveillance. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2019;22(3):399-405.
45. Nowell P, Hungerford D. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*. 1960;25:85-109.
46. St John J, Powell K, Conley-Lacomb M, Chinni S. TMPRSS2-ERG Fusion Gene Expression in Prostate Tumor Cells and Its Clinical and Biological Significance in Prostate Cancer Progression. *Journal of cancer science & therapy*. 2012;4(4):94-101.
47. Tomlins S, Laxman B, Dhanasekaran S, Helgeson B, Cao X, Morris D, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature*. 2007;448(7153):595-9.
48. Wang J, Cai Y, Yu W, Ren C, Spencer D, Ittmann M. Pleiotropic biological activities of alternatively spliced TMPRSS2/ERG fusion gene transcripts. *Cancer research*. 2008;68(20):8516-24.
49. Hägglöf C, Hammarsten P, Strömvall K, Egevad L, Josefsson A, Stattin P, et al. TMPRSS2-ERG expression predicts prostate cancer survival and associates with stromal biomarkers. *PloS one*. 2014;9(2).

50. Park K, Tomlins S, Mudaliar K, Chiu Y, Esgueva R, Mehra R, et al. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia* (New York, NY). 2010;12(7):590-8.
51. Braun M, Goltz D, Adler D, Vogel W, Böhm D, Scheble V, et al. ERG protein expression and genomic rearrangement status in primary and metastatic prostate cancer--a comparative study of two monoclonal antibodies. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2012;15(2):165-9.
52. Sartori D, Chan D. Biomarkers in prostate cancer: what's new? *Current opinion in oncology*. 2014;26(3):259-64.
53. Robert G, Jannink S, Smit F, Aalders T, Hessels D, Cremers R, et al. Rational basis for the combination of PCA3 and TMPRSS2:ERG gene fusion for prostate cancer diagnosis. *The Prostate*. 2013;73(2):113-20.
54. Tomlins S, Bjartell A, Chinnaiyan A, Jenster G, Nam R, Rubin M, et al. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *European urology*. 2009;56(2):275-86.
55. Rubicz R, Zhao S, April C, Wright J, Kolb S, Coleman I, et al. Expression of cell cycle-regulated genes and prostate cancer prognosis in a population-based cohort. *The Prostate*. 2015;75(13):1354-62.
56. Demichelis F, Fall K, Perner S, Andrén O, Schmidt F, Setlur S, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*. 2007;26(31):4596-9.
57. Brooks J, Wei W, Hawley S, Auman H, Newcomb L, Boyer H, et al. Evaluation of ERG and SPINK1 by Immunohistochemical Staining and Clinicopathological Outcomes in a Multi-Institutional Radical Prostatectomy Cohort of 1067 Patients. *PLoS one*. 2015;10(7).
58. Lin D, Newcomb L, Brown E, Brooks J, Carroll P, Feng Z, et al. Urinary TMPRSS2:ERG and PCA3 in an active surveillance cohort: results from a baseline analysis in the Canary Prostate Active Surveillance Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(9):2442-50.
59. Berg K, Vainer B, Thomsen F, Røder M, Gerds T, Toft B, et al. ERG protein expression in diagnostic specimens is associated with increased risk of progression during active surveillance for prostate cancer. *European urology*. 2014;66(5):851-60.
60. Yoshimoto M, Cutz J, Nuin P, Joshua A, Bayani J, Evans A, et al. Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2006;169(2):128-37.
61. Yoshimoto M, Cunha I, Coudry R, Fonseca F, Torres C, Soares F, et al. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *British journal of cancer*. 2007;97(5):678-85.
62. Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman J, et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer research*. 1997;57(22):4997-5000.

