

Flávia Coltri Eguchi

**AVALIAÇÃO DA SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA ERG E DA FUSÃO
GÊNICA *TMPRSS2:ERG* EM PORTADORES DE CÂNCER PROSTÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dr.^a Silvana Gisele Pegorin de Campos

Coorientador: Dr. Eliney Ferreira Faria

Barretos-SP

2013

Flávia Coltri Eguchi

**AVALIAÇÃO DA SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA ERG E DA FUSÃO
GÊNICA *TMPRSS2:ERG* EM PORTADORES DE CÂNCER PROSTÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dr.^a Silvana Gisele Pegorin de Campos

Coorientador: Dr. Eliney Ferreira Faria

Barretos-SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Tatiana Messias Freitas da Costa
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

E32a	<p>Eguchi, Flávia Coltri. Avaliação da superexpressão da proteína ERG e da fusão gênica <i>TMPRSS2:ERG</i> em portadores de câncer prostático. / Flávia Coltri Eguchi. - Barretos, SP 2013. 76 f. : il.</p> <p>Orientadora: Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos. Co-orientador: Dr. Eliney Ferreira Faria.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2013.</p> <p>1. Adenocarcinoma. 2. Próstata. 3. Prostatectomia. 4. Fusão gênica. 5. Sítios de ligação de anticorpos. 6. Reação em cadeia da polimerase (PCR). I. Autor. II. Campos, Silvana Gisele Pegorin de. III. Faria, Eliney Ferreira. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 616.99263</p>
------	--

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávia Coltri Eguchi

Avaliação da superexpressão da proteína ERG e da fusão gênica *TMPRSS2:ERG* em portadores de câncer prostático

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração: Oncologia.

Data da aprovação: 01/11/2013

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Nestor Facio Junior

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

Prof.^a Dr.^a Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Instituição: Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

Prof.^a Dr.^a Silvana Gisele Pegorin de Campos

Orientadora

Prof. Dr. Carlos Eduardo Paiva

Presidente da Banca Examinadora

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Bolsa de Mestrado – Regular (processo número 2011/14934-0).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através de auxílio financeiro em nome de Silvana Gisele Pegorin de Campos (Universal Faixa A, processo número 473142/2010-4).

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação de resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Dedico este trabalho aos meus pais, Nivio e Cecília, que me deram todo apoio e suporte para que o mesmo pudesse ser desenvolvido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Nivio e Cecilia, por todo o apoio e motivação. Por me ensinarem, desde sempre, princípios éticos na conduta da vida, e que todo ser é igual, devendo ser tratado com o mesmo nível de respeito e educação, não importando a cor, idade, classe social ou intelectual.

Ao meu irmão, Haroldo, que é dono de uma insaciável fome de conhecimento e sempre foi e sempre será minha fonte de inspiração. Às minhas avós, Geralda e Maria, ao meu avô, Durvalino (*in memoriam*), e à tia Teresa, que tiveram participação ativa na minha formação em ser humano.

À tia e madrinha Marta (*in memoriam*), que, apesar de ter lutado muito, não conseguiu estar presente pra ver o final deste trabalho. Obrigada por me ensinar sobre não desistir.

Ao Maicon, que pela amizade e confiança, me indicou como estagiária pra Dr.^a Silvana e, indiretamente, é um dos responsáveis por eu ter entrado no mestrado e ter tomado conhecimento desse mundo de pesquisa em oncologia.

À Dr.^a Silvana, minha orientadora, minha “colega”, que confiou a mim um projeto tão bonito e me incentivou a fazer disso um mestrado, sempre acreditando que eu conseguiria. Pela paciência, pela educação, pelo respeito, pela amizade, pelo bom exemplo: muito obrigada.

Ao Dr. Eliney, que contribuiu com seus conhecimentos clínicos na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Rui, coordenador do CPOM, pelo espaço cedido no laboratório e disponibilidade de uso dos equipamentos.

À FAPESP, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao SAME, em especial ao Tiago e ao Rafael, agradeço pela paciência e eficiência ao separar os prontuários.

Ao NAP, pela ajuda no banco de dados, especialmente ao Cleyton, cuja colaboração foi muito além da consultoria estatística.

Agradeço, também, à Patologia, especialmente ao Dr. Cristovam, que revisou os casos, à Paty e à Bia, por terem separado tantos blocos e tantas lâminas, e ainda serem tão simpáticas comigo, e à Elo e ao Gui, pelas “imunoss”, pelos papos e pelas risadas.

Ao Dr. Adhemar, por ler e avaliar minhas lâminas.

Ao laboratório de Microscopia e Microanálise do IBILCE – UNESP, São José do Rio Preto, coordenado pelo Professor Dr. Sebastião R. Taboga, por disponibilizar a utilização do Sistema de Análise de Imagens.

Ao Matias, por todo o ensinamento e tempo despendidos comigo.

Agradeço aos funcionários do CPOM, Dr.^a Edenir, Dr.^a Márcia, Dr. Daniel, Renato, Abel, Alessandra e Adriana, pelo suporte técnico e intelectual, e aos alunos, pela acolhida, pela paciência e pela convivência.

Aos membros das bancas de acompanhamento e defesa, por terem revisado meu trabalho.

Às amigas Gabi, Mafer e Tata, que estão comigo há tantos anos, sempre com bons conselhos e boas ideias.

Aos amigos de Campo Grande, minhas referências do que é amizade, por me mostrarem que o grande “lance” da vida é fazer bem pras pessoas sem esperar retribuição.

Maicon, Renato, Cleyton, Abel, Carol, Aline, Nat, Vivi, Márcio, Letícia, Taci, Ana e as “uberlandenses” Liginha e Simone: por todas as conversas, desabafos, ensinamentos, risadas, pela sempre boa companhia, amizade e carinho, muito obrigada.

“(...) Há escolas que são gaiolas e há escolas que são asas.

Escolas que são gaiolas existem para que os pássaros desaprendam a arte do voo. Pássaros engaiolados são pássaros sob controle. Engaiolados, o seu dono pode levá-los para onde quiser. Pássaros engaiolados sempre tem um dono. Deixaram de ser pássaros. Porque a essência dos pássaros é o voo. Escolas que são asas não amam pássaros engaiolados. O que elas amam são pássaros em voo. Existem para dar aos pássaros coragem para voar. Ensinar o voo, isso elas não podem fazer, porque o voo já nasce dentro dos pássaros. O voo não pode ser ensinado. Só pode ser encorajado.”

Rubem Alves

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3.	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Fluxograma do trabalho	12
3.2	Ética na pesquisa	13
3.3	Critérios de inclusão	13
3.4	Critérios de exclusão	13
3.5	Casuística e organização dos grupos de pacientes	14
3.6	Metodologias	15
3.6.1	Construção dos TMA	15
3.6.2	Imunohistoquímica	16
3.6.3	Extração de RNA total	17
3.6.4	Avaliação da quantidade e da qualidade do RNA	18
3.6.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	19
3.6.6	Avaliações estatísticas	20
4.	RESULTADOS	21
4.1	Levantamento de dados epidemiológicos	22
4.2	Avaliação morfológica dos blocos de TMA	29
4.3	Imunohistoquímica	31
4.4	PCR em tempo real	38
4.5	Relação entre os achados imunohistoquímicos e moleculares com características clínico-patológicas	40
4.6	Recidiva bioquímica	48

4.7	Associação conjunta entre a imunorreação das proteínas ERG, PTEN e AR e a recidiva bioquímica	57
5.	DISCUSSÃO	59
6.	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	ANEXOS	76
Anexo A -	Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa	77
Anexo B -	Ficha de coleta utilizada para coletar dados de pacientes com câncer de próstata do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, no período de 2006-2007	78
Anexo C -	Eletroferogramas da análise da qualidade de RNA, feita em <i>Bioanalyzer 2100</i> (Agilent Technologies), com os respectivos números de integridade do RNA (RIN)	84
Anexo D -	Documento comprobatório de artigo científico submetido à revista <i>Scientific Reports</i>	85
Anexo E -	E-mail de revisor da revista <i>Scientific Reports</i> com sugestão para revisão e reenvio do artigo científico	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Representação esquemática da fusão entre o éxon 1 do gene *TMPRSS2* e o éxon 4 do gene *ERG*, resultando na fusão gênica *TMPRSS2:ERG*. 4
- Figura 2 -** A perda de PTEN desregula a ativação de AKT e poderia atuar em conjunto com a proteína produzida pela fusão *TMPRSS2:ERG* para promover a progressão de câncer de próstata. 8
- Figura 3 -** Fluxograma do trabalho. 12
- Figura 4 -** Imagens de TMA corados por HE, demonstrando que as amostras teciduais representam adequadamente as características histopatológicas do tipo de lesão. 4A: Gleason 3. 4B: Gleason 4. 30
- Figura 5 -** Amostras de pacientes incluídos no estudo, negativas para câncer, com expressão negativa da proteína ERG. 5A/5B: células endoteliais de vasos sanguíneos positivas para anti-ERG. 32
- Figura 6 -** Amostras positivas para a proteína ERG na imunorreação. 6A: Biópsia de paciente. 6B: Amostra de peça prostática extraída em prostatectomia radical (Gleason 3). 6C: Amostra de peça prostática extraída em prostatectomia radical (Gleason 4). 33
- Figura 7 -** Imunohistoquímica para a proteína PTEN. 7A: Amostra negativa para câncer, com alta imunorreatividade para a proteína PTEN. 7B: Amostra de adenocarcinoma prostático, positiva na imunorreação. 7C: Amostra de adenocarcinoma prostático, negativa na imunorreação.

Figura 8 -	Imunohistoquímica para a proteína AR. 8A: Amostra de paciente incluído no estudo, negativa para câncer, com imunorreação positiva para AR. 8B: Amostra de adenocarcinoma prostático, com imunorreação moderada. 8C: Amostra de adenocarcinoma prostático, com imunorreação forte.	37
Figura 9 -	Distribuição normalizada das amostras com expressão de <i>TMPRSS2:ERG</i> detectada por qRT-PCR.	38
Figura 10 -	Área abaixo da curva (curva ROC) para detecção da presença da fusão gênica <i>TMPRSS2:ERG</i> , de acordo com a expressão proteica de ERG identificada por imunohistoquímica.	40
Figura 11 -	Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica (estimado pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier) para pacientes com câncer de próstata cujos tumores apresentaram marcação positiva ou negativa para proteína ERG.	54
Figura 12 -	Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica (estimado pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier) para pacientes com câncer de próstata cujos tumores apresentaram marcação positiva ou negativa para proteína PTEN.	55
Figura 13 -	Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica (estimado pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier) para pacientes com câncer de próstata cujos tumores apresentaram marcação positiva ou negativa para proteína AR.	56

Figura 14 - Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica (estimado pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier) para pacientes com câncer de próstata cujos tumores apresentaram amplificação na qRT-PCR para o transcrito da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*. 57

Figura 15 - Análise de correspondência entre as expressões das proteínas ERG, PTEN e AR, e a recidiva bioquímica. ERG_P, PTEN_P e AR_P: imunohistoquímica positiva para a expressão dessas proteínas. ERG_N, PTEN_N e AR_N: imunohistoquímica negativa para a expressão dessas proteínas. Recidiva_S: recidiva bioquímica positiva. Recidiva_N: recidiva bioquímica negativa. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição sociodemográfica dos pacientes de câncer de próstata submetidos à prostatectomia radical ou radioterapia (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	23
Tabela 2 -	História clínica e familiar de câncer de próstata dos pacientes submetidos à prostatectomia radical ou radioterapia (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	24
Tabela 3 -	Informações clínicas dos pacientes submetidos à prostatectomia radical ou radioterapia (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	25
Tabela 4 -	Informações cirúrgicas, patológicas e tipos de tratamentos dos pacientes submetidos à prostatectomia radical ou radioterapia (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	27
Tabela 5 -	Grau de Gleason, risco de metástase, recidiva bioquímica e estado dos pacientes no momento do levantamento (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	28
Tabela 6 -	Média e mediana de parâmetros clínicos de pacientes portadores de câncer de próstata incluídos no estudo (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	29
Tabela 7 -	Frequência de imunorreatividade para as proteínas ERG, PTEN e AR (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	34

Tabela 8 -	Valores da expressão da fusão gênica <i>TMPRSS2:ERG</i> , calculados a partir do $2^{-\Delta CT}$.	39
Tabela 9 -	Análise de acurácia entre imunohistoquímica para proteína ERG e qRT-PCR para a presença do transcrito resultante da fusão gênica <i>TMPRSS2:ERG</i> .	39
Tabela 10 -	Coeficiente de concordância kappa entre imunohistoquímica para a proteína ERG e qRT-PCR.	39
Tabela 11 -	Relação da imunorreação para a proteína ERG com parâmetros clínicos de pacientes com câncer prostático (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	41
Tabela 12 -	Razão de chance (<i>Odds Ratio</i>) entre níveis de PSA e expressão da proteína ERG.	42
Tabela 13 -	Relação da imunorreação para a proteína PTEN com parâmetros clínicos de pacientes com câncer prostático (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	43
Tabela 14 -	Relação da imunorreação da proteína AR com parâmetros clínicos de pacientes com câncer prostático (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	45
Tabela 15 -	Razão de chance (<i>Odds Ratio</i>) entre margens cirúrgicas ou cor e expressão da proteína AR.	46
Tabela 16 -	Associação do transcrito da fusão gênica <i>TMPRSS2:ERG</i> com parâmetros clínicos de pacientes com câncer prostático (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	47

Tabela 17 - Razão de chance (<i>Odds Ratio</i>) entre níveis de PSA e a presença da fusão gênica <i>TMPRSS2:ERG</i> .	48
Tabela 18 - Parâmetros clínico-patológicos de pacientes portadores de câncer de próstata relacionados com recidiva bioquímica de PSA (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	49
Tabela 19 - Razão de chance (<i>Odds Ratio</i>) entre risco para metástase e recidiva bioquímica de PSA.	50
Tabela 20 - Análise de sobrevivência livre de recidiva bioquímica dos pacientes de câncer de próstata, com relação à cor, idade e antecedência de câncer ou câncer de próstata familiar (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	51
Tabela 21 - Análise de sobrevivência livre de recidiva bioquímica dos pacientes de câncer de próstata, com relação às características clínicas (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	52
Tabela 22 - Análise de sobrevivência livre de recidiva bioquímica dos pacientes de câncer de próstata, com relação às expressões das proteínas AR, PTEN ou ERG, ou à presença do transcrito da fusão gênica <i>TMPRSS2:ERG</i> (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).	53
Tabela 23 - Risco relativo (<i>Hazard Ratio</i>) entre risco de metástase e sobrevivência livre de recidiva bioquímica.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ACTB	<i>Actin beta</i>
AKT	Proteína quinase B
AR	Receptor de andrógeno
AUC	<i>Area under curve</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
cm ³	Centímetro cúbico
c-MYC	<i>Cellular myelocytomatosis oncogene</i>
D.P.	Desvio padrão
DAB	Diaminobenzidina
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ERG	<i>Ets related gene</i>
ETS	<i>Erythroblastosis virus E26 transforming sequence</i>
ETV1	<i>Ets variant 1</i>
ETV4	<i>Ets variant 4</i>
ETV5	<i>Ets variant 5</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase</i>
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HE	Hematoxilina-eosina
HER	<i>Human epidermal growth fator receptor</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
IHQ	Imunohistoquímica
Mb	Megabase
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro

MSMB	<i>Microseminoprotein beta</i>
n	Número amostral
NAP	Núcleo de Apoio ao Pesquisador
ng	Nanograma
PCA3	<i>Prostate cancer antigen 3</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PHLPP	<i>PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PSA	Antígeno específico prostático
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RIN	Número de integridade do RNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
SLC45A3	<i>Solute carrier family 45 member 3</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane Protease, Serine 2</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
=	Igual
>	Maior
≈	Semelhante
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
®	Registrado
™	<i>Trade mark</i>
α	Alfa

RESUMO

Eguchi FC. *Avaliação da superexpressão da proteína ERG e da fusão gênica TMPRSS2:ERG em portadores de câncer prostático. Dissertação (Mestrado)*. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos, 2013.

