

**ANÁLISE DA PERDA DE EXPRESSÃO DO PTEN DETECTADA  
POR FISH E IMUNO-HISTOQUÍMICA EM PACIENTES COM  
CÂNCER DE PRÓSTATA DE MUITO BAIXO RISCO  
ELEGÍVEIS AO PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA ATIVA  
SUBMETIDOS A PROSTATECTOMIA RADICAL**

**BRUNO SANTOS BENIGNO**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Mestre  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Gustavo Cardoso Guimarães  
Co-Orientadores: Dra. Isabela Werneck da  
Cunha, Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**

**São Paulo**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Benigno, Bruno Santos

**Análise da deleção genômica do PTEN detectada por FISH e imuno-histoquímica em pacientes com câncer de próstata de muito baixo risco elegíveis à protocolo de vigilância ativa submetidos à prostatectomia radical / Bruno Santos Benigno – São Paulo, 2016.**

28p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Gustavo Cardoso Guimarães

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA PRÓSTATA. 2. DELEÇÃO DE GENES. 3. PROSTATECTOMIA. 4. IMUNO-HISTOQUÍMICA.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus Pais, Olimpia e Jorge, que sempre deram suporte aos meus sonhos e nunca duvidaram que um dia eu poderia alcançá-los.

Aos meus Mestres, que sempre instigaram a curiosidade em mim e transmitiram com sabedoria seus conhecimentos.

Aos pacientes que consentiram a análise das informações aqui contidas e acreditaram que ao contribuir com a ciência tornaremos o mundo um lugar melhor para viver.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores, Dr. Gustavo Guimarães, Dra. Isabela Werneck e Prof. Dr. Fernando Soares, que dedicaram seu tempo e entusiasmo em todas as etapas desse projeto.

Ao Dr. Jeremy, que gentilmente cedeu parte dos reagentes utilizados para a pesquisa da deleção gênica.

## RESUMO

Benigno BS. **Análise da deleção genômica do PTEN detectada por FISH e imuno-histoquímica em pacientes com câncer de próstata de muito baixo risco elegíveis à protocolo de vigilância ativa submetidos à prostatectomia radical.** São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O sub-estadiamento do câncer de próstata dificulta a identificação de tumores com maior agressividade. Esforços para incorporar a biologia molecular e métodos de imagem à avaliação pré-operatória se tornam cada vez mais importantes para estimar risco de progressão. Nosso objetivo primário foi avaliar a possível associação entre a ausência de expressão do PTEN em biópsias de próstata e características patológicas observadas pós prostatectomia. Os objetivos secundários foram: impacto em sobrevida global; câncer específica e sobrevida livre de recorrência bioquímica. Avaliamos biópsias de 24 pacientes de muito baixo risco (Gleason  $\leq 6$ ; PSA  $\leq 10$ ; PSAD  $\leq 0.15$ ;  $\leq 2$  fragmentos com até  $\leq 50\%$  de envolvimento tumoral; e estadio clínico T1c.), elegíveis ao protocolo de vigilância ativa, operados de 2005 a 2008 em um centro terciário. A perda da expressão do PTEN foi detectada em 20% da amostra ( $n=5$ ). Se associou a invasão angio-linfática ( $P=0.04$ ) e não mostrou impacto em sobrevida livre de recorrência (SRL), sobrevida câncer específica (SCE) e sobrevida global (SG). Concluímos que a perda da expressão do PTEN não apresentou impacto prognóstico para tomada de decisão em um grupo de muito baixo risco.

## SUMMARY

Benigno BS. **[Analysis of the genomic deletion of PTEN detected by FISH and immunohistochemistry in patients with very low risk prostate cancer eligible for active surveillance protocol undergoing radical prostatectomy]**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Prostate cancer understaging is a major source of missing aggressive tumors. Efforts to incorporate molecular biology and imaging techniques to preoperative evaluation become increasingly important to estimate the risk of progression. We evaluate biopsies from 24 prostate cancer very low-risk patients (Gleason  $\leq 6$ ; PSA  $\leq 10$ ng/dl; PSAD  $\leq 0.15$ ;  $\leq 2$  fragments with up to  $\leq 50\%$  of tumor involvement; and clinical stage T1c), that would be eligible for active surveillance protocol, treated with radical prostatectomy, from 2005 to 2008 at a tertiary cancer center. Our primary objective was to evaluate the relationship between the loss of PTEN expression in prostate biopsies and correlate to pathological features after radical prostatectomy. Our secondary objectives were: impact on overall survival; cancer specific survival and biochemical recurrence free survival. The loss of PTEN expression was detected in 20% of cases (n = 5); was associated to angiolymphatic invasion (P= 0.04) and demonstrated no impact on recurrence free survival, cancer specific survival and overall survival. We conclude that loss of PTEN expression may not influence in decision-making in a very low risk group of patients.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b>	Demonstração da exclusão de casos que não preenchem os critérios de inclusão.....	9
<b>Figura 2</b>	Fotomicrografia.....	13
<b>Tabela 1</b>	Características demográficas pré-operatórias agrupadas de acordo com o status do PTEN na imuno-histoquímica.....	16
<b>Tabela 2</b>	Características pós-operatórias agrupadas de acordo com o status do PTEN na imuno-histoquímica.....	17