63. Feilotter H, Nagai M, Boag A, Eng C, Mulligan L. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene*. 1998;16(13):1743-8.
64. Suzuki H, Freije D, Nusskern D, Okami K, Cairns P, Sidransky D, et al. Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer research*. 1998;58(2):204-9.
65. Wang S, Parsons R, Ittmann M. Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1998;4(3):811-5.
66. McMenamin M, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers W. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer research*. 1999;59(17):4291-6.
67. Verhagen P, van Duijn P, Hermans K, Looijenga L, van Gurp R, Stoop H, et al. The PTEN gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion. *The Journal of pathology*. 2006;208(5):699-707.
68. Lotan T, Gurel B, Sutcliffe S, Esopi D, Liu W, Xu J, et al. PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(20):6563-73.
69. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer P, De Silva C, Meyer-Kornblum M, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *The American journal of pathology*. 2012;181(2):401-12.
70. Chaux A, Peskoe S, Gonzalez-Roibon N, Schultz L, Albadine R, Hicks J, et al. Loss of PTEN expression is associated with increased risk of recurrence after prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2012;25(11):1543-9.
71. Leinonen K, Saramäki O, Furusato B, Kimura T, Takahashi H, Egawa S, et al. Loss of PTEN is associated with aggressive behavior in ERG-positive prostate cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2013;22(12):2333-44.
72. Reid A, Attard G, Ambrosine L, Fisher G, Kovacs G, Brewer D, et al. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *British journal of cancer*. 2010;102(4):678-84.
73. Fallahabadi Z, Noori Dalooi M, Mahdian R, Behjati F, Shokrgozar M, Abolhasani M, et al. Frequency of PTEN alterations, TMPRSS2-ERG fusion and their association in prostate cancer. *Gene*. 2016;575(2 Pt 3):755-60.
74. Yoshimoto M, Joshua A, Cunha I, Coudry R, Fonseca F, Ludkovski O, et al. Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2008;21(12):1451-60.

75. Tosoian J, Guedes L, Morais C, Mamawala M, Ross A, De Marzo A, et al. PTEN status assessment in the Johns Hopkins active surveillance cohort. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2019;22(1):176-81.
76. Heidenreich A, Bastian P, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *European urology*. 2014;65(1):124-37.
77. Mohler J, Kantoff P, Armstrong A, Bahnson R, Cohen M, D'Amico A, et al. Prostate cancer, version 2.2014. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2014;12(5):686-718.
78. Turkbey B, Rosenkrantz A, Haider M, Padhani A, Villeirs G, Macura K, et al. Prostate Imaging Reporting and Data System Version 2.1: 2019 Update of Prostate Imaging Reporting and Data System Version 2. *European urology*. 2019;76(3).
79. van Oort I, Witjes J, Kok D, Kiemeny L, Hulsbergen-vandeKaa C. Maximum tumor diameter is not an independent prognostic factor in high-risk localized prostate cancer. *World journal of urology*. 2008;26(3):237-41.
80. Epstein J, Carmichael M, Partin A, Walsh P. Is tumor volume an independent predictor of progression following radical prostatectomy? A multivariate analysis of 185 clinical stage B adenocarcinomas of the prostate with 5 years of followup. *The Journal of urology*. 1993;149(6):1478-81.
81. Palisaar R, Graefen M, Karakiewicz P, Hammerer P, Huland E, Haese A, et al. Assessment of clinical and pathologic characteristics predisposing to disease recurrence following radical prostatectomy in men with pathologically organ-confined prostate cancer. *European urology*. 2002;41(2):155-61.
82. Salomon L, Levrel O, Anastasiadis A, Irani J, De La Taille A, Saint F, et al. Prognostic significance of tumor volume after radical prostatectomy: a multivariate analysis of pathological prognostic factors. *European urology*. 2003;43(1):39-44.
83. Carvalhal G, Humphrey P, Thorson P, Yan Y, Ramos C, Catalona W. Visual estimate of the percentage of carcinoma is an independent predictor of prostate carcinoma recurrence after radical prostatectomy. *Cancer*. 2000;89(6):1308-14.
84. Ramos C, Roehl K, Antenor J, Humphrey P, Catalona W. Percent carcinoma in prostatectomy specimen is associated with risk of recurrence after radical prostatectomy in patients with pathologically organ confined prostate cancer. *The Journal of urology*. 2004;172(1):137-40.
85. Manoharan M, Civantos F, Kim S, Gomez P, Soloway M. Visual estimate of percent of carcinoma predicts recurrence after radical prostatectomy. *The Journal of urology*. 2003;170(4 Pt 1):1194-8.
86. Stamey T, Freiha F, McNeal J, Redwine E, Whittemore A, Schmid H. Localized prostate cancer. Relationship of tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer. *Cancer*. 1993;71(3 Suppl):933-8.
87. Wolters T, Roobol M, van Leeuwen P, van den Bergh R, Hoedemaeker R, van Leenders G, et al. Should pathologists routinely report prostate tumour volume? The prognostic value of tumour volume in prostate cancer. *European urology*. 2010;57(5):821-9.