Recentemente, fusões recorrentes entre os genes *TMPRSS2* e *ERG* foram descritas em câncer de próstata (CAP), estando presente em 27% a 79% dos casos. A transcrição desta fusão, dependente de AR, resulta na superexpressão da proteína ERG, que pode ser detectada por imunohistoquímica (IHQ), e emerge como um potencial marcador diagnóstico para câncer de próstata. A perda da expressão de PTEN, proteína supressora tumoral, pode ser observada em cerca de 40% dos tumores de próstata. A fusão *TMPRSS2:ERG*, juntamente com a perda de expressão de PTEN, levam a um prognóstico desfavorável. Os principais objetivos deste estudo foram verificar a presença da proteína ERG, da fusão gênica *TMPRSS2:ERG* e a perda de imunorreatividade de PTEN em pacientes com câncer de próstata, que se trataram no Hospital de Câncer de Barretos, associando esses resultados com dados clínicos e patológicos. Foram construídos três *tissue microarrays* (TMA), contendo amostras de 100 pacientes positivas para CAP, e um TMA com 27 amostras negativas para neoplasia prostática. Por meio da técnica de IHQ, avaliou-se a expressão de ERG, PTEN e AR, e a presença do transcrito da fusão *TMPRSS2:ERG* foi confirmada por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os resultados demonstraram que 45,8% dos tumores apresentaram imunorreatividade positiva para a proteína ERG, e a concordância com qRT-PCR foi substancialmente consistente ($k=0,694$, $p<0,001$), com especificidade de 83,3%, sensibilidade de 81% e $AUC=0,821$ ($p<0,001$). Pacientes com nível de antígeno específico prostático (PSA) $<4,0\text{ng/mL}$ apresentaram tendência a ter expressão da proteína ERG ($p=0,051$), e positividade para a presença do transcrito da fusão gênica *TMPRSS2:ERG* ($p=0,015$). Apesar da alta frequência (77,3%), a perda de expressão da proteína PTEN não foi relacionada com nenhum parâmetro clínico. Mais da metade das amostras de CAP (56,7%) tiveram imunorreação positiva para AR. Na análise de sobrevida, feita pelo método de Kaplan-Meier, nenhum biomarcador apresentou influência no tempo de recidiva bioquímica dos pacientes estudados. Por meio da análise multivariada entre as imunorreações das proteínas ERG, PTEN e AR, e a recidiva bioquímica, foi demonstrado que estes são fatores independentes um do outro. A presença da proteína ERG como prognóstico a alguns fatores de risco ainda permanece divergente, no entanto, sua frequência, especificidade e recorrência em CAP fazem com que emergja como uma potencial ferramenta adjuvante no diagnóstico desta neoplasia.

PALAVRAS CHAVE

Adenocarcinoma; Próstata; Prostatectomia; Fusão gênica; Sítios de ligação de anticorpos; Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Eguchi, FC. *Evaluation of the ERG overexpression and TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer patients. Dissertation (Master's degree)*. Barretos: Barretos Cancer Hospital, 2013.

Recently, recurrent gene fusions between the genes *TMPPRSS2* and *ERG* have been described in prostate cancer (PCA), ranging from 27% to 79% in radical prostatectomy and biopsy samples. This fusion transcription, which is AR dependent, results in ERG overexpression, which can be detected by immunohistochemistry (IHC) and emerges as a potential diagnostic marker for prostate cancer. The loss of tumor suppressor *PTEN* can be observed in approximately 40% of PCA. *TMPPRSS2:ERG*, together with loss of *PTEN* expression, leads to an unfavorable prognosis. The aims of this study were to assess the ERG overexpression, verify the presence of gene fusion *TMPPRSS2:ERG* and loss of *PTEN* immunoreactivity in patients with PCA who were treated at the Barretos Cancer Hospital, associating these results with clinical and pathological features. Three tissue microarray (TMA) containing 100 patients samples positive for CAP and one TMA of 27 negative samples for PCA were tested for ERG, AR and *PTEN* expression by IHC, and the presence of *TMPPRSS2:ERG* transcript was confirmed by real time PCR (qRT-PCR). The results showed that 45.8% of the tumors were positive in IHC for ERG expression and the concordance with qRT-PCR was substantially consistent ($k = 0.694$, $p < 0.001$), with an area under the ROC curve of 0.821 ($p < 0.001$). IHC had a specificity of 83.3% and a sensitivity of 81% in detecting any *TMPPRSS2:ERG* fusions. Patients with PSA level $< 4.0 \text{ ng/mL}$ tended to have a positive immunoreactivity for ERG protein ($p = 0.051$), and for the presence of the gene fusion *TMPPRSS2:ERG* transcript ($p = 0.015$). Despite the high frequency (77.3%), loss of *PTEN* expression was not correlated with any clinical parameter. More than half of the CAP samples (56.7%) had positive immunoreactivity for AR. In Kaplan- Meier analysis, no biomarker influenced the time of biochemical relapse of the studied patients. Analysis of the multivariate relationship between immunoreactivity of ERG, *PTEN* and AR proteins and biochemical recurrence showed factors that are independents from one and other. This study demonstrates that both immunohistochemistry and qRT-PCR are useful tools in the assessment of the *TMPPRSS2:ERG* fusion gene status. Correlation of ERG expression with clinical and pathological parameters still quite diverge, but its frequency, specificity and recurrence in prostate cancer emerge as a potential adjunctive diagnostic tool.

KEYWORDS

Adenocarcinoma; Prostate; Prostatectomy; Gene fusion; binding site, Antibody; Polymerase chain reaction.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, existe um grande interesse em compreender melhor a biologia do desenvolvimento e homeostasia prostática devido à sua tendência em desenvolver tumores malignos, sendo a terceira causa de morte por câncer entre homens [1, 2].

No Brasil, estima-se que existam 60.180 novos casos de câncer de próstata para 2012, correspondendo um risco estimado de 62 novos casos a cada 100.000 homens. Trata-se do sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente entre homens, representando cerca de 10% do total de câncer. Apesar dos avanços na detecção precoce e no tratamento do câncer de próstata localizado, a Sociedade Americana de Câncer estimou a morte de 32.050 homens por doença metastática em 2010 [3]. A mortalidade por esta doença é relativamente baixa e a sobrevida média mundial, em cinco anos, é estimada em 58% [4].

Atualmente, a etiologia do câncer de próstata é multifatorial, mas seu risco vem sendo associado ao perfil genético, metabolismo de hormônios esteroides, dieta, inflamação crônica, histórico familiar da doença e exposição a fatores ambientais. Em se tratando de maior longevidade, cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos, sendo considerado um câncer da terceira idade [5, 6].

Os andrógenos são requeridos para as atividades funcionais e o crescimento normal da próstata, mantendo, portanto, a homeostase do órgão. Os efeitos androgênicos em células alvo resultam da interação do hormônio com o receptor de andrógeno (AR), um fator de transcrição nuclear [7, 8]. Quando ativado, o AR regula a transcrição de um grande número de genes [9]. O principal andrógeno é a testosterona, sendo que esse esteroide sexual é produzido pelas células de Leydig dos testículos (95%) e pelas glândulas adrenais (5%) [10]. Na próstata, a testosterona é convertida a 5- α -dihidrotestosterona (DHT), forma androgênica mais ativa, pela ação da enzima 5- α -redutase tipo 2 [10, 11].

No câncer de próstata, os andrógenos desempenham um papel marcante, fazendo com que a via androgênica seja um importante alvo de intervenção terapêutica [12-14]. Inicialmente, os tumores prostáticos expressam o AR e são dependentes de esteroides para seu crescimento, fornecendo a base para a terapia antiandrogênica. Entretanto, eventualmente, algumas destas lesões reincidem de maneira independente de andrógeno, com uma significativa piora prognóstica, não havendo tratamento efetivo contra esse estágio da doença [15].

O atual método de rastreamento para este câncer é através dos níveis sorológicos do antígeno específico prostático (PSA). Entretanto, sua baixa especificidade leva um terço dos pacientes com elevado nível de PSA passarem por procedimentos médicos desnecessários, por não terem uma forma maligna da doença [16]. Portanto, torna-se evidente a necessidade de descoberta de novos marcadores moleculares para ampliar as formas de detecção atuais, distinguindo doença benigna da maligna clinicamente silenciosa [17, 18].

Os genes *ERG* (21q22.2), *ETV1* (7p21.2), *ETV4* (17q21) e *ETV5* (3q27.2) são membros da família de fatores de transcrição *ETS* (*Erythroblastosis virus E26 transforming sequence*). Fatores de transcrição são proteínas que podem se ligar a sequências específicas no DNA, geralmente em regiões promotoras dos genes, regulando a expressão gênica [19]. As proteínas ETS atuam cooperativamente com outros fatores de transcrição na regulação de uma diversidade de funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, angiogênese, hematopoese, transformação oncogênica e apoptose [20].

O gene *TMPRSS2* (serino-protease transmembrânica do tipo 2, 21q22.3) é específico de próstata, muito expresso em células epiteliais luminais prostáticas normais e cancerígenas, e contem elementos de resposta aos andrógenos em seu promotor [21].

Em 2005, as fusões entre a região 5' não traduzida do gene específico prostático *TMPRSS2* com os genes codificadores de fatores ETS, *ERG*, *ETV1*, *ETV4* ou *ETV5*, foram descobertos em câncer de próstata [22, 23]. A exposição androgênica parece atuar na regulação da fusão da serino-protease com membros da família *ETS* [21], contrariando o conceito comum de que fusões gênicas com expressão de proteínas são eventos raros em tumores epiteliais [24]. As proteínas de fusão envolvendo fatores de transcrição ETS são características de tumores de Ewing e ocorrem em menor frequência em algumas leucemias [25]. Baseado nestas observações e na conhecida biologia destes fatores de transcrição e suas proteínas de fusão, tais genes são considerados oncogenes e promotores de progressão neoplásica [24].

A fusão mais comum, *TMPRSS2:ERG*, está presente em cerca de 50% dos cânceres prostáticos rastreados por PSA [22]. Os genes *TMPRSS2* e *ERG* estão localizados próximos entre si no cromossomo 21, a aproximadamente três Mb de distância. Dessa forma, a fusão desses pode ser resultado de translocação balanceada ou não balanceada, ou de deleção do seguimento de DNA entre os dois genes [26, 27]. Os estudos sugerem que a deleção é o evento mutacional mais frequente a favorecer o rearranjo, sendo comum a presença de deleções

intrônicas no cromossomo 21q22.2-3 (Figura 1) [26, 28]. Este evento parece ter uma associação com a zona de origem do câncer, sendo prevalente em tumores oriundos da zona periférica [24, 29].

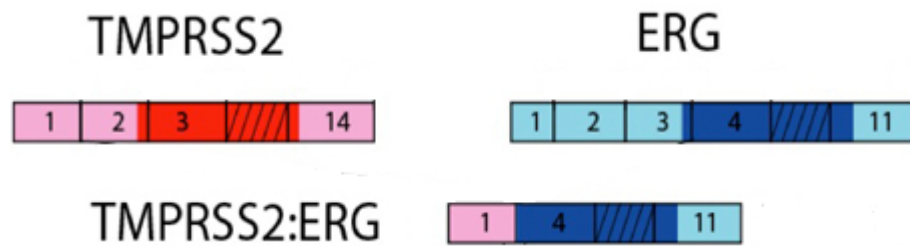


Figura 1 – Representação esquemática da fusão entre o éxon 1 do gene *TMPRSS2* e o éxon 4 do gene *ERG*, resultando na fusão gênica *TMPRSS2:ERG* [22].

Durante o rearranjo cromossomal, há a perda do promotor do alelo *TMPRSS2* e um dos alelos de *ERG* o ganha, resultando em sua superexpressão em células tumorais [30]. A sequência *TMPRSS2* é mínima, ou seja, o parceiro 5' apenas fornece um promotor tecido-específico, resultando na expressão constitutiva do gene 3'. A superexpressão de *ERG* corresponde a uma alteração típica de células tumorais prostáticas [28, 31].

Em relação às características histopatológicas, as lesões positivas para a fusão *TMPRSS2:ERG* apresentam com frequência crescimento cribiforme, macronúcleolos, positividade para mucinas, espalhamento intraductal do tumor e células com aspecto de anel de sinete, ou seja, um padrão morfológico específico [28, 32].

A fusão *TMPRSS2:ERG* leva a produção de uma vasta diversidade de transcritos, equivalendo a 19 variantes, sendo o éxon 1 do *TMPRSS2* fundido ao éxon 4 de *ERG* (T1/E4) o tipo mais frequentemente expresso. Um processo de *splicing* alternativo do gene *TMPRSS2:ERG* foi proposto para justificar os múltiplos tipos de mRNA de fusão observados, embora outros mecanismos de recombinação poderiam também contribuir para as variantes [24]. Foi demonstrado que, embora focos tumorais individuais sejam homogêneos para o estado de fusão, em uma única glândula existe heterogeneidade entre os focos em sua

composição genética [28, 33-35]. Padrões distintos de transcritos híbridos foram encontrados em amostras retiradas de tumores multifocais de uma única próstata [33, 36].