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CP</b>	Câncer de próstata
<b>EEC</b>	Extensão extracapsular
<b>IAL</b>	Invasão angiolinfática
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IPN</b>	Invasão perineural
<b>PSAD</b>	Densidade do PSA
<b>SCE</b>	Sobrevida câncer específica
<b>SG</b>	Sobrevida global
<b>SLR</b>	Sobrevida livre de recorrência
<b>VA</b>	Vigilância ativa



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
3.1	Critérios de inclusão .....	7
3.2	Critérios de exclusão .....	7
3.3	Técnicas empregadas .....	10
3.3.1	Protocolo de imuno-histoquímica e interpretação.....	10
3.3.2	Protocolo de hibridação <i>in situ</i> e interpretação.....	11
3.3.3	Pacientes e amostras de tecidos.....	12
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>14</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>24</b>

## **ANEXO**

**Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é a neoplasia não cutânea maligna mais frequente em homens, com incidência estimada nos Estados Unidos (EUA) de aproximadamente 220.800 casos novos em 2015, correspondendo a 25% de todos os cânceres diagnosticados nessa população. Destes, estima-se que cerca de 27.000 indivíduos morreram em decorrência da doença naquele país (SIEGEL et al. 2015). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), cerca de 68.800 mil casos novos foram diagnosticados em 2014 (Ministério da Saúde 2014).

Há evidências que o diagnóstico do câncer de próstata (CP) antecede 5 a 10 anos sua possível significância clínica (PEARSON e CARTER 1994; CARTER et al. 2007; JOHANSSON et al. 2004; KING et al. 2013). Na era do PSA (a partir do início de 1990) presenciamos o aumento da detecção desta neoplasia e a migração do diagnóstico de estádios clínicos mais avançados, para a detecção em maior proporção de doença localizada.

Com intuito de melhor predizer o comportamento do CP, critérios clínicos, laboratoriais, de imagem, genéticos e epigenéticos tem sido investigados. A estratificação em categorias de risco de D'AMICO et al. (1998) e a utilização de nomogramas, como o de KATTAN et al.

(1998) são aplicados como ferramentas para auxiliar a seleção do tratamento e estimar a probabilidade de recorrência; doença metastática; sobrevida e características patológicas adversas. Entretanto, tais sistemas de estimativa de risco se estruturam fundamentalmente em classificação histológica (Gleason), que sabidamente é limitada para prever com acurácia o comportamento tumoral, principalmente no cenário de doença de baixo risco.

A discordância entre o Gleason da biópsia e da peça cirúrgica pode ocorrer em cerca de 1/3 dos casos, levando a possíveis erros na estimativa do risco de progressão da doença e sub-estadiamento (LEITE et al. 2008; NESRALLAH et al. 2008; OLIVEIRA et al. 2010; EPSTEIN et al. 2012; IREMASHVILI et al. 2012). A mudança de grau histológico pode ocorrer por múltiplas razões, incluindo progressão tumoral, erros no processamento do tecido a ser analisado e influencia da experiência do observador. Entretanto a principal causa é a não representatividade na amostra - *undersampling* - da lesão de mais alto grau (EPSTEIN et al. 2012).

EPSTEIN et al. (1994) descreveram a associação entre parâmetros clínicos, laboratoriais e patológicos para a identificação de tumores clinicamente insignificantes na biópsia, agrupados em categoria conhecida como: muito baixo risco (Gleason  $\leq 6$ ; PSA  $\leq 10$ ; PSAD  $\leq 0.15$ ;  $\leq 2$  fragmentos com até  $\leq 50\%$  de envolvimento tumoral;

estádio clínico T1c). Acredita-se que neste grupo a doença tenha maior probabilidade de apresentar um comportamento indolente.

Visando diminuir as taxas de super-tratamento e os riscos de possíveis efeitos adversos, protocolos de vigilância ativa (VA) tem sido empregados por diversos grupos, (CARTER et al. 2007; LARGE e EGGNER 2009; DALL'ERA et al. 2012; KLOTZ et al. 2015). Contudo, não há consenso a respeito dos critérios de inclusão ideais.

KLOTZ et al. (2015) em sua coorte de vigilância ativa com 993 pacientes de baixo risco e risco intermediário, relataram 94.3% de SCE e 85% de SG, em seguimento de até 15 anos. Sugerindo que sua abordagem é segura nesta população selecionada.

Fica nítido a importância da diferenciação entre tumores indolentes e de alta agressividade, para a escolha da melhor abordagem terapêutica ou inclusão em vigilância ativa (VA).

Na tentativa de melhor selecionar os pacientes candidatos a VA, a ressonância magnética multiparamétrica, biópsias com técnicas de fusão de imagens e marcadores moleculares - como o PTEN e outros - vem ganhando importância (MCMENAMIN et al. 1999; DREHER et al. 2004; REID et al. 2010; CUZICK et al. 2013; SIDDIQUI et al. 2013; LOTAN et al. 2014; MITHAL et al. 2014).

O *Phosphatase and Tensin Homolog on Chromosome* (PTEN 10q23) é um dos genes supressores tumorais mais frequentemente

mutados em tumores humanos. Funciona evitando o acúmulo de Fosfatidil-inositol 3,4,5, que é um ativador da via AKT. Este último é responsável pela ativação do mTOR, que é uma via promotora da proliferação celular (MCMENAMIN et al. 1999). Sua deleção tem sido descrita em mais de 2/3 dos pacientes com câncer avançado/agressivo da próstata. A ausência de sua expressão adequada foi associada à maior agressividade tumoral, mudança de Gleason após prostatectomia e evolução clínica desfavorável (HALVORSEN et al. 2003; KOKSAL et al. 2004; BLANCO-APARICIO et al. 2007; YOSHIMOTO et al. 2006, 2007, 2008, 2013; GHOSH 2012; KROHN et al. 2012; SONG et al. 2012; LOTAN et al. 2014).