88. AA R, JP R, KR L, M J, A C, AV DA. The greatest dimension of prostate carcinoma is a simple, inexpensive predictor of prostate specific antigen failure in radical prostatectomy specimens. *Cancer*. 1998;83(4):748-52.
89. Renshaw A, Richie J, Loughlin K, Jiroutek M, Chung A, D'Amico A. Maximum diameter of prostatic carcinoma is a simple, inexpensive, and independent predictor of prostate-specific antigen failure in radical prostatectomy specimens. Validation in a cohort of 434 patients. *American journal of clinical pathology*. 1999;111(5):641-4.
90. Eichelberger L, Koch M, Eble J, Ulbright T, Juliar B, Cheng L. Maximum tumor diameter is an independent predictor of prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(7):886-90.
91. Wise A, Stamey T, McNeal J, Clayton J. Morphologic and clinical significance of multifocal prostate cancers in radical prostatectomy specimens. *Urology*. 2002;60(2):264-9.
92. Kir G, Arikan E, Seneldir H, Ankarali H, Oznergiz S, Olgun Z, et al. Determining the cut-off values of tumor diameter, degree of extraprostatic extension, and extent of surgical margin positivity with regard to biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *Annals of diagnostic pathology*. 2020;44.
93. Ito Y, Vertosick E, Sjoberg D, Vickers A, Al-Ahmadie H, Chen Y, et al. In Organ-confined Prostate Cancer, Tumor Quantitation Not Found to Aid in Prediction of Biochemical Recurrence. *The American journal of surgical pathology*. 2019;43(8):1061-5.
94. Dvorak T, Chen M, Renshaw A, Loffredo M, Richie J, D'Amico A. Maximal tumor diameter and the risk of PSA failure in men with specimen-confined prostate cancer. *Urology*. 2005;66(5):1024-8.
95. Müller G, Rieken M, Bonkat G, Gsponer J, Vlajnic T, Wetterauer C, et al. Maximum tumor diameter adjusted to the risk profile predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2014;465(4):429-37.
96. Tosoian J, Mamawala M, Epstein J, Landis P, Wolf S, Trock B, et al. Intermediate and Longer-Term Outcomes From a Prospective Active-Surveillance Program for Favorable-Risk Prostate Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(30):3379-85.
97. Kinsella N, Helleman J, Bruinsma S, Carlsson S, Cahill D, Brown C, et al. Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of contemporary worldwide practices. *Translational andrology and urology*. 2018;7(1):83-97.
98. Song M, Salmena L, Pandolfi P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(5):283-96.
99. Jamaspishvili T, Berman D, Ross A, Scher H, De Marzo A, Squire J, et al. Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nature reviews Urology*. 2018;15(4):222-34.
100. Wang Y, Dai B. PTEN genomic deletion defines favorable prognostic biomarkers in localized prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(4):5430-7.