A eficiência traducional da maioria dos mRNA aberrantes e atividades biológicas das proteínas resultantes ainda estão sendo investigadas [28]. A maioria das isoformas proteicas sintetizadas a partir da fusão *TMPRSS2:ERG* está truncada, mas parecem ter função similar às proteínas *wild-type*, mediando a progressão neoplásica diante de uma superexpressão [37, 38].

Os genes alvos da proteína ERG poderiam ser os efetores de programas genéticos iniciados e suportados por altos níveis da proteína. Um conhecido alvo da superexpressão de ERG, específico na próstata, é o gene *SPARC/Osteonectina*, que codifica uma glicoproteína responsável por modular a interação de células com a matriz extracelular [39].

Alguns estudos demonstraram que pacientes que apresentaram a proteína de fusão tiveram um risco significativamente maior de apresentarem estádios clínicos mais avançados, envolvimento de linfonodos pélvicos, recidiva bioquímica de PSA e recorrência de câncer, quando comparados com pacientes negativos para a presença da proteína [26, 39-41]. Também foi verificada uma associação entre fusão e morte específica por câncer prostático ou maior grau de Gleason. Em um recente estudo de *genome-wide*, a presença da fusão foi correlacionada com maiores graus de Gleason e detectada em 59% dos pacientes que tinham histórico familiar de câncer prostático [42, 43]. Spencer e colaboradores, em um estudo com mil pacientes que passaram por prostatectomia radical, observaram uma menor sobrevida em 20 anos para pacientes com câncer de próstata apresentando alta expressão de ERG, detectada por imunohistoquímica [44].

Entretanto, contrariando esses dados, recentemente, a presença da fusão *TMPRSS2:ERG* foi associada com uma idade, nível plasmático de PSA e volume prostático menor no momento do diagnóstico de câncer de próstata, comparado com pacientes não portadores da fusão [45].

Através da utilização de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) e CGH (*comparative genomic hybridization*), detectou-se que 54% de tumores prostáticos resistentes à castração apresentam a fusão e 81% dos tumores positivos contêm células com múltiplas cópias do rearranjo. O aumento no número de cópias dos genes *ERG* ou *TMPRSS2* com ou sem rearranjo, foi associado com alto grau e estágio avançado da doença. Um teste para índice cromossômico revelou que a maioria dos tumores com aumento no número de cópias de *TMPRSS2:ERG*

tiveram aneuploidia/tetraploidia em relação a tumores sem a fusão, predominantemente diplóides [46, 47].

Foi estimado que em 95% dos casos de superexpressão de ERG na próstata a fusão *TMPRSS2:ERG* estava presente [22]. Vários estudos, utilizando anticorpos monoclonais anti-ERG, detectaram a presença da proteína por imunohistoquímica, sendo validadas por técnicas como FISH, *nested*-PCR ou qRT-PCR, encontrando taxas de sensibilidade de 96-100% e de especificidade de 85-99%, demonstrando uma alta concordância entre a detecção da oncoproteína ERG em câncer de próstata e a presença da fusão *TMPRSS2:ERG* [48-52].

A radioterapia, sozinha ou em combinação com cirurgia e quimioterapia, é um importante método de tratamento de câncer, mas reações adversas desenvolvidas no tecido normal coirradiado podem ser prejudiciais ao paciente [53]. Há nítidas diferenças entre os pacientes ao se considerar respostas individuais ao tratamento radioterápico e as evidências apontam como causas a predisposição genética, pequenas mutações ou polimorfismo em genes envolvidos na resposta celular a radiação. Em um estudo, a exposição de células à irradiação-gama facilitou a formação da fusão *TMPRSS2:ERG* [54], entretanto a correlação desta fusão com a resposta de pacientes a radioterapia ainda não foi acompanhada. Testes preditivos capazes de auxiliar a identificação de hipersensibilidade ou resistência individual ao tratamento são de grande importância terapêutica [55].

O gene *PTEN* (*phosphatase and tensin homologue*) é um dos genes supressores tumorais que aparece mutado com maior frequência dentre os cânceres humanos [56], sendo que as deleções ocorrem em cerca de 40% dos tumores de próstata [57-60]. Regula negativamente a via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), e sua inativação ou perda leva à ativação constante de AKT (proteína quinase B), responsável por funções celulares envolvidas em proliferação e sobrevivência celular [61].

Partindo dessas informações, as duas vias de sinalização mais frequentemente ativadas em câncer de próstata são conduzidas por AR e PI3K [59]. Estas vias regulam uma a outra por *feedback* negativo recíproco, ou seja, a inibição de uma ativa a outra. Drogas inibidoras raramente induzem regressão tumoral em modelos pré-clínicos, pois quando somente uma das vias é inibida farmacologicamente, as células podem se adaptar e sobreviver. Com a deleção de *PTEN*, a atividade transcricional de AR é diminuída em tumores humanos e de murinos, enquanto a inibição da via PI3K ativa a sinalização de AR por liberação de HER quinases (*human epidermal growth factor receptor*). Já a inibição de AR ativa a sinalização via

AKT, através da redução nos níveis da PHLPP (*PH domain and leucine rich repeat protein phosphatases*), a qual inativa esta tirosinoquinase [62].

Deleções heterozigotas de *PTEN* em tumores prostáticos estão associadas com recidiva bioquímica precoce, enquanto deleções homozigotas são associadas fortemente com metástases e tumores independentes de andrógeno [60, 63, 64]. Em um estudo recente, a correlação entre a perda de expressão proteica de *PTEN* e a perda genômica foi de cerca de 80% [65].

Rearranjos gênicos envolvendo *ERG* e perda de *PTEN* são eventos frequentemente concomitantes em câncer de próstata (Figura 2). Em um modelo de camundongo transgênico foi demonstrado que a perda de *PTEN* coopera com a expressão aberrante da proteína ERG, acelera o início e progressão de adenocarcinoma prostático [66]. Adicionalmente, a perda de *PTEN* está associada à promoção da proliferação celular e ao desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial, entretanto estas lesões não progridem para doença invasiva [67]. Já quando há associação dos dois eventos, a expressão alterada da proteína ERG age sobre o potencial de migração e invasividade celular, com progressão de neoplasia intra-epitelial para câncer invasivo [66]. As interações entre a perda de *PTEN* e a concomitante ativação de AKT parecem atuar em conjunto com a proteína da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, promovendo progressão de câncer de próstata através de *downstream* da via PI3K, que aumenta as vantagens das células pré-malignas em relação às normais [63, 68].

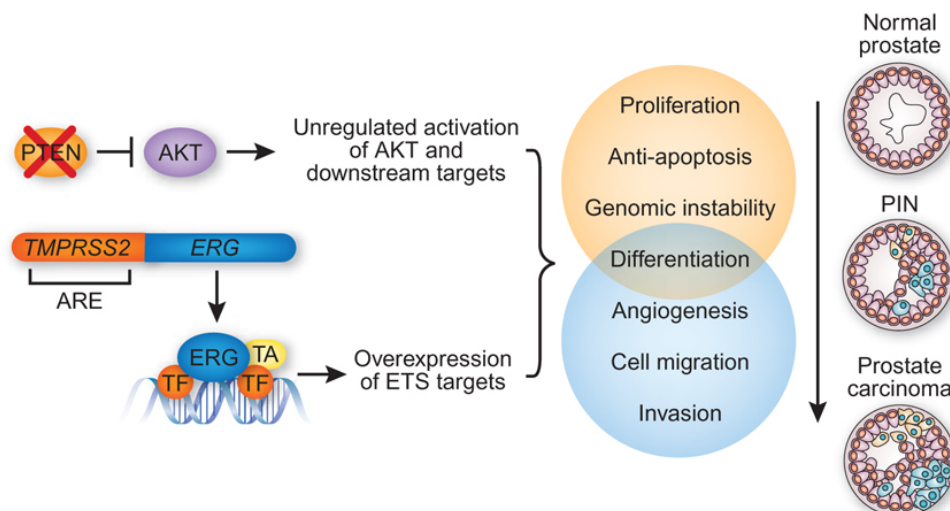


Figura 2 – Figura representativa de como a perda de PTEN pode desregular a ativação de AKT, podendo atuar em conjunto com a proteína produzida pela fusão *TMPRSS2:ERG* para promover a progressão de câncer de próstata [63].

Atualmente, há grande interesse na identificação de fatores prognósticos que permitam selecionar pacientes com câncer prostático com um alto risco particular para a progressão da doença, a fim de se maximizar os benefícios e diminuir os efeitos colaterais do tratamento [39]. Estas novas descobertas sugerem que alterações genéticas nos membros da família de genes *ETS* podem proporcionar uma classificação prognóstica baseada em mecanismos adicionais ou alternativos para o câncer prostático. O possível papel de ERG em aumentar a capacidade de migração e invasividade celular e sua associação com vias de sinalização frequentemente ativadas em câncer de próstata (AR e PI3K) reforçam a importância de investigações neste campo. Adicionalmente, a presença destas alterações poderia ser indicativa de pior prognóstico, sugerindo que a pesquisa terapêutica pré-clínica deveria incluir a avaliação molecular de tais vias. Mais uma vez um teste genético poderia ser capaz de alertar clínicos sobre homens que estão em maior risco de doença agressiva e, portanto, estratégias de tratamento poderiam ser adaptadas a partir de informações individuais [63, 69].

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a presença de superexpressão da proteína ERG e a fusão dos genes *TMPRSS2:ERG* em uma coorte de pacientes portadores de câncer prostático submetidos à radioterapia ou prostatectomia radical e correlacionar esses eventos específicos com a resposta individual ao tratamento.

2.2 Objetivos específicos

1. Estimar o percentual de pacientes que apresentam expressão diferenciada das proteínas ERG e PTEN pela técnica de imunohistoquímica e correlacionar com o estágio tumoral e características histológicas da lesão.
2. Confirmar a presença de transcritos da fusão *TMPRSS2:ERG* pela técnica de qRT-PCR.
3. Comparar os índices de recidivas de doença entre pacientes portadores e não portadores da fusão *TMPRSS2:ERG* e realizar uma análise de sobrevida considerando o tempo do diagnóstico até a recidiva bioquímica.
4. Verificar a relação em conjunto das proteínas ERG, PTEN e AR, e da recidiva bioquímica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fluxograma do trabalho

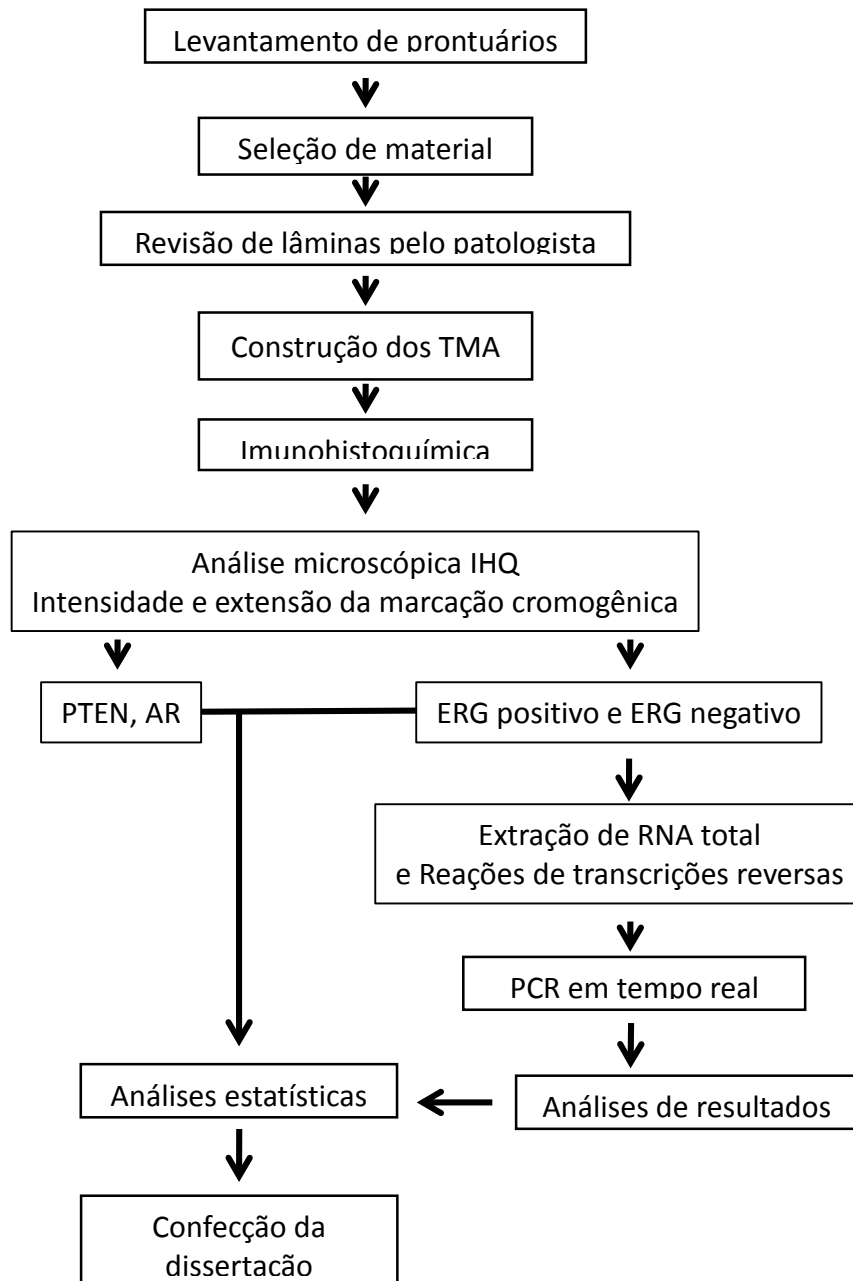


Figura 3 – Fluxograma do trabalho.

3.2 Ética na Pesquisa

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos (HCB), SP, Brasil, e aprovado sob o número 425/2010 (Anexo A). Nesta Fundação, é oferecido a todos os pacientes um termo de consentimento livre e esclarecido logo na primeira consulta, ficando anexo aos prontuários.

Os dados foram obtidos de forma retrospectiva, a partir de prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) e de blocos de parafina (espécimes cirúrgicas e biópsias) obtidos dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do HCB. Esta pesquisa garante o sigilo de todos os pacientes, não divulgando publicamente os dados dos mesmos.