HAN et al. (2009) reportaram a deleção do PTEN em 57% dos pacientes com doença metastática e 17% dos pacientes com doença localizada.

De forma contrária, a deleção do PTEN isolada, não foi preditora de recorrência bioquímica. Sendo significativa apenas quando associada a outros biomarcadores, como alta expressão de phos-AKT e fusões de TMPRSS2: ERG (BEDOLLA et al. 2007; YOSHIMOTO et al. 2008; CHAUX et al. 2011).

Diversas séries na literatura investigaram a deleção gênica do *PTEN* ou a ausência de sua expressão proteica em grupos com

características de risco heterogêneas. Entretanto, análises em um subgrupo específico de muito baixo risco são escassas.

Dessa maneira, nosso trabalho objetivou avaliar qual a associação entre a deleção e expressão imuno-histoquímica de PTEN nos fragmentos da biópsia pré-operatória e as características patológicas e clínicas encontradas na peça cirúrgica pós-prostatectomia radical, especificamente em uma amostra de pacientes com CP de muito baixo risco. A fim de contribuir para melhorar a acurácia na seleção e inclusão destes pacientes em protocolos de VA.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar o papel prognóstico da expressão de PTEN em fragmentos de biópsia de próstata de pacientes de muito baixo risco, submetidos à prostatectomia radical

Avaliar a associação da expressão de PTEN com variáveis clínicas, patológicas e desfechos clínicos.

Avaliar a concordância entre a expressão da proteína PTEN na imuno-histoquímica e a pesquisa de deleção gênica através de FISH.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Após aprovação do comitê de ética institucional do A.C.Camargo Cancer Center - um centro terciário - selecionamos prontuários médicos de 643 pacientes com câncer de próstata de baixo risco de D'AMICO et al. (1998) , submetidos à prostatectomia radical, de janeiro de 2005 a janeiro de 2008. Através do software de busca interna - ReCruit - aplicamos os termos de busca [prostatectomia]; [prostatectomia radical]; [Adenocarcinoma]; [gleason 3+3]; [Câncer de próstata]; [CID C61].

Não utilizamos agencias de fomento para financiamento do trabalho.

#### **3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

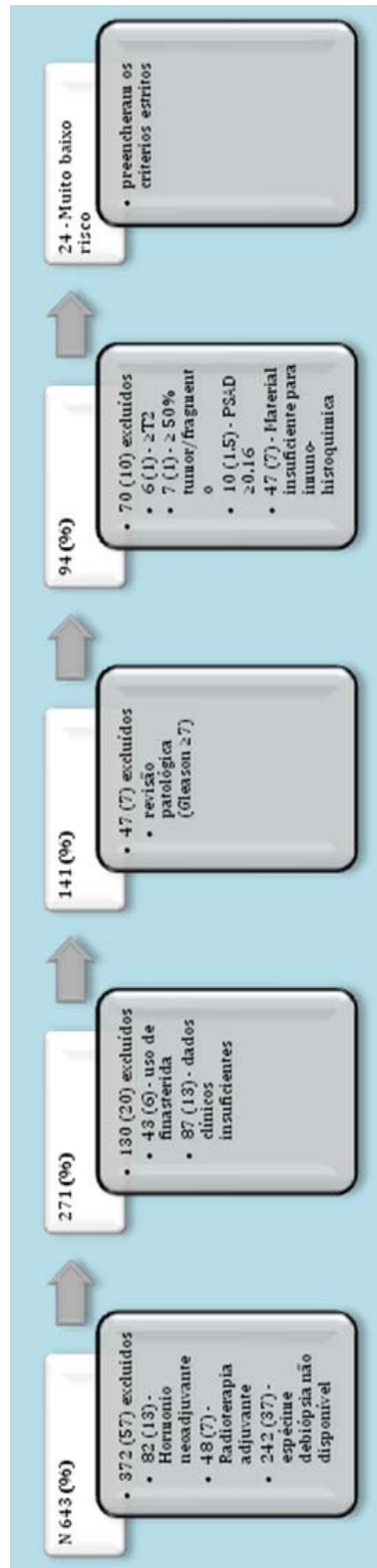
Os pacientes incluídos na análise final preenchiem estritamente os critérios de muito baixo risco definidos por EPSTEIN et al. (1994) - Gleason  $\leq 6$ ; PSA  $\leq 10$ ng/dl; PSAD  $\leq 0.15$ ;  $\leq 2$  fragmentos com até  $\leq 50\%$  de envolvimento tumoral; estadio clinico T1c.

#### **3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

- Pacientes submetidos à terapia neoadjuvante: radioterapia externa, braquiterapia ou hormonio-terapia;
- Material insuficiente para análise imuno-histoquímica ou FISH;



- Dados insuficientes no prontuário;
- Não preencherem integralmente os critérios de inclusão;
- Usaram finasterida ou dutasterina;
- Revisão patológica cenfatral com Gleason  $\geq 7$ ;
- Estadio clinico  $\geq T2$ .