101. Troyer D, Jamaspishvili T, Wei W, Feng Z, Good J, Hawley S, et al. A multicenter study shows PTEN deletion is strongly associated with seminal vesicle involvement and extracapsular extension in localized prostate cancer. *The Prostate*. 2015;75(11):1206-15.
102. Epstein J, Amin M, Fine S, Algaba F, Aron M, Baydar D, et al. The 2019 Genitourinary Pathology Society (GUPS) White Paper on Contemporary Grading of Prostate Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2021;145(4):461-93.
103. Lokman U, Erickson A, Vasarainen H, Rannikko A, Mirtti T. PTEN Loss but Not ERG Expression in Diagnostic Biopsies Is Associated with Increased Risk of Progression and Adverse Surgical Findings in Men with Prostate Cancer on Active Surveillance. *European urology focus*. 2018;4(6):867-73.
104. Lee D, Fontugne J, Gumpeni N, Park K, MacDonald T, Robinson B, et al. Molecular alterations in prostate cancer and association with MRI features. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2017;20(4):430-5.
105. Baumgartner E, Del Carmen Rodriguez Pena M, Eich M, Porter K, Nix J, Rais-Bahrami S, et al. PTEN and ERG detection in multiparametric magnetic resonance imaging/ultrasound fusion targeted prostate biopsy compared to systematic biopsy. *Human pathology*. 2019;90:20-6.
106. Erickson A, Lokman U, Lahdensuo K, Tornberg S, Visapaa H, Bergroth R, et al. PTEN and ERG expression in MRI-ultrasound guided fusion biopsy correlated with radical prostatectomy findings in men with prostate cancer. *The Prostate*. 2020;80(13):1118-27.
107. Eineluoto J, Sandeman K, Pohjonen J, Sopyllo K, Nordling S, Stürenberg C, et al. Associations of PTEN and ERG with Magnetic Resonance Imaging Visibility and Assessment of Non-organ-confined Pathology and Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. *European urology focus*. 2021;7(6):1316-23.
108. McCann S, Jiang Y, Fan X, Wang J, Antic T, Prior F, et al. Quantitative Multiparametric MRI Features and PTEN Expression of Peripheral Zone Prostate Cancer: A Pilot Study. *AJR American journal of roentgenology*. 2016;206(3):559-65.
109. Van den Broeck T, van den Bergh R, Arfi N, Gross T, Moris L, Briers E, et al. Prognostic Value of Biochemical Recurrence Following Treatment with Curative Intent for Prostate Cancer: A Systematic Review. *European urology*. 2019;75(6):967-87.
110. Cullen J, Young D, Chen Y, Degon M, Farrell J, Sedarsky J, et al. Predicting Prostate Cancer Progression as a Function of ETS-related Gene Status, Race, and Obesity in a Longitudinal Patient Cohort. *European urology focus*. 2018;4(6):818-24.
111. Kim S, Kim S, Joung J, Lee G, Hong E, Kang K, et al. Overexpression of ERG and Wild-Type PTEN Are Associated with Favorable Clinical Prognosis and Low Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *PloS one*. 2015;10(4).
112. Yan W, Jamal M, Tan S, Song Y, Young D, Chen Y, et al. Molecular profiling of radical prostatectomy tissue from patients with no sign of progression identifies ERG as the strongest independent predictor of recurrence. *Oncotarget*. 2019;10(60):6466-83.

113. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke A, Krohn A, Mayer P, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(18):5878-88.
114. Hoogland A, Jenster G, van Weerden W, Trapman J, van der Kwast T, Roobol M, et al. ERG immunohistochemistry is not predictive for PSA recurrence, local recurrence or overall survival after radical prostatectomy for prostate cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2012;25(3):471-9.
115. Schaefer G, Mosquera J, Ramoner R, Park K, Romanel A, Steiner E, et al. Distinct ERG rearrangement prevalence in prostate cancer: higher frequency in young age and in low PSA prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2013;16(2):132-8.
116. Song C, Chen H. Predictive significance of TMRPSS2- ERG fusion in prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer cell international*. 2018;18:177.
117. Attard G, Clark J, Ambrosine L, Fisher G, Kovacs G, Flohr P, et al. Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene*. 2008;27(3):253-63.
118. Nam R, Sugar L, Wang Z, Yang W, Kitching R, Klotz L, et al. Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression. *Cancer biology & therapy*. 2007;6(1):40-5.
119. Haney N, Faisal F, Lu J, Guedes L, Reuter V, Scher H, et al. PTEN Loss with ERG Negative Status is Associated with Lethal Disease after Radical Prostatectomy. *The Journal of urology*. 2020;203(2):344-50.
120. Ahearn T, Pettersson A, Ebot E, Gerke T, Graff R, Morais C, et al. A Prospective Investigation of PTEN Loss and ERG Expression in Lethal Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;108(2):dju346.
121. Salles D, Mendes A, Han M, Partin A, Trock B, Jing Y, et al. ERG Status at the Margin is Associated with Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy with Positive Surgical Margins. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2023.
122. Tosoian J, Almutairi F, Morais C, Glavaris S, Hicks J, Sundi D, et al. Prevalence and Prognostic Significance of PTEN Loss in African-American and European-American Men Undergoing Radical Prostatectomy. *European urology*. 2017;71(5):697-700.