3.3 Critérios de Inclusão

- A. Ter confirmação de neoplasia maligna de próstata.
- B. Paciente com data de prostatectomia ou início de radioterapia entre os anos de 2006 e 2007.
- C. Ter espécimes tumorais conservados em parafina no Departamento de Anatomia Patológica do HCB.

3.4 Critérios de Exclusão

- A. Ter passado por tratamento prévio para câncer de próstata (terapia antiandrogênica ou quimioterapia).
- B. Material insuficiente para extração de RNA.
- C. RNA insuficiente para os ensaios moleculares, constatado após procedimento de extração.

3.5 Casuística e organização dos grupos de pacientes

O levantamento dos pacientes diagnosticados com câncer de próstata nos anos 2006 ou 2007 foi realizado no sistema APATO, que aloja a base de dados da patologia do HCB. Nesse período, o hospital teve 1410 pacientes de câncer prostático. Prontuários de 433 pacientes selecionados desta base foram requisitados ao SAME, sendo recuperado um total de 409.

Foi utilizada uma ficha de coleta de dados formulada com a ajuda do NAP (Anexo B), contendo 99 parâmetros. Todos os prontuários recuperados foram folheados um a um e tiveram seus dados transferidos manualmente para as fichas. Estas foram digitadas pelo NAP, sendo montado um banco de dados no *software* SPSS 21.

Os pacientes foram divididos em:

1. *Grupo Controle*: composto por amostras de tecido provenientes de pacientes que passaram pelo ambulatório do HCB, negativas para neoplasia prostática.

2. *Grupo Radioterapia*: biópsias de portadores de câncer prostático que não passaram por prostatectomia radical e foram submetidos à radioterapia, sem terem passado por tratamento prévio.

3. *Grupo Prostatectomia*: amostras de pacientes que passaram por prostatectomia radical, sem terem passado por tratamento prévio.

Os grupos *Radioterapia* e *Prostatectomia* ainda foram divididos em “cura” ou “recidiva bioquímica”. Para isso, foi utilizado o critério do HCB, onde os níveis de PSA sérico são acompanhados durante e após os tratamentos e, se forem maiores que 1,0ng/mL para o primeiro tratamento, ou maior que 0,2ng/mL no caso do segundo, e considerados recidivas bioquímicas de PSA. Se não houver aumento durante o acompanhamento, os pacientes são considerados curados.

Os pacientes também foram estratificados em grupos de risco para metástase, de acordo com a classificação de D’Amico [70]:

- *baixo risco*: nível de PSA no soro até 10,00ng/mL, grau de Gleason até 6, estadiamento clínico T1a-T2a¹;

¹ T1a → Achado incidental de RTU/Prostatectomia, presente em 5% ou menos do tecido.

T1b → Achado incidental de RTU/Prostatectomia, presente em mais de 5% do tecido.

- *risco intermediário*: nível de PSA no soro de 10,00ng/mL a 20ng/mL, grau de Gleason 7, estadiamento clínico T2b;
- *alto risco*: nível de PSA no soro maior que 20,00ng/mL, grau de Gleason 8-10, estadiamento clínico T3-T4.

3.6 Metodologias

3.6.1 Construção de *Tissue Microarrays* (TMA)

O *tissue microarray* (TMA) é um método de preparação de lâminas, descrito em 1998 por Kononen e colaboradores [71]. As áreas mais representativas dos fragmentos prostáticos emblocados foram selecionadas e marcadas pelo patologista responsável nas respectivas lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE).

Neste trabalho, optou-se pela construção de TMA porque esta técnica permite reunir um grande número de casos em um único bloco de parafina, tornando a análise morfológica e imunohistoquímica maximizadas e os custos das reações diminuídos. Diversos estudos avaliaram a significância estatística dos TMA, aprovando sua utilização para pesquisas em larga escala amostral [72, 73].

Os TMA foram montados utilizando o equipamento *Manual Tissue Arrayer MTA-1* (Beecher Instruments). Este instrumento cria orifícios em um bloco de parafina receptor, o qual recebe, diretamente nestes orifícios, as amostras teciduais retiradas com agulha calibre 1mm, específica do equipamento. O bloco receptor fica, então, com uma coleção de pequenos fragmentos vindos de cada bloco doador.

T1c→ Tumor identificado em biópsia, motivada por elevação do PSA.

T2a→ Tumor envolve um lobo ou menos.

T2b→ Tumor envolve mais de um lobo.

T3→ Tumor palpável extra prostático.

T4→ Tumor fixo ou que invade estruturas adjacentes (exceto vesículas seminais).

Foram construídos quatro TMA, sendo três com 100 amostras tumorais, em duplicatas, e um com 27 amostras de próstata, também em duplicatas, negativas para neoplasia prostática, com a distância e 0,7mm entre os cilindros.

3.6.2 Imunohistoquímica

A partir dos blocos de TMA, foram obtidos cortes de 4µm, montados sobre lâminas silanizadas e submetidos à desparafinização e hidratação por meio de banhos sequenciais de xilol (Merck) e álcool etílico (Merck).

A seguir, foi efetuada a recuperação antigênica em *EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH* (Dako), a 97°C, por 40 minutos. As lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente em *EnVision™ FLEX Wash Buffer* (Dako).

As imunohistoquímicas foram feitas no equipamento *Autostainer Link 48* (Dako). Foi utilizado o anticorpo monoclonal *Monoclonal Rabbit Anti-Human ERG EP111 Flex Ready to Use* (Dako), com incubação à temperatura ambiente por 20 minutos, e anticorpo secundário em *EnVision™ FLEX + Rabbit (LINKER)* (Dako) por 15 minutos.

Também foi utilizado o anticorpo monoclonal *Monoclonal Mouse Anti-Human PTEN Clone 6H2.1* (Dako), na concentração 1:200, incubado à temperatura ambiente por 40 minutos, e anticorpo secundário em *EnVision™ FLEX + Mouse (LINKER)* (Dako) por 15 minutos.

A revelação foi feita por diaminobenzidina (DAB), por 5 minutos e a contracoloração por hematoxilina de Harris.

As imagens dos cortes histológicos foram digitalizadas através do microscópio Eclipse E200 (Nikon), acoplado ao sistema de câmera de vídeo *Digital Sight DS-Fi1* (Nikon) e com sistema analisador de imagens *NIS-Elements F 3.0* (Nikon).

A avaliação imunohistoquímica foi realizada classificando a intensidade e a extensão da marcação cromogênica em um resultado de cruces. Para cada amostra ser considerada positiva, as cruces de intensidade e extensão deveriam somar, pelo menos, +++. Por exemplo, um paciente com + de intensidade e + de extensão, soma ++, e será considerado negativo; já um paciente com + de intensidade e ++ de extensão, soma +++ e será considerado positivo.

3.6.3 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada a partir de lâminas com quatro cortes de amostras de tecido, com 10µm cada, sendo selecionadas apenas as regiões com tumores, previamente marcada pelo patologista responsável.

A área tumoral foi raspada com o auxílio de agulha com calibre 1,2x40mm BD PrecisionGlide™ (BD) e armazenada em microtubo de 1,5mL estéril para extração de RNA em temperatura ambiente.

Foi utilizado o kit *RNeasy FFPE* (Qiagen), onde se retirou a parafina das amostras por meio de imersão em xilol (Merck), centrifugação por dois minutos a 10.000 rpm para formação de *pellet* de células e remoção o sobrenadante. Foram realizadas duas lavagens com álcool etílico (Merck) para a remoção do xilol residual, seguido de centrifugação por dois minutos a 10.000 rpm e remoção do sobrenadante.

O *pellet* de células resultante foi seco na centrífuga à vácuo *Savant ISS110 Speedvac Concentrator* (Thermo Scientific) por 15 minutos na velocidade padrão e temperatura de 45°C. Em seguida, a amostra de tecido foi digerida com 10µL de protease e 150µL de tampão de digestão, fornecidos pelo kit, por 15 minutos a 55°C, seguidos de inativação da protease por mais 15 minutos a 80°C.

Para ajudar na separação dos ácidos nucleicos dos outros componentes celulares, foi adicionado o reagente RBC fornecido pelo kit. O material passou por uma coluna com filtros de sílica *gDNA Eliminator spin column*, que foi centrifugada por 30 segundos a 10.000rpm, com a finalidade de separar o RNA total. A coluna foi descartada e ao fluido foram adicionados 720µL de álcool etílico (Merk). Foram transferidos 700µL dessa amostra, incluindo o precipitado, para a coluna *RNeasy MinElute spin column*, que foi centrifugada por 15 segundos a 10.000rpm, por duas vezes, tendo o fluido descartado, seguidos de duas lavagens com 500µL de reagente RPE (fornecido pelo kit), com o intuito de purificar o RNA.

Para eliminar soluções de lavagem residuais nos filtros das colunas de purificação, foi feita centrifugação em velocidade máxima por cinco minutos, com as tampas das colunas abertas. Na sequência, para eluir o RNA, foram adicionados 20µL de água *RNase-free* e os tubos foram centrifugados por um minuto em velocidade máxima.

3.6.4 Avaliação da quantidade e da qualidade do RNA total

As quantificações das amostras de RNA total foram realizadas no espectrofotômetro *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific), sendo utilizadas apenas as amostras livres de contaminantes (razão 260/230 \approx 1,8) e de proteínas (razão 260/280 \approx 2,0).

A análise da qualidade do RNA total foi realizada por meio de eletroforese microfluida no equipamento *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies), utilizando o *RNA Nano Chip* (Agilent Technologies).

Os eletrodos do equipamento foram limpos com 400 μ L de água no cartucho de lavagem, que foi inserido no aparelho por um minuto. Em seguida, o cartucho foi retirado e a tampa foi aberta para secagem dos eletrodos durante a preparação do chip.

Com os reagentes em temperatura ambiente, o gel foi preparado. Para isso, 650 μ L de *RNA small gel* foram colocados numa coluna fornecida pelo kit e centrifugada por 15 minutos a 10.000rpm. Esse gel foi dividido em alíquotas de 45 μ L cada e armazenado a -30°C até o momento do uso.

Em uma alíquota de gel, foi adicionado 0,2 μ L de *RNA 6000 small dye*, e foi passada no vórtex por 10 segundos e centrifugada por 10 minutos a 13.000rpm. Em seguida, foram adicionados 9 μ L desse gel/dye na região G do chip e, com o auxílio da seringa acoplada ao *priming station* do kit, o gel foi distribuído. Adicionaram-se 9 μ L de *Small RNA conditioning solution* na posição marcada como CS, 1 μ L de marcador na posição *ladder* e 5 μ L de *RNA small marker* em cada posição do chip reservada para as amostras, bem como na posição do marcador. As amostras foram desnaturadas por dois minutos a 70°C, para evitar a formação de estruturas secundárias, e foi adicionado 1 μ L de cada amostra nas posições do chip marcadas de 1 a 11.

O chip foi agitado no vórtex *IKA MS3* (Manca) por um minuto a 2.200rpm e, em seguida, foi colocado no bioanalisador. Foram utilizadas apenas as amostras com número de integridade o RNA (RIN) maior ou igual a 1,4.

3.6.5 Obtenção de cDNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

Para a obtenção de cDNA, foi realizada reação de transcrição reversa, a partir de uma concentração de 100ng/ μ L de RNA total, e utilizado o kit *SuperScript® VILO™ Master Mix* (Invitrogen). Para cada amostra, foram colocados em um tubo de 0,2mL: 4 μ L de *SuperScript® VILO™ MasterMix*, que contem transcriptase reversa *SuperScript® III RT*, inibidor de ribonuclease *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, proprietary helper protein, random primers*, MgCl₂ e dNTPs, juntamente com 1 μ L de RNA total e 15 μ L de água ultra pura *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water* (Invitrogen).

Após um *spin*, os tubos foram incubados no termociclador *Veriti® Thermal Cycler* (Applied Biosystems) a 25°C, por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos, em um único ciclo.

Para a reação de PCR em tempo real, foram selecionadas 45 amostras que foram negativas ou positivas na imunohistoquímica de ERG.

Foram utilizadas sondas inventoriados *TaqMan®* (Applied Biosystems). Foram testados sondas para três genes constitutivos candidatos a controles endógenos: *HPRT1* (Hs99999909_m1), *GAPDH* (Hs99999905_m1) e *ACTB* (Hs99999903_m1), e utilizado sonda para *TMPRSS2:ERG* (Hs03063375_ft), também inventoriado.

Todas as reações foram feitas no equipamento *7900HT System* (Applied Biosystems), utilizando placas de 96 poços *MicroAmp® Fast Optical* (Applied Biosystems). Para cada reação, foram utilizados 0,5 μ L de *TaqMan® Gene Expression Assay* (Applied Biosystems), 5,0 μ L de *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems), 2,0 μ L de cDNA e 2,5 μ L de água ultra pura (*UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water*, Invitrogen), totalizando 10 μ L por reação.

Cada amostra foi feita em triplicata e a ciclagem térmica foi feita em 40 ciclos, seguindo o seguinte protocolo: 2 minutos a 50°C (incubação de UNG), 20 segundos a 95°C (ativação da polimerase), 1 segundo a 95°C (denaturação) e 20 segundos a 60°C (anelamento e extensão).

O cálculo de expressão relativa foi realizado com o método $2^{-\Delta CT}$, utilizando o software Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft).

3.6.6 Avaliações estatísticas

Os dados foram descritos em tabelas de frequência para as variáveis qualitativas e em função da média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo para as variáveis quantitativas.

A fim de validar a Imunohistoquímica, foi realizado a qRT-PCR. Assim, foi feita uma análise de concordância, verificando a reprodutibilidade pelo coeficiente Kappa e a acurácia através da sensibilidade, especificidade e a área sob a curva ROC (considerando a qRT-PCR como padrão ouro).

As associações simples (entre duas características) entre as expressões das proteínas ERG, PTEN e AR e as características clínicas foram verificadas utilizando o teste de Qui-Quadrado, por se tratarem de variáveis qualitativas. Quando os pressupostos deste teste não foram satisfeitos, ou seja, quando 25% ou mais das células na tabela dos valores esperados foram menores que cinco, foi utilizado o teste Exato de Fisher.

Posteriormente, a associação conjunta das características clínicas com a expressão de cada proteína foi realizada através da regressão logística múltipla. No entanto, para tal análise e a fim de verificar o efeito de interações entre as variáveis, foram selecionadas apenas as que obtiveram p-valor menor que 0,2 na análise simples.