**Figura 1** - Demonstração da exclusão de casos que não preenchem os critérios de inclusão

### 3.3 TÉCNICAS EMPREGADAS

A análise imuno-histoquímica foi realizada através de sistema automatizado, de acordo com protocolos já estabelecidos no departamento de anatomia patológica desta instituição, descritos abaixo.

As reações foram realizadas em cortes inteiros e avaliada por 1 patologista (IWC), seguindo padrões de marcação de intensidade e número de células positivas.

#### 3.3.1 Protocolo de imuno-histoquímica e interpretação

- PROTOCOLO AUTOMATIZADO = equipamento VENTANA

As lâminas foram identificadas com etiquetas de códigos de barras e processadas no equipamento Benchmark ULTRA (Ventana) para desparafinização em solução de EZ PREP (Ventana) e recuperação antigênica por calor em solução CC1 (ultra Cell Conditionig Solution) pH alto a 96°C por 64minutos.

A peroxidase endógena foi bloqueada por 5 minutos utilizando-se o reagente de bloqueio de peroxidase (ultraView Universal DAB Inhibitor(3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), seguido de lavagem em solução de lavagem (Reaction Buffer).

Em seguida os cortes foram incubados com anticorpo PTEN, clone 17-A (Thermo Scientific) com diluição de 1/50 por 32 minutos. Na seqüência os cortes foram incubados com polímero HRP (HRP Multimer) com subsequentes lavagens em tampão.

Logo após foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidine (DAB) lavados em tampão e contracolorados com hematoxilina, por 12

minutos, (Hematoxylin II-Ventana), diferenciadas em Bluing (Ventana) por 4 minutos, lavadas com Reaction Buffer (Ventana), água com detergente para retirada do LCS, seguida de lavagem em água corrente.

As lâminas foram desidratadas em álcool, xilol e montadas com Tissue-Tek film (Sakura).

Cada caso foi avaliado por uma patologista experiente (IWC). Foi considerada a avaliação nuclear e também citoplasmática tanto do tecido prostático não tumoral quanto da região do adenocarcinoma. Os casos foram classificados de acordo com um sistema dicotomizado, descrito anteriormente por LOTAN et al. (2011).

Os casos foram considerados com perda da expressão de PTEN se a intensidade da marcação citoplasmática e nuclear era marcadamente diminuída ou ausente em >10% das células tumorais, comparado ao tecido benigno adjacente e/ou estroma.

### **3.3.2 Protocolo de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e interpretação**

Primeiro dia: os casos foram desparafinizados em Xilol (3 banhos de 10 minutos cada seguido de passagens em álcool (3 banhos de 5 minutos cada) e água destilada (3 banhos de 2 minutos cada). Após foi realizado banho em solução 0.2N HCl - por 20 minutos à temperatura ambiente e pré-tratamento em Citrato pH 6,0 - 80° C em Banho-maria por 1 hora.

Foi realizada a digestão enzimática com pepsina (pronta pra uso) por 7 minutos à temperatura ambiente seguida de lavagens em solução de 2 X SSC por 2 minutos à temperatura ambiente. Após as lâminas foram

submetidas a desidratação em álcool, 75%, 80%, 100% por 2 minutos cada e secadas ao ar.

Procedeu-se então a aplicação de 10µl da sonda PTEN/cep10 (Vysis) e incubação no Hibridizador para Denaturação e Hibridização (Denaturação: 80°C-5 minutos; Hibridização: 37°C - 20 horas).

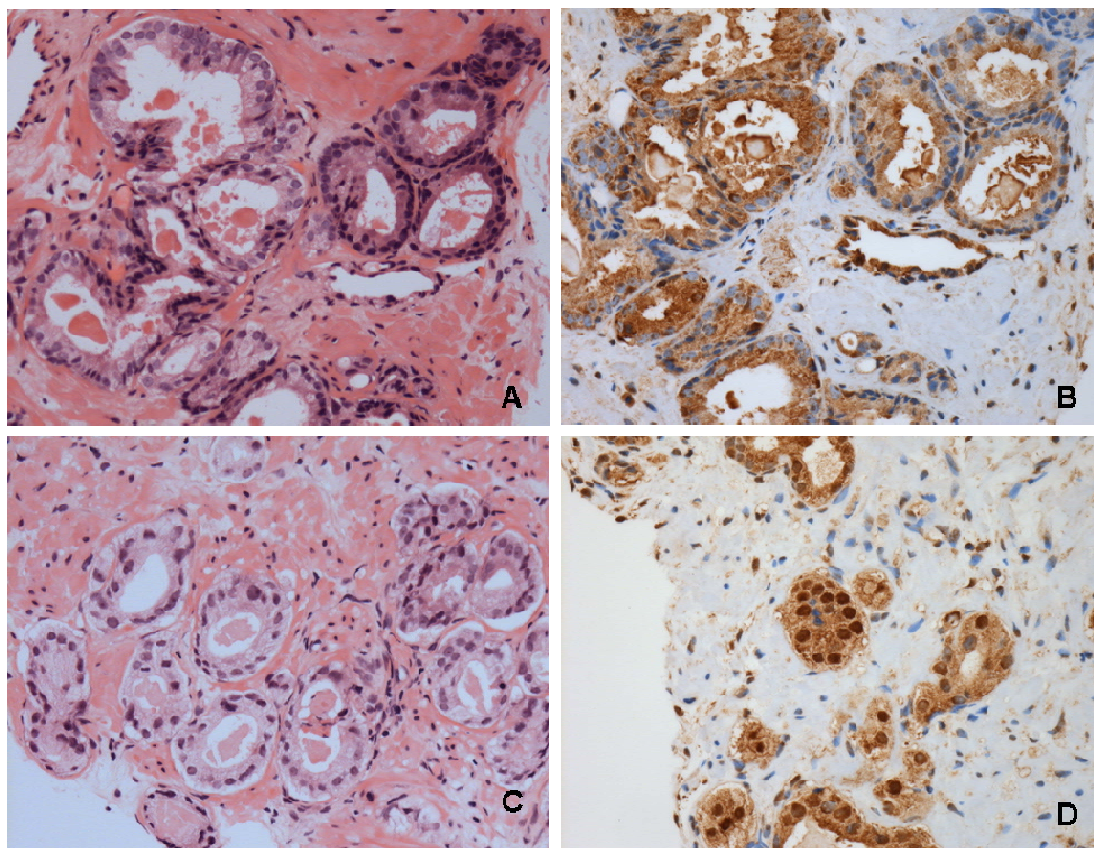
No segundo dia as lâminas foram mergulhadas em solução de UREA/ 0,1 x SSC - 45°C por 30 minutos, seguidas de lavagem em solução 2xSSC por 2 minutos à temperatura ambiente, desidratação em álcool 75%, 80% e 100% por 2 minutos cada e secagem das lâminas ao ar. Por fim foi aplicado 15µl DAPI, e procedeu a montagem com lamínula.