APÊNDICE

APÊNDICE

Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos pacientes de fevereiro de 2013 a agosto de 2018

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO N..... APTO:
BAIRRO:CIDADE.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA “O PAPEL PROGNÓSTICO DA FUSÃO
TMPRSS2:ERG E DA DELEÇÃO DO PTEN NO MANEJO DOS PACIENTES
COM CÂNCER DE PRÓSTATA DE BAIXO RISCO”.

PESQUISADOR: Profº Dr. William Carlos Nahas

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular de Urologia HCFMUSP / Chefe do Departamento de Urologia Oncológica (ICESP/HCFMUSP)

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CRM 34807

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Uro-Oncologia

VALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	<input checked="" type="checkbox"/>	RISCO MÉDIO	<input type="checkbox"/>
RISCO BAIXO	<input type="checkbox"/>	RISCO MAIOR	<input type="checkbox"/>

DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

O senhor está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa cujo objetivo é avaliar a presença de duas substâncias específicas na próstata. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo de caráter retrospectivo que tem por objetivo avaliar a concentração das proteínas ERG e PTEN nos pacientes com diagnóstico de câncer de próstata de baixo risco que estão em tratamento em nosso hospital. Atualmente não existe consenso sobre a melhor opção de tratamento para o câncer de próstata de baixo risco, sendo os pacientes tratados com cirurgia, radioterapia ou vigilância ativa. A expressão destas duas proteínas será avaliada no material de biópsia de próstata que já foi coletada previamente e que deu o seu diagnóstico de câncer de próstata. Avaliaremos também a expressão dessas mesmas proteínas nos pacientes que foram submetidos a tratamento cirúrgico com a retirada da próstata. Não há benefício imediato direto para você, mas os resultados desta pesquisa nos ajudarão a entender melhor o funcionamento da doença o que pode ajudar no tratamento futuro de outras pessoas. Ao participar desta pesquisa, o seu tratamento não vai ser alterado. Não será solicitado nenhuma consulta ou visita adicional durante o estudo. Você pode não querer fazer parte da pesquisa, o que não acarretará nenhuma consequência no seu tratamento, nesse caso você não deve assinar esse termo.

Em qualquer etapa do estudo você poderá conversar com os profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecer eventuais dúvidas. O principal responsável é o **Prof. Dr. William Carlos Nahas** que pode ser encontrado no endereço (Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César, São Paulo - SP, 01246-000 – Tel: (11) 3893-2528). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre esse estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa **Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Faculdade de Medicina da USP (CEP-FMUSP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 1º andar – tel: 30618004– E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br**

Você pode retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar deste projeto de pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na

Instituição. As informações obtidas com seu material, bem como seu armazenamento, serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação. Comprometemos a informá-lo caso algo que possa lhe beneficiar for descoberto com a pesquisa. Você não terá gastos para participar deste estudo, bem como nenhuma visita adicional será necessária, mas também não receberá nenhuma ajuda financeira. O pesquisador se compromete a utilizar o material coletado somente para o estudo em questão.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“O PAPEL PROGNÓSTICO DA FUSÃO TMPRSS2:ERG E DA DELEÇÃO DO PTEN NO MANEJO DOS PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA DE BAIXO RISCO”**. Discuti com o **Prof. Dr. William Carlos Nahas** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/ representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Apêndice 2 – Artigo submetido para revista *The Journal of Urology*