Considerando-se a recidiva como desfecho, optaram-se por duas perspectivas: a transversal e a longitudinal. Na análise transversal, procedeu-se da mesma forma que a análise descrita anteriormente. Para a análise longitudinal, foi estimada a curva de sobrevivência livre de recidiva bioquímica pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier, sendo o tempo entre o início de tratamento até a recidiva bioquímica o evento de interesse, e a última informação dos pacientes considerada censura. Para verificar a diferença entre as curvas de sobrevivência, foi utilizado o teste de Log-Rank e, para verificar a associação conjunta das características clínicas com a recidiva, foi realizada regressão de Cox múltipla. Para esta última análise, foram selecionadas apenas as variáveis que obtiveram p-valor menor que 0,2 nos testes de Log-Rank.

Foi verificada, também, a relação conjunta entre a expressão das proteínas ERG, PTEN e AR e a recidiva bioquímica, valendo-se da Análise de Correspondência Multivariada.

Para todo o estudo, foi considerada a significância de 0,05 e as análises foram realizadas pelo *software* SPSS versão 21.

4. RESULTADOS

4.1 Levantamento de dados epidemiológicos

Excluindo-se os pacientes que passaram por algum tratamento prévio antes da prostatectomia radical ou da radioterapia, permaneceram neste estudo 322 homens, cujas amostras parafinadas foram solicitadas ao Departamento de Patologia para serem revistas.

Ao todo, foram revisados 120 casos, sendo 100 casos de prostatectomia radical e 20 casos de radioterapia, configurando o número amostral (n) deste estudo.

Quanto à distribuição sociodemográfica desses pacientes, a maioria residiam nos estados de São Paulo (68,9%), Minas Gerais (11,8%) ou Mato Grosso do Sul (9,2%), e a maior parte era casada ou vive em união estável (87,8%). No momento do registro no hospital, 70,0% dos homens se declararam brancos. Apenas 9,2% dos pacientes possuíam ensino superior incompleto ou completo, 12,6% eram analfabetos e a maioria (55,4%) tinha ensino fundamental incompleto ou completo (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição sociodemográfica dos pacientes de câncer de próstata submetidos à prostatectomia radical ou radioterapia (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		n	%
Estado de origem ¹	DF	1	0,8
	GO	4	3,4
	MG	14	11,8
	MS	11	9,2
	MT	5	4,2
	RN	1	0,8
	RO	1	0,8
	SP	82	68,9
Estado civil	Solteiro	2	1,7
	Casado/União Estável	102	85,0
	Divorciado/Separado	9	7,5
	Viúvo	7	5,8
Cor	Branca	84	70,0
	Não branca	36	30,0
Escolaridade ¹	Analfabeto	15	12,6
	Ensino Fundamental	76	63,8
	Ensino Médio	17	14,3
	Ensino Superior	11	9,2

¹ 1 caso sem informação.

Na anamnese, é questionada a história clínica e familiar de câncer dos pacientes. Nenhum paciente deste estudo teve algum outro tipo de câncer anteriormente ou concomitante com o câncer de próstata diagnosticado. Quase metade desses pacientes (47,0%) declarou ter algum caso de câncer ocorrido em parentes de até 3º grau, sendo que 24,8% afirmou ter algum caso de câncer de próstata na família, considerando-se, também, parentes de até 3º grau (Tabela 2).

Tabela 2 – História clínica e familiar de câncer de próstata dos pacientes submetidos à prostatectomia radical ou radioterapia (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		n	%
História clínica de câncer ¹	Sim	0	0,0
	Não	118	100,0
Histórico de câncer familiar ²	Sim	54	47,0
	Não	61	53,0
Histórico de câncer de próstata familiar ³	Sim	28	24,8
	Não	85	75,2

¹ 2 casos sem informação.

² 5 casos sem informação.

³ 7 casos sem informação.

A maioria dos pacientes (78,3%) teve toque retal suspeito, ou seja, apresentaram algum tipo de alteração física na próstata. Os níveis séricos de PSA foram menores que 4,0ng/mL para 17,1%, entre 4,0ng/mL e 10,0ng/mL para 48,6% e maiores que 10,0ng/mL para 34,3% dos homens incluídos neste estudo. A cintilografia óssea, que detecta possíveis metástases ósseas, foi positiva apenas para 4,5% dos casos. Grande parte dos pacientes foram estadiados em T2 (tumor confinado à próstata, envolvendo um ou os dois lobos) (79,0%), N0 (ausência de metástase em linfonodos regionais) (100,0%) e M0 (ausência de metástase à distância) (99,2%), estando a maioria, então, em estadio clínico II (85,0%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Informações clínicas dos pacientes submetidos à prostatectomia radical ou radioterapia (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		n	%
Toque retal ¹	Normal	25	21,7
	Suspeito	90	78,3
PSA (ng/mL) ²	≤4,0	19	17,1
	>4,0 e ≤10,0	54	48,6
	>10,0	38	34,3
Cintilografia óssea ³	Positiva	5	4,5
	Negativa	105	95,5
Estadiamento cT ⁴ (*)	1	16	13,4
	2	94	79,0
	3	9	7,6
	4	0	0,0
Estadiamento cN ⁴ (*)	0	119	100,0
	1	0	0,0
Estadiamento cM ^(*)	0	119	99,2
	1	1	0,8
Estadiamento clínico (**)	I	7	5,8
	II	102	85,0
	III	10	8,3
	IV	1	0,8

¹ 5 casos sem informação.

² 9 casos sem informação.

³ 10 casos sem informação.

⁴ 1 caso sem informação.

(*) T – Tumor confinado à próstata
N – Metástase linfática regional
M – Metástase à distância

(**) Estadio I: tumor não palpável, durante o exame retal. O tumor está circunscrito à próstata.

Estadio II: tumor mais avançado, mas que ainda não metastizou.

Estadio III: tumor que se espalhou para além da camada exterior da próstata. Pode ser encontrado nas vesículas seminais, mas ainda não atingiu os gânglios linfáticos.

Estadio IV: tumor com uma, ou mais, das seguintes características:

- Tumor que invadiu a bexiga, o reto ou as estruturas circundantes (para além das vesículas seminais).
- Tumor que metastizou para os gânglios linfáticos.
- Tumor que metastizou para outras partes do corpo como, por exemplo, para os ossos.

Dos 100 pacientes submetidos à prostatectomia radical, 38,0% apresentaram margens cirúrgicas positivas, 2,0% tiveram transposição capsular, em 2,0% foi observada invasão de vesículas seminais, em 28,7% foi notada infiltração perineural e nenhum paciente teve invasão angiolinfática. No momento da cirurgia, 13,3% também passaram por linfadenectomia e não foi realizada orquiectomia em qualquer paciente. Segundo os dados coletados, 29,0% precisaram fazer radioterapia após a prostatectomia (Tabela 4).

Considerando-se os pacientes que passaram por prostatectomia radical ou por radioterapia, 12,5% fizeram hormonioterapia após o tratamento e nenhum fez quimioterapia (Tabela 4).

Tabela 4 – Informações cirúrgicas, patológicas e tipos de tratamentos dos pacientes submetidos à prostatectomia radical ou radioterapia (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		n	%
Tratamento principal	Prostatectomia radical	100	83,3
	Radioterapia	20	16,7
Margens cirúrgicas ¹	Positivas	38	38,0
	Negativas	62	62,0
Transposição capsular ¹	Sim	2	2,0
	Não	98	98,0
Invasão de vesículas seminais ¹	Sim	2	2,0
	Não	98	98,0
Infiltração perineural ²	Sim	29	28,7
	Não	72	71,3
Invasão angiolinfática ¹	Sim	0	0,0
	Não	100	100,0
Linfadenectomia	Sim	16	13,3
	Não	104	86,7
Orquiectomia	Sim	0	0,0
	Não	120	100,0
Radioterapia pós-prostatectomia	Sim	29	29,0
	Não	71	71,0
Hormonioterapia pós-tratamento	Sim	15	12,5
	Não	105	87,5
Quimioterapia pós-tratamento	Sim	0	0,0
	Não	120	100,0

¹ 20 casos sem informação.

² 19 casos sem informação.

Segundo classificação patológica, 90,0% dos pacientes apresentaram grau de Gleason intermediário 6 (3+3) ou 7 (3+4). De acordo com a classificação de risco de metástase proposta por D'Amico [70], 30,8% foram considerados baixo risco, 61,7% de risco intermediário e 7,5% de alto risco. Mais de um quarto dos homens (27,6%) tiveram recidiva bioquímica de PSA ao longo do tratamento. Até o momento da coleta de dados para este estudo, 80,3% dos pacientes foram considerados curados, 16,2% ainda estavam em tratamento e 3,4% faleceram por câncer, segundo informação contida nos atestados de óbito anexados nos prontuários (Tabela 5).

Tabela 5 – Grau de Gleason, risco de metástase, recidiva bioquímica e estado dos pacientes no momento do levantamento (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		n	%
Grau de Gleason	5 (2+3)	1	0,8
	6 (3+3)	54	45,0
	7 (3+4)	54	45,0
	7 (4+3)	7	5,8
	8 (4+4)	4	3,3
Risco de metástase	Baixo	37	30,8
	Intermediário	74	61,7
	Alto	9	7,5
Recidiva bioquímica ¹	Sim	32	27,6
	Não	84	72,4
Estado do paciente no momento do levantamento ²	Curado	94	80,3
	Em tratamento	19	16,2
	Óbito por câncer	4	3,4

¹ 4 casos sem informação.

² 3 casos sem informação.

Considerando-se a média, o nível sérico de PSA pré-tratamento dos pacientes foi 10,29ng/mL (D.P. = 13,57). Houve dois exames capazes de mensurar o volume prostático: ultrassonografia transretal ou ressonância magnética. Pelo primeiro método, o volume foi 47,53cm³ (D.P. = 55,64) e, pelo segundo, 39,38cm³ (D.P. = 13,55). Foram coletados 12,31 (D.P. = 4,57) fragmentos prostáticos nas biópsias por agulha, sendo 3,88 (D.P. = 2,69) positivos para

câncer. A média de idade dos pacientes no momento da primeira consulta foi 62,9 anos (D.P. = 6,99) (Tabela 6).

Tabela 6 – Média e mediana de parâmetros clínicos de pacientes portadores de câncer de próstata incluídos no estudo (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
PSA total (ng/mL) ¹	10,29	13,57	1,41	7,33	>100,00
Volume prostático (ultrassonografia transretal) (cm ³) ³	47,53	55,64	16,00	37,00	440,00
Volume prostático (ressonância magnética) (cm ³) ⁴	39,38	13,55	15,00	36,80	77,00
Nº fragmentos de biópsia coletados para o diagnóstico ⁵	12,31	4,57	4,00	12,00	35,00
Nº fragmentos de biópsia positivos para CAP ⁶	3,88	2,69	1,00	3,00	13,00
Idade do paciente no momento do tratamento principal (anos) ⁷	62,90	6,99	47,76	62,94	81,78

¹ 9 casos sem informação.

² 59 casos sem informação.

³ 63 casos sem informação.

⁴ 57 casos sem informação.

⁵ 5 casos sem informação.

⁶ 6 casos sem informação.

⁷ 2 casos sem informação.

4.2 Avaliação morfológica dos blocos de TMA

Cortes de 4µm dos TMA corados por hematoxilina-eosina (HE) indicaram que as regiões prostáticas representantes dos tumores foram adequadamente selecionadas (Figura 4). Amostras de dois pacientes não tiveram partes tumorais representativas e foram excluídas das análises imunohistoquímicas.

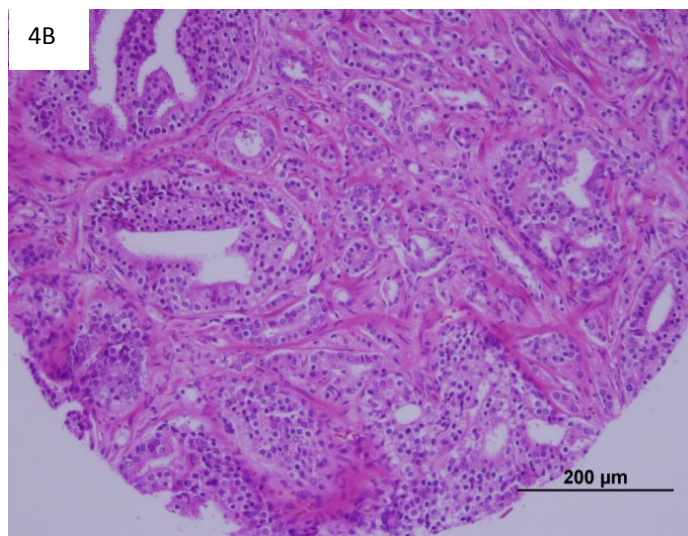
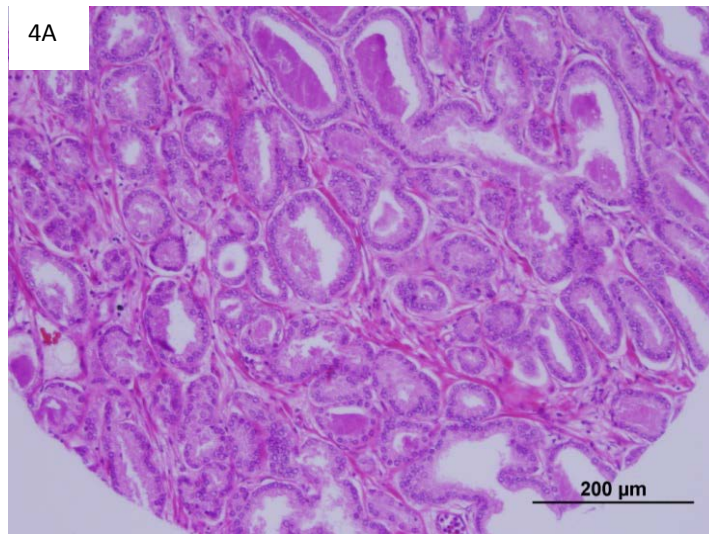


Figura 4 – Imagens de TMA corados por HE, demonstrando que as amostras teciduais representam adequadamente as características histopatológicas do tipo de lesão. 4A: Gleason 3. 4B: Gleason 4.

4.3 Imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica da proteína ERG, foram avaliadas amostras de 118 pacientes, sendo 98 provenientes de prostatectomia radical e 20 de biópsias. Além disso, amostras teciduais pertencentes a 27 pacientes não portadores de câncer de próstata foram incluídas e também testadas neste estudo. Tais amostras serviram para avaliar a especificidade da presença de ERG em células tumorais. O endotélio dos vasos sanguíneos normalmente expressa a proteína ERG e foi utilizado como controle positivo interno para todas as reações.