Um caso foi considerado normal quando havia duas cópias do gene *PTEN* e dois sinais do centrômero do cromossomo 10. Deleção hemizigótica quando houve perda de 1 cópia do gene *PTEN* e deleção homozigótica quando as 2 cópias estavam perdidas.

### **3.3.3 Pacientes e amostras de tecidos**

Nossa instituição é um centro de referência terciário que recebe pacientes de todo o país. A grande maioria foi submetido à primeira biópsia em outro serviço. Em nossa casuística 37% (n=372) dos casos foram excluídos de início por falta de tecido de biópsia para análise.

Todos os espécimes de biópsia e prostatectomia foram revisados por uma patologista experiente (IWC), utilizando a classificação modificada de 2005 da *International Society of Urologic Pathology* (ISUP) (EPSTEIN et al. 2006).



**Figura 2** - Fotomicrografia. A e B o Adenocarcinoma acinar prostático usual, Gleason 6 (3+3), HE e perda da expressão nuclear de PTEN (400x), respectivamente. Em C e D, Adenocarcinoma acinar usual prostático, Gleason 6 (3+3), HE e presença de expressão nuclear de PTEN (400x).

## 4 METODOLOGIA

Médias e proporções das características pré e pós-operatórias entre os grupos (PTEN-vs PTEN+) foram comparadas usando o  $\chi^2$  e Mann-Whitney quando aplicáveis. A análise uni e multivariada foi prejudicada pelo tamanho da amostra. As curvas de sobrevida não foram geradas, uma vez que não houve eventos no período avaliado. Para a análise estatística utilizamos o Software SPSS 2012 - v21.0.0.0, no sistema operacional Mac Os X v10.10.3, 2015.

## 5 RESULTADOS

Observamos a ausência de expressão da proteína PTEN em 20% dos casos (n=5). A média de idade foi menor no grupo PTEN- (57 vs 63 anos;  $P=0.1$ ; Tabela 1). Não houve diferenças raciais entres os grupos. O grupo com o PTEN- teve uma maior média de fragmentos por biópsia (15 vs 12;  $P=0.19$ ). Observamos menor intervalo entre a biópsia e a cirurgia no grupo do PTEN- (54 vs 106 dias;  $P=0.5$ ). Dentre todos os espécimes de biópsia avaliados, em apenas 6 casos havia material adequado para a avaliação por FISH. Destes, apenas 1 caso apresentou a deleção heterozigótica do *PTEN*. Não houve casos com deleção do *PTEN* no grupo em que a imuno-histoquímica foi positiva para a expressão da proteína PTEN.

A Tabela 2 mostra as características patológicas pós-operatórias agrupadas de acordo com o *status* do PTEN na imuno-histoquímica. Apenas 3 casos (17%) sofreram *upgrade* do score de Gleason (1 no grupo do PTEN- vs 3 no PTEN+;  $P=0.56$ ). A invasão angio-linfática foi detectada em 20% (n=1) dos casos com PTEN- e não foi observada no grupo com a expressão da proteína ( $P=0.04$ ). Multicentricidade foi maior no grupo PTEN- (60% vs 47%;  $P=0.61$ ).

O seguimento médio entre os grupos foi maior no grupo com PTEN+ (60 vs 49 meses;  $P=0.43$ ). Não houve casos de recidiva bioquímica ou óbito em decorrência do câncer no período.