The Journal of Urology

ERG and PTEN expressions are not predictive factors for Gleason score progression during active surveillance for low-risk prostate cancer in the multiparametric MRI era
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Adult Urology Article
Full Title:	ERG and PTEN expressions are not predictive factors for Gleason score progression during active surveillance for low-risk prostate cancer in the multiparametric MRI era
First Author:	Marco Aurelio Watanabe Yorioka, M.D.
Corresponding Author:	Marco Aurelio Watanabe Yorioka, M.D. Universidade de São Paulo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo: Universidade de Sao Paulo Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo São Paulo, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author E-Mail:	marcoyorioka@gmail.com
Corresponding Author's Institution:	Universidade de São Paulo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo: Universidade de Sao Paulo Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo
Order of Authors:	Marco Aurelio Watanabe Yorioka, M.D. Claudio Bovolenta Murta, M.D. Katia Ramos Moreira Leite, M.D; P.H.D. Leonardo Cardili, M.D. Arnaldo Fazoli, M.D. Mauricio Dener Cordeiro, M.D. Rafael Ferreira Coelho, M.D. William Carlos Nahas, M.D; P.H.D. Jose Pontes Jr, M.D; P.H.D.
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Keywords:	prostate cancer; ERG; PTEN
Manuscript Classifications:	40: Organs; 60: Diagnosis; 60.201: Tumor markers; 10.150: Oncology; 40.210: Prostate; 10: Medical topics
Abstract:	<p>Purpose: Our study aimed to correlate ERG and PTEN expressions in biopsy with multiparametric magnetic resonance imaging PI-RADS score, progression, and prognosis of very low-risk prostate cancer patients under active surveillance.</p> <p>Materials and Methods: We evaluated 101 very low-risk PCa patients under AS between 2013 and 2018, followed with DRE, PSA, MRI, and re-biopsies every 1-2 years. Per cause biopsy was indicated if PSA>10ng/mL, suspicious DRE or PI-RADS ≥4. ERG and PTEN expressions were assessed by immunohistochemistry at biopsy. Progression was defined by PSA>10ng/mL, re-biopsy with >3 positive cores, >50% positive core or Gleason ≥7. We correlated ERG and PTEN with progression, PI-RADS, pathologic outcomes, and biochemical recurrence in patients surgically treated after progression.</p> <p>Results: After 49.2-month follow-up, 80% of patients showed progression, and Gleason score upgrade was the most common criterion. 74 out of 81 patients with progression underwent treatment, and seven had biochemical recurrence during a mean 39.7-month follow-up. At biopsy, ERG-positive was found in 39.6% of patients and PTEN-negative in 12.6%. PTEN-negative was associated with Gleason upgrade (OR=9.7, p=0.011). ERG-positive was associated with PI-RADS ≥4 (OR=2.8, p=0.026). At multivariate analysis, percentage of positive core and PI-RADS≥4 were predictors of Gleason upgrade (OR=4.8 and OR=17.8, p≤0.001). When MRI findings were not included in multivariate analysis, PTEN loss was associated with Gleason upgrade (OR=10.4; p=0.011).</p>

	Conclusions : PI-RADS score is an independent predictor of Gleason progression during AS. PTEN loss expression is associated with Gleason upgrade when MRI is not considered. ERG-positive was associated with higher PI-RADS score.
Author Comments:	
Suggested Reviewers:	Matthew Cooperberg UCSF Medical Center matthew.cooperberg@ucsf.edu Research focus in prostate cancer and biomarkers
	João Arthur Brunhara Barbosa Albert Einstein Medical Center jbrunhara@gmail.com Urologist with focus on Oncology and prostate cancer
Opposed Reviewers:	