As amostras negativas para câncer tiveram pouca ou nenhuma marcação, sendo consideradas negativas para a expressão da proteína (Figura 5). A imunorreação positiva caracterizou-se por intensa marcação dos núcleos das células epiteliais (Figura 6). Obtiveram-se 45,8% de amostras positivas e 54,2% de negativas (Tabela 7), sendo a marcação positiva nuclear e bastante específica (Figura 6).

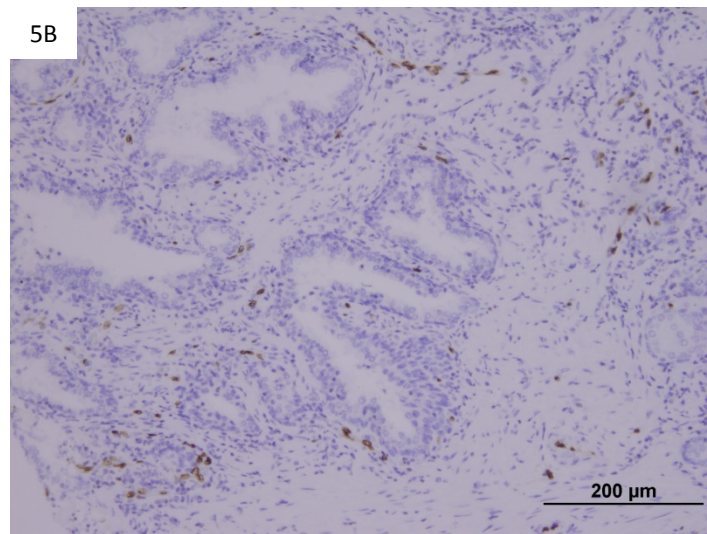
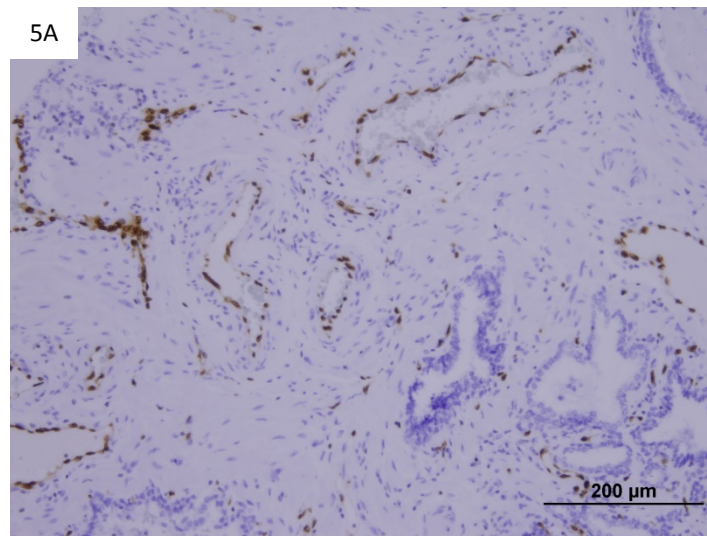


Figura 5 – Resultados obtidos a partir de amostras de pacientes incluídos no estudo, negativas para câncer, com expressão negativa da proteína ERG. 5A/5B: células endoteliais de vasos sanguíneos positivas para anti-ERG.

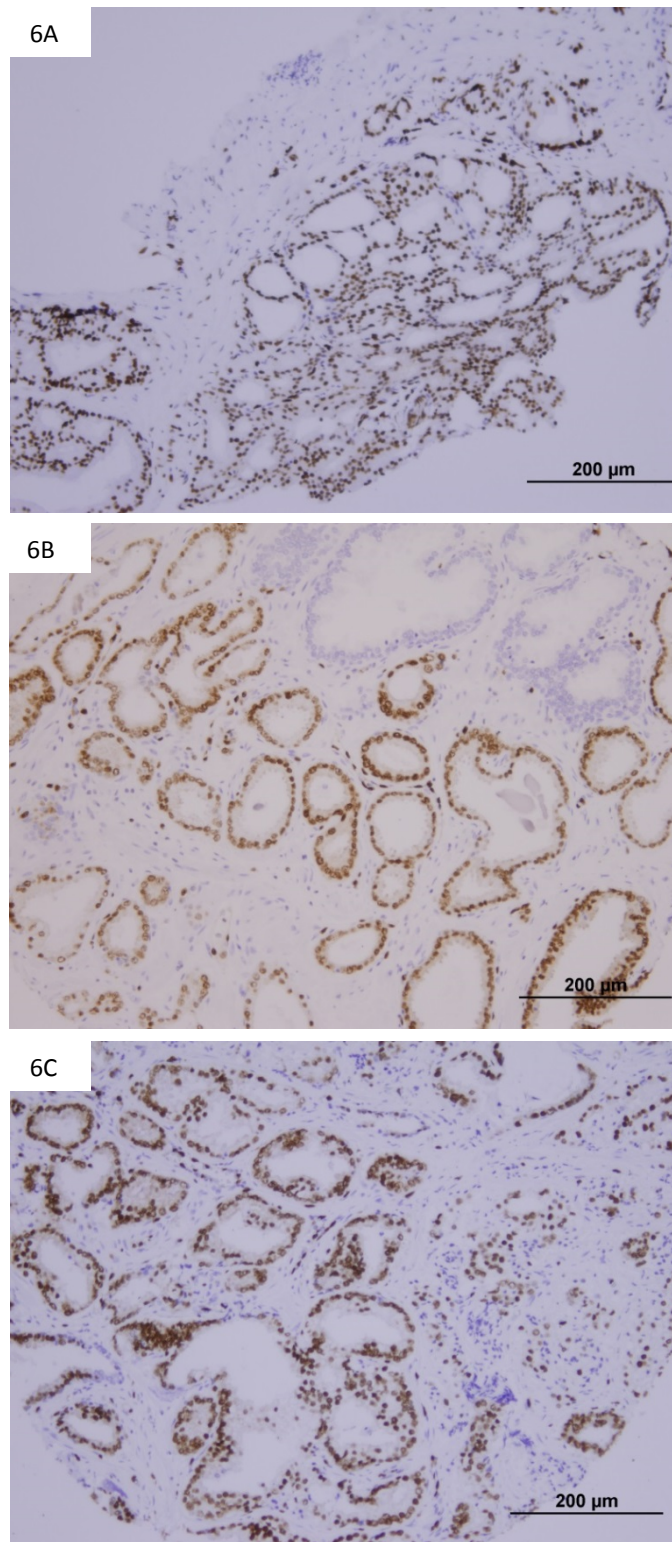


Figura 6 – Resultados obtidos a partir de amostras positivas para a proteína ERG na imunorreacção. 6A: Biópsia de paciente. 6B: Amostra de peça prostática extraída em prostatectomia radical (Gleason 3). 6C: Amostra de peça prostática extraída em prostatectomia radical (Gleason 4).

Tabela 7 – Frequência de imunorreatividade para as proteínas ERG, PTEN e AR (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Biomarcadores	Imunohistoquímica			
	Positiva		Negativa	
	n	%	n	%
ERG	54	45,8	64	54,2
PTEN	22	22,7	75	77,3
AR	55	56,7	42	43,3

Para a imunohistoquímica das proteínas PTEN e AR, foram testadas amostras de 97 pacientes, provenientes de prostatectomia radical, além das amostras de 27 pacientes incluídos no estudo, negativas para câncer. Não foi possível realizar este tipo de técnica nas amostras provenientes de biópsias por agulha porque estas contem pouco material biológico emblocado.

O tecido glandular considerado normal apresentou alta imunorreação para a proteína PTEN. Das amostras com adenocarcinoma prostático, 77,3% tiveram grande diminuição ou perda da imunorreatividade para a proteína PTEN (Tabela 7), sendo consideradas negativas (Figura 7).

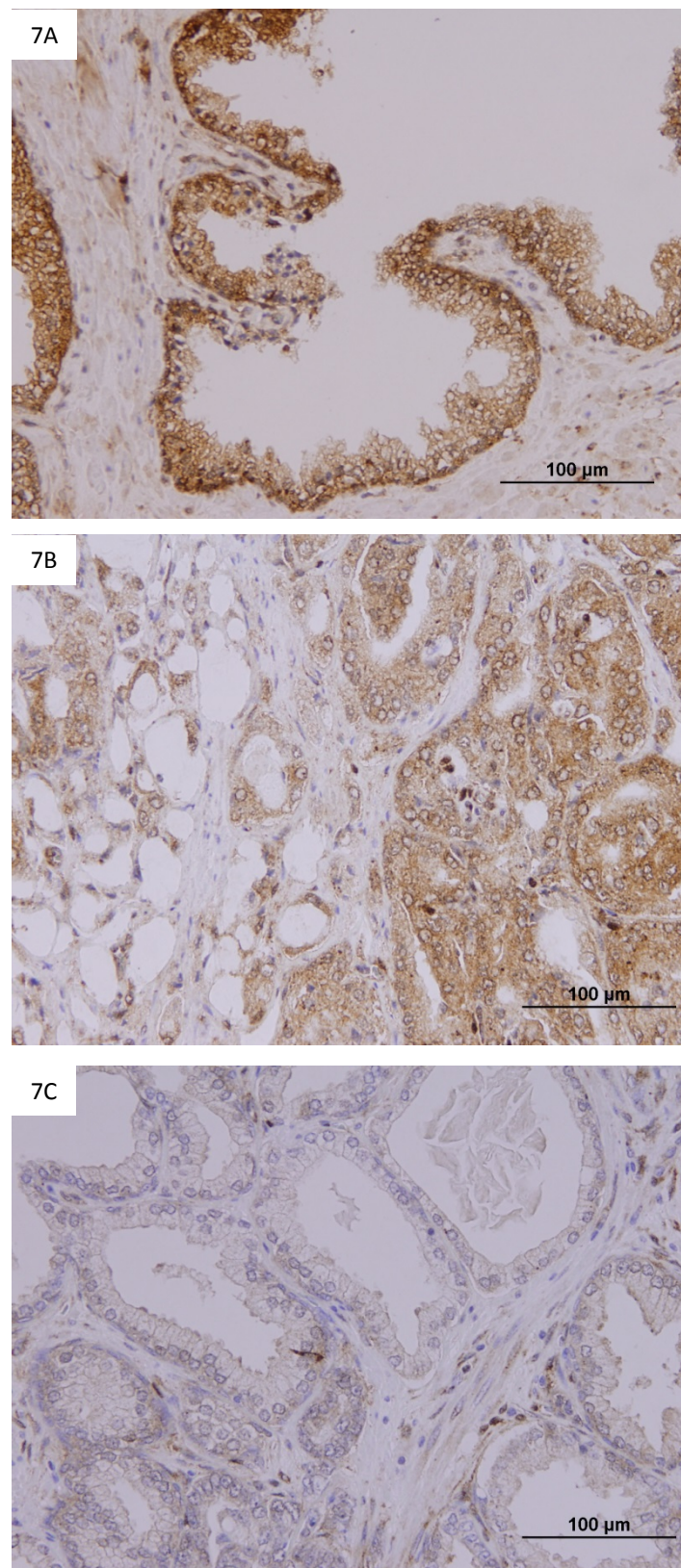


Figura 7 –Análise imunohistoquímica para a proteína PTEN. 7A: Amostra negativa para câncer, com alta imunorreatividade para a proteína PTEN. 7B: Amostra de adenocarcinoma prostático, positiva na imunorreação. 7C: Amostra de adenocarcinoma prostático, negativa na imunorreação.

A presença da proteína AR foi verificada tanto no tecido normal quanto nas lesões, sendo que destas, 56,7% foram consideradas positivas (Tabela 7, Figura 8).

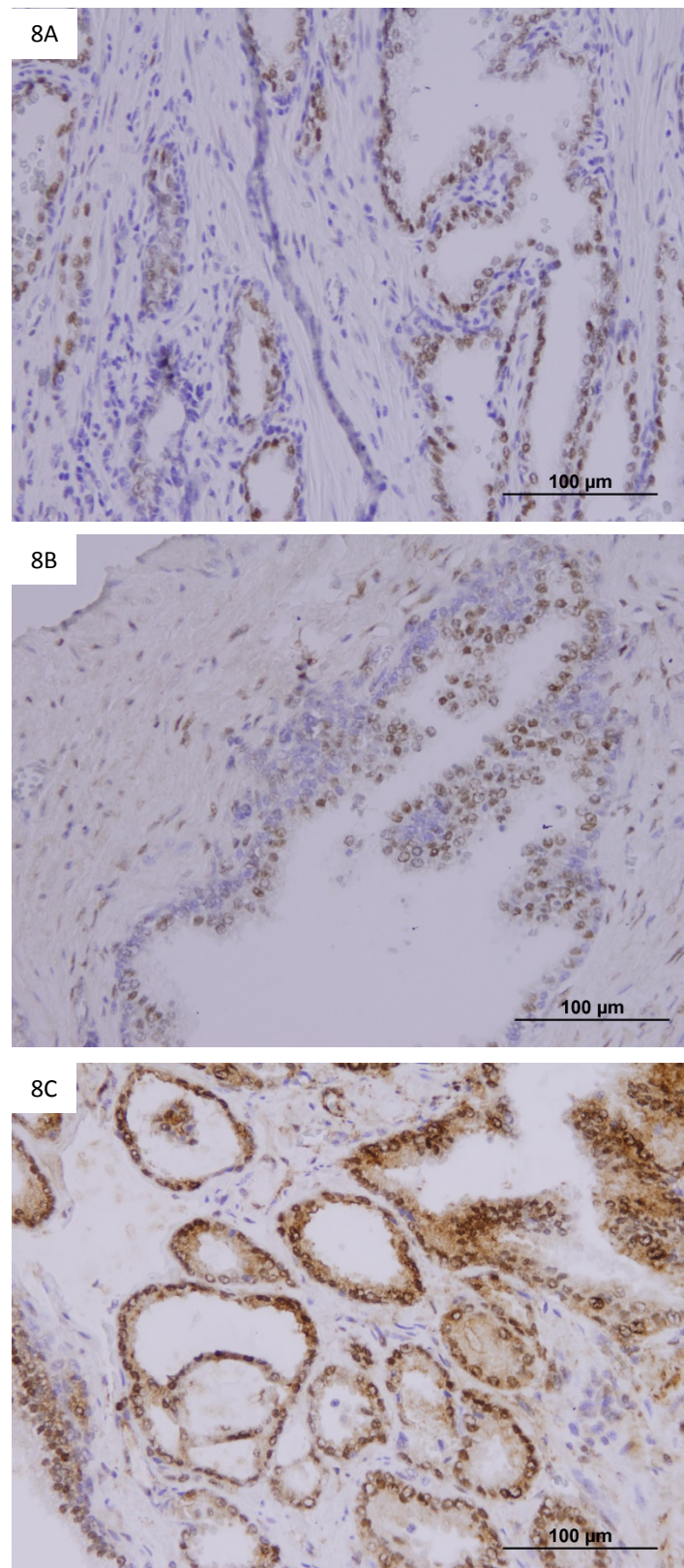


Figura 8 – Análise imunohistoquímica para a proteína AR. 8A: Amostra de paciente incluído no estudo, negativa para câncer, com imunorreação positiva para AR. 8B: Amostra de adenocarcinoma prostático, com imunorreação moderada. 8C: Amostra de adenocarcinoma prostático, com imunorreação forte.