**Tabela 1** - Características demográficas pré-operatórias agrupadas de acordo com o status do PTEN na imuno-histoquímica

Características	PTEN -	PTEN +	<i>p</i>
Nº de casos (%)	5 (20)	19 (80)	
Idade			.10
Média (DP)	57(±11)	63 (±6.5)	
Raça (%)			.56
Branco	2 (67)	9 (82)	
Negro	-	1 (9)	
Ignorado	1 (33)	1 (9)	
PSA t em ng/dl			.63
média (DP)	5.2(±.4)	5.7 (2.2)	
Densidade do PSA em ng/ml *			.93
média (DP)	.10 (±.03)	.10 (±.03)	
Nº de biópsias			.41
média (DP)	1.8 (±1)	1.4 (±.69)	
Média fragmentos/biópsia (DP)	15.2 (±5.1)	12.7 (±3.2)	.19
Média de fragmentos positivos/biópsia (DP)	1.2 (.68)	1.3 (.68)	.19
Dias entre a biópsia e a cirurgia			
média (DP)	54 (±22)	106(±171)	.50
>12 fragmentos/biópsia (%)			.35
sim	4 (80)	10 (53)	
não	1 (20)	9 (47)	
Deleção do PTEN detectada por FISH (%)			.01
sem deleção	NA	5 (26)	
com deleção heterozigótica	1 (100)	NA	
com deleção homozigótica	NA	NA	
material inadequado para análise	4	14 (74)	
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	

**Tabela 2** - Características pós-operatórias agrupadas de acordo com o status do PTEN na imuno-histoquímica

Características	PTEN -	PTEN +	<i>p</i>
Upgrade do score de Gleason (%)			.56
sim	1 (20)	2 (10)	
não	4 (80)	17 (90)	
Gleason final (%)			.56
≤6	4 (80)	17 (90)	
7	1 (20)	2 (10)	
% da neoplasia na peça			.47
média (DP)	3.5(±4.2)	3(±3.7)	
IAL (%)			.04
sim	1 (20)	0	
não	4 (80)	19 (100)	
IPN (%)			.61
sim	1 (20)	6 (31)	
não	4 (80)	13 (69)	
Multicentricidade (%)			.61
sim	3 (60)	9 (47)	
não	2 (40)	10 (53)	
EEC (%)			.36
sim	-	2 (10)	
não	5 (100)	17 (90)	
Margem positiva (%)			.82
sim	1 (20)	3 (18)	
não	4 (80)	16 (84)	
Invasão de vesículas seminais (%)			
sim	-	-	
não	5 (100)	19 (100)	
N status (%)			.61
pN0	5 (100)	19 (100)	
pN1	-	-	
PSA nadir ≤0.2 (%)			.47
sim	5 (100)	19(100)	

Cont/ Tabela 2

<b>Características</b>	<b>PTEN -</b>	<b>PTEN +</b>	<b>p</b>
não	-	-	
<b>Recidiva bioquímica</b>			
sim	-	-	
não	5 (100)	19 (100)	
<b>Seguimento - meses</b>			.43
média (DP)	49 ( $\pm$ 30)	60 ( $\pm$ 26)	
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	

## 6 DISCUSSÃO

Nossos achados demonstram que a ausência de expressão do PTEN foi identificada em 20% dos casos em um grupo de pacientes com CP de muito baixo risco, sugerindo ser um evento precoce na história natural da doença. Em contraste com os achados de MCMENAMIN et al. (1999) em sua série de 109 casos, destes, 30 com Gleason <7, não identificaram nenhum caso com perda da expressão de PTEN, levando os autores a inferir que a perda da expressão do PTEN seja um evento tardio no processo de carcinogênese.

Além disso, em nossa série o grupo do PTEN- se associou a pior característica patológica no espécime cirúrgico - invasão angio-linfática. Concordantes com nossos achados, outros trabalhos mostram que a perda da expressão do PTEN e a fusão gênica do TEMPRSS:ERG, dentre outras, tem sido associadas à características patológicas adversas (gleason >6, tumores maiores, estágio patológico avançado, extensão extra prostática e invasão de vesículas seminais), assim como maior risco de progressão tumoral (MCMENAMIN et al. 1999; HALVORSEN et al. 2003; DREHER et al. 2004; KOKSAL et al. 2004; YOSHIMOTO et al. 2007; HAN et al. 2009).

Outros grupos também mostraram que a perda da expressão do PTEN associou-se a menor tempo até a doença metastática, mortalidade câncer específica e tempo até a resistência à castração (LOTAN et al. 2011; MITHAL et al. 2014).

O *upgrade* do score de Gleason ocorreu em 3 casos (17%) e a perda da expressão do PTEN não se associou ao risco aumentado de *upgrade*. Outras séries relatam taxas mais elevadas de *upgrade* (29% a 38%) (GROSSFELD et al. 2001; LATTOUF e SAAD 2002). É possível que a revisão das lâminas por um único patologista (IWC) e o caráter terciário de nosso serviço tenham influenciado nossos resultados.

A maioria das séries que investigaram o *status* de expressão do PTEN foi composta por populações com CP de categorias de risco heterogêneas e com pouca representatividade numérica de pacientes de muito baixo risco. Na maioria das vezes a separação do grupo de muito baixo risco do grupo de baixo risco não é possível devido a informações insuficientes.

Do nosso conhecimento, nosso trabalho é o primeiro a avaliar a perda da expressão da proteína em uma subpopulação específica e que obedece critérios de seleção estritos para muito baixo risco.