4.4 PCR em tempo real

As amostras testadas no *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) tiveram, em sua maioria, RIN = 2,4 (Anexo B). Esse resultado era esperado já que, devido ao processo de fixação química do material biológico para inclusão em parafina, há certo grau de degradação de importantes classes de macromoléculas, inclusive RNA.

A PCR em tempo real foi a técnica escolhida para a validação da imunohistoquímica para a proteína ERG. Em relação aos controles endógenos testados para normalização da reação, nem o ACTB, nem o GAPDH tiveram amplificação, enquanto o HPRT1 foi amplificado em todas as amostras e, portanto, o escolhido como controle endógeno.

Foram testadas amostras de 45 pacientes, provenientes de prostatectomia radical, positivas ou negativas na imunohistoquímica. Destas, 21 (46,67%) tiveram amplificação, ou seja, tiveram presença do transcrito produzido pela fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, e 24 (53,33%) não tiveram amplificação alguma (Figura 9, Tabela 8).

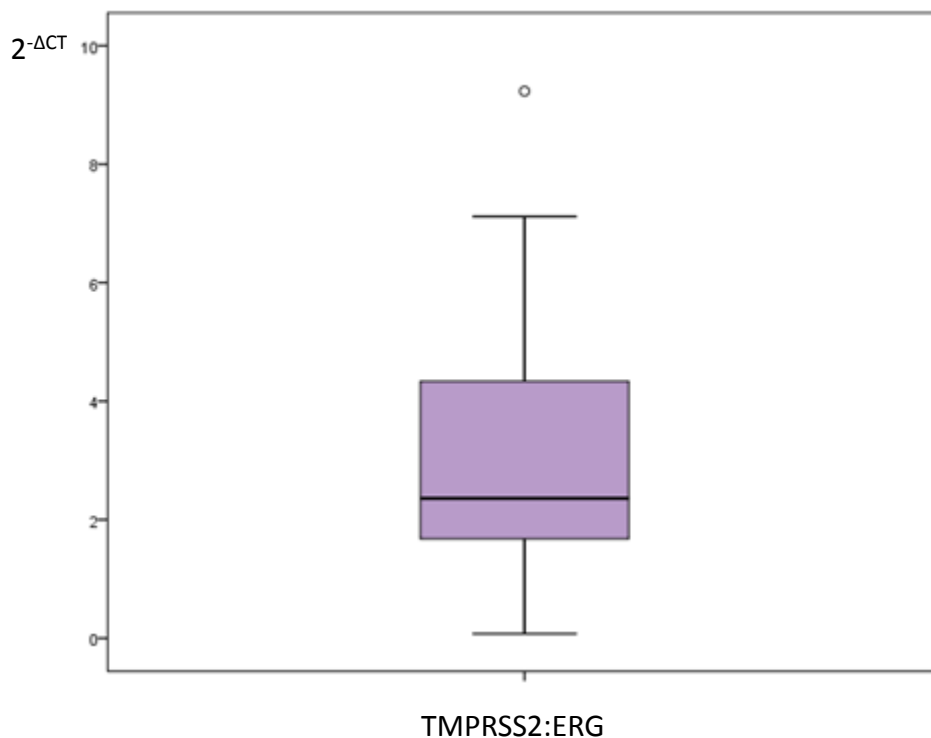


Figura 9 – Expressão relativa da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, detectada por qRT-PCR.

Tabela 8 – Valores da expressão da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, calculados a partir do $2^{-\Delta CT}$.

n	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Máximo
21	0,08	1,55	2,36	4,55	9,23

Na análise de acurácia entre a imunohistoquímica e a qRT-PCR, a primeira apresentou sensibilidade de 81,0% e especificidade de 83,3% (Tabela 9), e a concordância entre os testes foi substancialmente consistente ($k=0,643$, $p<0,001$) (Tabela 10).

Tabela 9 – Análise de acurácia entre imunohistoquímica para proteína ERG e qRT-PCR para a presença do transcrito resultante da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*.

	n	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Casos	45	81,0%	83,3%	81,0%	83,3%

Tabela 10 – Coeficiente de concordância kappa entre imunohistoquímica para a proteína ERG e qRT-PCR.

	n	Kappa	Erro padrão	p-valor
Casos	45	0,643	0,114	< 0,001

A análise de curva ROC mostrou que a expressão de ERG revelada pela imunohistoquímica teve boa acurácia na detecção da fusão *TMPRSS2:ERG*, com uma área abaixo da curva de 0,821 ($p<0,001$), (Figura 10).

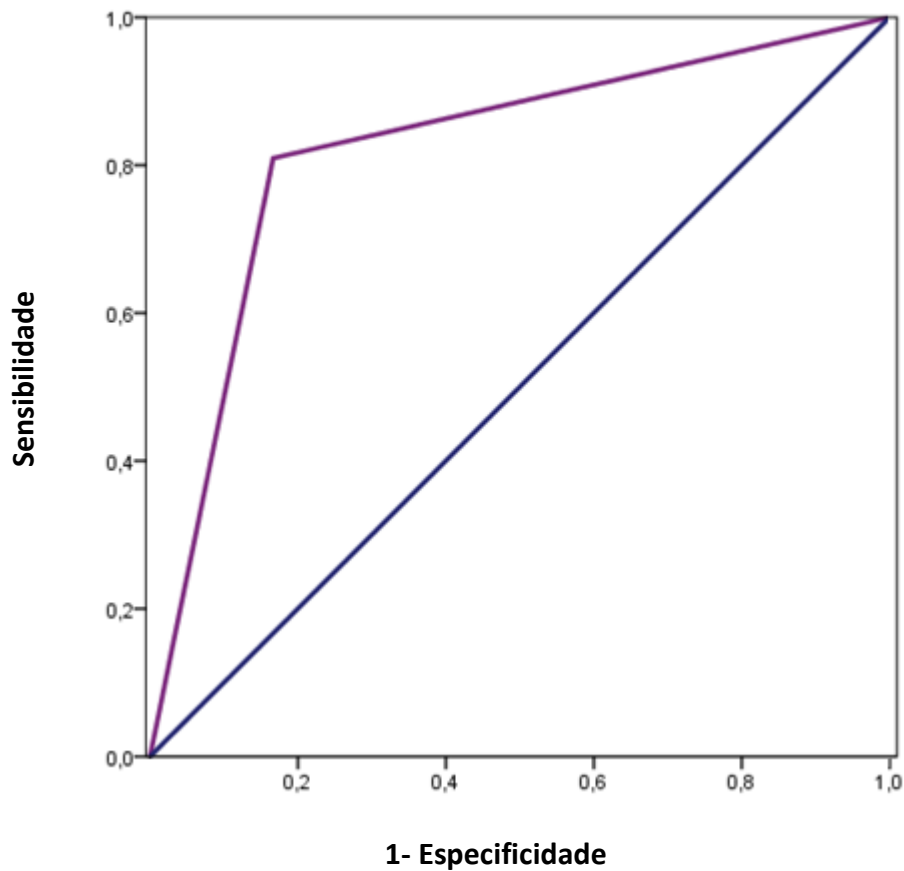


Figura 10 – Área abaixo da curva (curva ROC) para detecção da presença da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, de acordo com a expressão proteica de ERG identificada por imunohistoquímica.

4.5 Relação entre os achados imunohistoquímicos e moleculares com características clínico-patológicas

Correlacionando a presença da proteína ERG com alguns parâmetros clínicos, os pacientes que apresentaram nível sérico de PSA menor que 4,0ng/mL tiveram tendência a ter expressão da proteína positiva, quando comparados com pacientes com PSA maior que 10,0ng/mL ($p = 0,051$). Idade, cor, grau de Gleason, estadiamento clínico, risco de metástase, tratamento principal (prostatectomia radical ou radioterapia), margens cirúrgicas positivas, infiltração perineural ou recidiva bioquímica não tiveram associação estatisticamente significativa com a expressão da proteína ERG (Tabela 11).

Tabela 11 – Relação da imunorreação para a proteína ERG com parâmetros clínicos de pacientes com câncer prostático (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		Imunohistoquímica		p-valor
		Positiva n (%)	Negativa n (%)	
Idade (anos) ¹	≤58	16 (29,6)	13 (21,0)	0,403
	>58 e < 67	25 (46,3)	28 (45,2)	
	≥67	13 (24,1)	21 (33,9)	
Cor	Branca	40 (74,1)	42 (65,6)	0,321
	Não branca	14 (25,9)	22 (34,4)	
PSA (ng/mL) ²	≤4,0	12 (23,5)	7 (11,9)	0,051
	>4,0 e ≤10,0	27 (52,9)	26 (44,1)	
	>10,0	12 (23,5)	26 (44,1)	
Grau de Gleason	<7	39 (72,2)	48 (75,0)	0,733
	≥7	15 (27,8)	16 (25,0)	
Estadiamento clínico	I	1 (1,9)	5 (7,8)	0,177
	II	46 (85,2)	55 (85,9)	
	III/IV	7 (13,0)	4 (6,3)	
Risco de metástase	Baixo	14 (25,9)	21 (32,8)	0,415
	Intermediário/Alto	40 (74,1)	43 (67,2)	
Tratamento principal	Prostatectomia radical	46 (85,2)	52 (81,3)	0,570
	Radioterapia	8 (14,8)	12 (18,8)	
Margens cirúrgicas ³	Positivas	22 (47,8)	15 (28,8)	0,053
	Negativas	24 (52,2)	37 (71,2)	
Infiltração perineural ⁴	Sim	15 (31,9)	13 (25,0)	0,446
	Não	32 (68,1)	39 (75,0)	
Recidiva bioquímica ⁵	Sim	15 (28,8)	17 (27,4)	0,866
	Não	37 (71,2)	45 (72,6)	

¹ 2 casos sem informação.

² 8 casos sem informação.

³ 20 casos sem informação.

⁴ 19 casos sem informação.

⁵ 4 casos sem informação.

Foi feita regressão logística para nível sérico de PSA, estadiamento clínico e margens cirúrgicas, sendo que somente o primeiro foi estatisticamente significativo. Assim, pacientes com PSA abaixo de 4,0ng/mL tiveram 3,7 vezes a chance de ter a proteína ERG presente, quando comparados com pacientes com PSA acima de 10,0ng/mL ($p = 0,026$) (Tabela 12).

Tabela 12 – Razão de chance (*Odds Ratio*) entre níveis de PSA e expressão da proteína ERG.

		<i>Odds Ratio</i>	I.C. 95%		p-valor
			Inferior	Superior	
PSA	≤4,0	3,714	1,169	11,803	0,026
	>4 e ≤10,0	2,250	0,942	5,374	0,068
	>10,0	1	-	-	0,056
Constante		0,462	-	-	0,027

A presença da proteína PTEN não foi associada a qualquer parâmetro clínico, entretanto, parece que os pacientes classificados nos grupos de risco intermediário ou alto de metástase tem tendência a ter perda de expressão desta proteína ($p = 0,054$) (Tabela 13).

Tabela 13 – Relação da imunorreação para a proteína PTEN com parâmetros clínicos de pacientes com câncer prostático (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		Imunohistoquímica		p-valor
		Positiva n (%)	Negativa n (%)	
Idade (anos) ¹	≤58	9 (42,9)	20 (27,0)	0,338
	>58 e < 67	8 (38,1)	40 (54,1)	
	≥67	4 (19,0)	14 (18,9)	
Cor	Branca	18 (81,8)	53 (70,7)	0,299
	Não branca	4 (18,2)	22 (29,3)	
PSA (ng/mL) ²	≤4,0	4 (21,1)	11 (15,7)	0,531
	>4,0 e ≤10,0	11 (57,9)	35 (50,0)	
	>10,0	4 (21,1)	24 (34,3)	
Grau de Gleason	<7	19 (86,4)	60 (80,0)	0,500
	≥7	3 (13,6)	15 (20,0)	
Estadiamento clínico	I	2 (9,1)	5 (6,7)	0,832
	II	19 (86,4)	68 (90,7)	
	III/IV	1 (4,5)	2 (2,7)	
Risco de metástase	Baixo	11 (50,0)	21 (28,0)	0,054
	Intermediário/Alto	11 (50,0)	54 (72,0)	
Margens cirúrgicas	Positivas	8 (36,4)	30 (40,0)	0,759
	Negativas	14 (63,6)	45 (60,0)	
Infiltração perineural	Sim	5 (22,7)	22 (29,3)	0,543
	Não	17 (77,3)	53 (70,7)	
Recidiva bioquímica	Sim	4 (18,2)	25 (33,3)	0,172
	Não	18 (81,8)	50 (67,7)	

¹ 2 casos sem informação.

² 8 casos sem informação.

Foi feita regressão logística para as características “risco de metástase” e “recidiva bioquímica”, não havendo significância estatística para nenhuma destas.

A presença da proteína AR foi estatisticamente significativa quando relacionada à cor do paciente, onde homens que se declararam brancos na anamnese tiveram maior frequência na positividade da imunorreação, quando comparados com homens declarados não brancos ($p = 0,015$). Essa expressão também foi associada às margens cirúrgicas, sendo que os pacientes que apresentaram margem cirúrgica negativa tiveram mais imunorreações negativas para AR ($p = 0,005$).

A relação da proteína AR com idade, nível sérico de PSA, grau de Gleason, estadiamento clínico, risco de metástase, infiltração perineural ou recidiva bioquímica não teve significância estatística (Tabela 14).