Em sua série de 109 casos, sendo destes 30 casos com Gleason <7, MCMENAMIN et al. (1999) não identificaram nenhum caso de perda da expressão do PTEN. Eles encontraram 11% de deleção quando estratificaram os casos pelo estágio T, contudo no grupo com perda da expressão da proteína permitiram a inclusão de pacientes com estágio T1 a T3a, o que nitidamente pode ter influenciado seus resultados.

Em nossa série, dentre os 648 pacientes tratados inicialmente identificados pelo sistema de busca institucional, apenas 24 casos preenchiam completamente os critérios de inclusão definidos por EPSTEIN

et al. (1994) - Gleason  $\leq 6$ ; PSA  $\leq 10$ ng/dl; PSAD  $\leq 0.15$ ;  $\leq 2$  fragmentos com até  $\leq 50\%$  de envolvimento tumoral; estágio clínico T1c. É possível que o software de busca interno utilizado para a triagem dos casos - Recruit - não tenha identificado todos os pacientes que poderiam ser incluídos na amostra inicial. Outro dado importante é o fato de recebermos a maioria dos casos referenciados, com biópsias feitas em outros serviços, levando a uma maior taxa de material insuficiente para a revisão patológica. Fato semelhante ocorre em outros centros oncológicos terciários reconhecidos, como no caso do Johns Hopkins Hospital, onde menos de 25% dos pacientes submetidos a prostatectomia fizeram biópsias naquele serviço, representando uma perda de até 75% das amostras disponíveis para estudo (LOTAN et al. 2014).

Outra limitação de nosso trabalho foi a impossibilidade de pesquisar a deleção do *PTEN* através do FISH na maioria dos casos. O único caso com material adequado para análise mostrou deleção heterozigótica do *PTEN*.

No grupo com *PTEN*-, 80% dos casos foram submetidos a biópsias com  $>12$  fragmentos versus 53% no grupo do *PTEN*+ ( $p=0.35$ ), entretanto como demonstrado por IRANI et al. (2013), o aumento nos números de fragmentos acima de 12 por biópsia não diminui a ocorrência de *upgrading* após a prostatectomia.

Investigando ainda a relação da deleção do *PTEN* com outros biomarcadores, REID et al. (2010) demonstraram que nem a deleção isolada do *PTEN* ou rearranjos dos genes *ERG/ETV1*, nem a associação dos dois, foram preditores de sobrevida. Porém a presença da deleção isolada do

PTEN e ausência de fusões no ERG/ETV1 foi associado a uma menor sobrevida.

A ausência de expressão do PTEN é mais comum em tumores de alto grau e estágio clínico, frequentemente resultante da deleção gênica (LOTAN et al. 2011; ANTONARAKIS et al. 2012; CHAUX et al. 2012).

## 7 CONCLUSÃO

A perda da expressão do PTEN se mostrou presente em até 20% dos casos em um subgrupo de muito baixo risco. Além disso, se associou ao achado de invasão angio-linfática pós prostatectomia.

Em uma coorte com câncer de próstata de muito baixo risco a perda da expressão do PTEN não mostrou impacto prognóstico ou influenciou as taxas de sobrevida em um seguimento de 5 anos.

Houve baixa concordância entre a expressão do PTEN na imunohistoquímica e a os achados pelo FISH.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonarakis ES, Keizman D, Zhang Z, et al. An immunohistochemical signature comprising PTEN, MYC, and Ki67 predicts progression in prostate cancer patients receiving adjuvant docetaxel after prostatectomy. **Cancer** 2012; 118:6063-71.

Bedolla R, Prihoda TJ, Kreisberg JI, et al. Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. **Clin Cancer Res** 2007; 13:3860-7.

Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JFM, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. **Carcinogenesis** 2007; 28:1379-86.

Carter HB, Kettermann A, Warlick C, et al. Expectant management of prostate cancer with curative intent: an update of the Johns Hopkins experience. **J Urol** 2007; 178:2359-64; discussion 2364-5.

Chaux A, Albadine R, Toubaji A, et al. Immunohistochemistry for ERG expression as a surrogate for TMPRSS2-ERG fusion detection in prostatic adenocarcinomas. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:1014-20.

Chaux A, Peskoe SB, Gonzalez-Roibon N, et al. Loss of PTEN expression is associated with increased risk of recurrence after prostatectomy for clinically localized prostate cancer. **Mod Pathol** 2012; 25:1543-9.

Cuzick J, Yang ZH, Fisher G, et al. Prognostic value of PTEN loss in men with conservatively managed localised prostate cancer. **Br J Cancer** 2013; 108:2582-9.

D'Amico A V, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. **JAMA** 1998; 280:969-74.

Dall'Era MA, Albertsen PC, Bangma C, et al. Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of the literature. **Eur Urol** 2012; 62:976-83.

Dreher T, Zentgraf H, Abel U, et al. Reduction of PTEN and p27kip1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer: analysis in radical prostatectomy specimens and needle biopsies. **Virchows Arch** 2004; 444:509-17.

Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL. Update on the Gleason grading system for prostate cancer: results of an international consensus conference of urologic pathologists. **Adv Anat Pathol** 2006; 13:57-9.

Epstein JI, Feng Z, Trock BJ, Pierorazio PM. Upgrading and downgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy: Incidence and predictive factors using the modified gleason grading system and factoring in tertiary grades. **Eur Urol** 2012; 61:1019-24.

Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. **JAMA** 1994; 271:368-74.

Ghosh PM. What controls PTEN and what it controls (in prostate cancer). **Asian J Androl** 2012; 14:130-1.

Grossfeld GD, Chang JJ, Broering JM, et al. Under staging and under grading in a contemporary series of patients undergoing radical prostatectomy: results from the Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor database. **J Urol** 2001; 165:851-6.

Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1474-9.

Han B, Mehra R, Lonigro RJ, et al. Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression. **Mod Pathol** 2009; 22:1083-93.

Irani J, Blanchet P, Salomon L, et al. Is an extended 20-core prostate biopsy protocol more efficient than the standard 12-core? A randomized multicenter trial. **J Urol** 2013; 190:77-83.

Iremashvili V, Manoharan M, Pelaez L, Rosenberg DL, Soloway MS. Clinically significant Gleason sum upgrade: external validation and head-to-head comparison of the existing nomograms. **Cancer** 2012; 118:378-85.

Johansson J-E, Andrén O, Andersson S-O, et al. Natural history of early, localized prostate cancer. **JAMA** 2004; 291:2713-9.

Kattan MW, Eastham J A, Stapleton A M, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:766-71.

King AC, Livermore A, Laurila T A J, Huang W, Jarrard DF. Impact of immediate TRUS rebiopsy in a patient cohort considering active surveillance for favorable risk prostate cancer. **Urol Oncol** 2013; 31:739-43.

Klotz L, Vesprini D, Sethukavalan P, et al. Long-term follow-up of a large active surveillance cohort of patients with prostate. **J Clin Oncol** 2015; 33:272-7.

Koksal IT, Dirice E, Yasar D, et al. The assessment of PTEN tumor suppressor gene in combination with Gleason scoring and serum PSA to evaluate progression of prostate carcinoma. **Urol Oncol** 2004; 22:307-12.

Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. **Am J Pathol** 2012; 181:401-12.

Large MC, Eggener SE. Active surveillance for low-risk localized prostate cancer. **Oncology (Willist Park)** 2009; 23:974-9.

Lattouf JB, Saad F. Gleason score on biopsy: Is it reliable for predicting the final grade on pathology? **BJU Int** 2002; 90:694-8.

Leite KRM, Camara-Lopes LH, Cury J, Dall'oglio MF, Sañudo A, Srougi M. Prostate cancer detection at rebiopsy after an initial benign diagnosis: results using sextant extended prostate biopsy. **Clinics (Sao Paulo)** 2008; 63:339-42.

Lotan TL, Carvalho FL, Peskoe SB, et al. PTEN loss is associated with upgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy. **Mod Pathol** 2014; 28:1-10.

Lotan TL, Gurel B, Sutcliffe S, et al. PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. **Clin Cancer Res** 2011; 17:6563-73.

McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. **Cancer Res** 1999; 59:4291-6.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro; INCA; 2014.

Mithal P, Allott E, Gerber L, et al. PTEN loss in biopsy tissue predicts poor clinical outcomes in prostate cancer. **Int J Urol** 2014; 21:1209-14.

Nesrallah L, Nesrallah A, Antunes AA, Leite KR, Srougi M. The role of extended prostate biopsy on prostate cancer detection rate: A study performed on the bench. **Int Braz J Urol** 2008; 34:563-570.

Oliveira IS, Pontes-Junior J, Abe DK, et al. Undergrading and understaging in patients with clinically insignificant prostate cancer who underwent radical prostatectomy. **Int Braz J Urol** 2010; 36:292-9.

Pearson JD, Carter HB. Natural history of changes in prostate specific antigen in early stage prostate cancer. **J Urol** 1994; 152:1743-8.

Reid A HM, Attard G, Ambrosine L, et al. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. **Br J Cancer** 2010; 102:678-84.

Siddiqui MM, Rais-Bahrami S, Truong H, et al. Magnetic resonance imaging/ultrasound-fusion biopsy significantly upgrades prostate cancer versus systematic 12-core transrectal ultrasound biopsy. **Eur Urol** 2013; 64:713-9.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:5-29.

Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2012; 13:283-96.

Yoshimoto M, Cutz J-C, Nuin PAS, 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 Genet Cytogenet** 2006; 169:128-37.

Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, et al. FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. **Br J Cancer** 2007; 97:678-85.

Yoshimoto M, Joshua AM, Cunha IW, et al. Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. **Mod Pathol** 2008; 21:1451-60.

Yoshimoto M, Ding K, Sweet JM, et al. PTEN losses exhibit heterogeneity in multifocal prostatic adenocarcinoma and are associated with higher Gleason grade. **Mod Pathol** 2013; 26:435-47.

## Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo  
Cancer Center**

**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 12 de fevereiro de 2014.

**Ao  
Dr. Gustavo Cardoso Guimarães.**

**Aluno: Bruno Santos Benigno (Mestrado).**

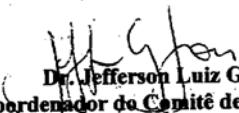
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1865/14  
"Análise da deleção genômica do PTEN detectada por Fish e imunohistoquímica em  
pacientes com câncer de próstata de baixo risco elegíveis à protocolo de vigilância ativa  
submetidos e prostatectomia radical".**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/02/2014, **aprovaram** a realização do protocolo do estudo em referência (Versão 01 de 2013) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Núcleo de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica;
- Orçamento Financeiro Detalhado;

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).**

Atenciosamente,

  
**Dr. Jefferson Luiz Gross**  
**1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1