Tabela 14 – Relação da imunorreação da proteína AR com parâmetros clínicos de pacientes com câncer prostático (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		Imunohistoquímica		p-valor
		Positiva n (%)	Negativa n (%)	
Idade (anos) ¹	≤58	15 (28,3)	13 (31,0)	0,767
	>58 e < 67	29 (54,7)	20 (47,6)	
	≥67	9 (17,0)	9 (21,4)	
Cor	Branca	45 (81,8)	25 (59,5)	0,015
	Não branca	10 (18,2)	17 (40,5)	
PSA (ng/mL) ²	≤4,0	10 (20,8)	6 (14,6)	0,249
	>4,0 e ≤10,0	26 (54,2)	18 (43,9)	
	>10,0	12 (25,0)	17 (41,5)	
Grau de Gleason	<7	47 (85,5)	32 (76,2)	0,245
	≥7	8 (14,5)	10 (23,8)	
Estadiamento clínico	I	4 (7,3)	3 (7,1)	0,938
	II	49 (89,1)	38 (90,5)	
	III/IV	2 (3,6)	1 (2,4)	
Risco de metástase	Baixo	17 (30,9)	13 (31,0)	0,996
	Intermediário/Alto	38 (69,1)	29 (69,0)	
Margens cirúrgicas	Positivas	27 (49,1)	9 (21,4)	0,005
	Negativas	28 (50,9)	33 (78,6)	
Infiltração perineural	Sim	19 (34,5)	9 (21,4)	0,158
	Não	36 (65,5)	33 (78,6)	
Recidiva bioquímica	Sim	18 (32,7)	10 (23,8)	0,337
	Não	37 (67,3)	32 (76,2)	

¹ 2 casos sem informação.

² 8 casos sem informação.

Para a análise de regressão logística, foram relacionadas as variáveis “cor”, “margens cirúrgicas” e “infiltração perineural”, sendo que os dois primeiros apresentaram significância estatística, com a presença da proteína AR. Assim, pôde ser constatado que homens de cor não branca e pacientes que apresentaram margens cirúrgicas negativas tiveram,

respectivamente, 0,363 e 0,307 vezes a chance de imunorreação positiva para a proteína AR (Tabela 15).

Tabela 15 – Razão de chance (*Odds Ratio*) entre margens cirúrgicas ou cor e expressão da proteína AR.

Categorias		<i>Odds Ratio</i>	I.C. 95%		p-valor
			Inferior	Superior	
Margens cirúrgicas	Positivas	1	-	-	-
	Negativas	0,307	0,122	0,776	0,013
Cor	Branca	1	-	-	-
	Não branca	0,363	0,140	0,943	0,038
Constante		3,789			0,001

Quanto à presença do transcrito da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, houve associação com níveis séricos de PSA menores que 4,0ng/mL e a presença do transcrito ($p = 0,015$). Os outros parâmetros não apresentaram correlação estatisticamente significativa (Tabela 16).

Tabela 16 - Associação do transcrito da fusão gênica *TMPRSS2:ERG* com parâmetros clínicos de pacientes com câncer prostático (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		qRT-PCR		p-valor
		Positiva n (%)	Negativa n (%)	
Idade (anos)	≤58	9 (42,9)	3 (12,5)	0,058
	>58 e < 67	10 (47,6)	15 (62,5)	
	≥67	2 (9,5)	6 (25,0)	
Cor	Branca	14 (66,7)	18 (75,0)	0,538
	Não branca	7 (33,3)	6 (25,0)	
PSA (ng/mL) ¹	≤4,0	8 (40,0)	1 (4,8)	0,015
	>4,0 e ≤10,0	9 (45,0)	11 (52,4)	
	>10,0	3 (15,0)	9 (42,9)	
Grau de Gleason	<7	19 (90,5)	20 (83,3)	0,670
	≥7	2 (9,5)	4 (16,7)	
Estadiamento clínico	I	1 (4,8)	1 (4,2)	0,553
	II	19 (90,5)	23 (95,8)	
	III/IV	1 (4,8)	0 (0,0)	
Risco de metástase	Baixo	6 (28,6)	9 (37,5)	0,526
	Intermediário/Alto	15 (71,4)	15 (62,5)	
Margens cirúrgicas	Positivas	11 (52,4)	7 (29,2)	0,113
	Negativas	10 (47,6)	17 (70,8)	
Infiltração perineural	Sim	8 (38,1)	4 (16,7)	0,105
	Não	13 (61,9)	20 (83,3)	
Recidiva bioquímica	Sim	8 (38,1)	8 (33,3)	0,739
	Não	13 (61,9)	16 (66,7)	

¹ 4 casos sem informação.

Na regressão logística, foram analisadas as categorias idade, níveis séricos de PSA, situação das margens cirúrgicas e infiltração perineural. Pacientes com PSA menor que 4,0ng/mL tiveram 24,0 vezes a chance de apresentarem o transcrito da fusão gênica, quando comparados a pacientes com PSA maior que 10,0ng/mL (Tabela 17).

Tabela 17 – Razão de chance (*Odds Ratio*) entre níveis de PSA e a presença da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*.

		<i>Odds Ratio</i>	I.C. 95%		p-valor
			Inferior	Superior	
PSA	≤4,0	24,000	2,060	279,624	0,011
	>4 e ≤10,0	2,455	0,508	11,868	0,264
	>10,0	1	-	-	-
Constante		0,333			0,099

4.6 Recidiva bioquímica

O acompanhamento dos níveis séricos de PSA dos pacientes é realizado durante e após o tratamento por ser o principal indício de recidiva bioquímica. No HCB, essa é caracterizada quando um paciente apresenta PSA maior que 0,2ng/mL, após a prostatectomia, ou maior que 1,0ng/mL, após radioterapia.

Ao se relacionar os parâmetros clínico-patológicos, apresentados na Tabela 18, com recidiva bioquímica de PSA, os pacientes classificados como risco intermediário ou alto risco para metástase apresentaram maior frequência de recidiva bioquímica em relação aos pacientes qualificados como baixo risco ($p = 0,002$). Os outros parâmetros não tiveram significância estatística.

Tabela 18 – Parâmetros clínico-patológicos de pacientes portadores de câncer de próstata relacionados com recidiva bioquímica de PSA (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		Recidiva Bioquímica		p-valor
		Sim n (%)	Não n (%)	
Idade (anos) ¹	≤58	10 (31,3)	19 (23,2)	0,402
	>58 e < 67	16 (50,0)	38 (46,3)	
	≥67	6 (18,8)	25 (30,5)	
Cor	Branca	25 (78,1)	57 (67,9)	0,278
	Não branca	7 (21,9)	27 (32,1)	
PSA (ng/mL) ²	≤4,0	3 (9,7)	16 (21,1)	0,180
	>4,0 e ≤10,0	14 (45,2)	38 (50,0)	
	>10,0	14 (45,2)	22 (28,9)	
Toque retal ³	Normal	6 (20,0)	19 (23,2)	0,721
	Suspeito	24 (80,0)	63 (76,8)	
Antecedente de câncer familiar ⁴	Sim	18 (60,0)	35 (42,2)	0,093
	Não	12 (40,0)	48 (57,8)	
Antecedente de câncer de próstata familiar ⁵	Sim	10 (34,5)	18 (22,0)	0,182
	Não	19 (65,5)	64 (78,0)	
Grau de Gleason	<7	23 (71,9)	64 (76,2)	0,631
	≥7	9 (28,1)	20 (23,8)	
Estadiamento clínico	I	2 (6,3)	5 (6,0)	0,613
	II	29 (90,6)	72 (85,7)	
	III/IV	1 (3,1)	7 (8,3)	
Risco de metástase	Baixo	3 (9,4)	33 (39,3)	0,002
	Intermediário/Alto	29 (90,6)	51 (60,7)	
Tratamento principal	Prostatectomia radical	29 (90,6)	71 (84,5)	0,394
	Radioterapia	3 (9,4)	13 (15,5)	
Margens cirúrgicas ⁶	Positivas	14 (48,3)	24 (33,8)	0,176
	Negativas	15 (51,7)	47 (66,2)	

Tabela 18 (continuação) – Parâmetros clínico-patológicos de pacientes portadores de câncer de próstata relacionados com recidiva bioquímica de PSA (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		Recidiva Bioquímica		p-valor
		Sim n (%)	Não n (%)	
Infiltração Perineural ⁷	Sim	10 (34,5)	19 (26,4)	0,416
	Não	19 (65,5)	53 (73,6)	

¹ 2 casos sem informação.

² 9 casos sem informação.

³ 4 casos sem informação.

⁴ 3 casos sem informação.

⁵ 5 casos sem informação.

⁶ 16 casos sem informação.

⁷ 15 casos sem informação.

Foi feita regressão logística para níveis séricos de PSA, antecedência de câncer familiar, antecedência de câncer de próstata familiar, risco de metástase e situação de margens cirúrgicas. Pacientes classificados no grupo de baixo risco para metástase tiveram 0,160 vezes a chance de apresentar recidiva bioquímica, quando comparados com pacientes de risco intermediário ou alto (Tabela 19). Os outros parâmetros não foram estatisticamente significativos.

Tabela 19 – Razão de chance (*Odds Ratio*) entre risco para metástase e recidiva bioquímica de PSA.

		<i>Odds Ratio</i>	I.C. 95%		p-valor
			Inferior	Superior	
Risco de metástase	Baixo Intermediário/Alto	0,160 1	0,045 -	0,567 -	0,005 -
Constante		0,596			0,015

Para estimar a sobrevivência livre de recidiva bioquímica em relação a alguns parâmetros clínicos e moleculares, utilizou-se o método Kaplan-Meier e o teste Log-Rank para a análise comparativa das curvas de sobrevivência.

A cor ou a idade dos pacientes, ou se estes tiveram histórico de câncer ou de câncer de próstata familiar, não interferiu no tempo de recidiva bioquímica de câncer de próstata (Tabela 20).

Tabela 20 – Análise de sobrevivência livre de recidiva bioquímica dos pacientes de câncer de próstata, com relação à cor, idade e antecedência de câncer ou câncer de próstata familiar (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		n	Recidiva bioquímica	Probabilidade de sobrevida em anos (%)			p-valor
				1	3	5	
Cor	Branca	81	25	93,8	82,6	53,2	0,262
	Não branca	33	7	97,0	87,8	53,5	
Idade	≤58	29	10	89,7	79,3	64,1	0,601
	>58 e <67	54	16	96,3	87,0	41,4	
	≥67	31	6	96,8	83,5	78,6	
Histórico de câncer familiar	Sim	53	18	90,6	81,1	32,0	0,145
	Não	58	12	98,3	87,8	76,3	
Histórico de câncer de próstata familiar	Sim	28	10	89,3	78,4	29,4	0,209
	Não	81	19	96,3	87,6	64,6	

Os níveis séricos de PSA, toque retal suspeito, grau de Gleason, estadiamento clínico, tratamento a que os pacientes foram submetidos, situação de margens cirúrgicas e infiltração perineural não foram estatisticamente significativos em relação a sobrevivência livre de recidiva bioquímica. Somente risco de metástase teve significância ($p = 0,002$), onde pacientes classificados como risco intermediário ou alto risco tiveram sobrevivência livre de recidiva bioquímica menor que pacientes classificados como baixo risco (Tabela 21).

Tabela 21 – Análise de sobrevivência livre de recidiva bioquímica dos pacientes de câncer de próstata, com relação às características clínicas (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias	n	Recidiva bioquímica	Probabilidade de sobrevivência em anos (%)			p-valor	
			1	3	5		
PSA (ng/mL)	4,0	19	3	100,0	89,5	-	0,205
	>4,0 e ≤10,0	50	14	94,0	85,8	68,8	
	>10,0	36	14	91,7	77,8	19,0	
Toque retal	Normal	25	6	100,0	87,7	52,2	0,787
	Suspeito	85	24	94,1	84,7	56,1	
Grau de Gleason	<7	85	23	95,3	83,4	67,6	0,553
	≥7	29	9	93,1	86,2	-	
Estadiamento clínico	I	6	2	83,3	83,3	-	0,843
	II	100	29	95,0	83,9	51,3	
	III/IV	8	1	100,0	-	-	
Risco de metástase	Baixo	35	3	100,0	94,2	89,7	0,002
	Intermediário/Alto	79	32	92,4	79,7	34,9	
Tratamento	Prostatectomia	98	29	93,9	83,6	51,2	0,725
	Radioterapia	16	3	100,0	87,1	74,6	
Margens cirúrgicas	Positivas	37	14	91,9	81,1	31,3	0,070
	Negativas	61	15	95,1	85,2	55,4	
Infiltração perineural	Sim	28	10	89,3	75,0	-	0,242
	Não	71	19	95,8	87,3	53,3	

A sobrevivência livre de recidiva bioquímica é igual para pacientes com expressão positiva ou negativa para as proteínas ERG, PTEN e AR, bem como para a presença do transcrito da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, detectada por qRT-PCR (Tabela 22, Figuras 11, 12, 13 e 14).

Tabela 22 – Análise de sobrevivência livre de recidiva bioquímica dos pacientes de câncer de próstata, com relação às expressões das proteínas AR, PTEN ou ERG, ou à presença do transcrito da fusão gênica *TMPRSS2:ERG* (Hospital de Câncer de Barretos, 2006-2007).

Categorias		n	Recidiva bioquímica	Probabilidade de sobrevida em anos (%)			p-valor
				1	3	5	
Imunohistoquímica AR	Positiva	53	18	92,5	81,1	58,2	0,192
	Negativa	42	10	92,9	88,1	48,1	
Imunohistoquímica PTEN	Positiva	21	4	95,2	85,7	80,0	0,361
	Negativa	74	25	93,2	82,4	46,5	
Imunohistoquímica ERG	Positiva	52	15	96,2	84,3	47,0	0,837
	Negativa	60	17	93,3	83,3	54,3	
TMPRSS2:ERG (qRT-PCR)	Positiva	21	8	95,2	71,4	-	0,398
	Negativa	24	8	95,8	87,5	40,8	

As características “histórico de câncer familiar”, “risco de metástase”, “margens cirúrgicas” e “imunohistoquímica de AR” foram incluídas na regressão de Cox, sendo que os pacientes classificados como baixo risco para metástase apresentaram um risco relativo de 0,186 vezes a chance de recidiva bioquímica, quando comparados com pacientes classificados em risco intermediário ou alto ($p = 0,006$). Os outros parâmetros não foram estatisticamente significativos (Tabela 23).

Tabela 23 – Risco relativo (*Hazard Ratio*) entre risco de metástase e sobrevivência livre de recidiva bioquímica.

		<i>Hazard Ratio</i>	I.C. 95%		p-valor
			Inferior	Superior	
Risco de metástase	Baixo	0,186	0,057	0,612	0,006
	Intermediário / Alto	1	-	-	

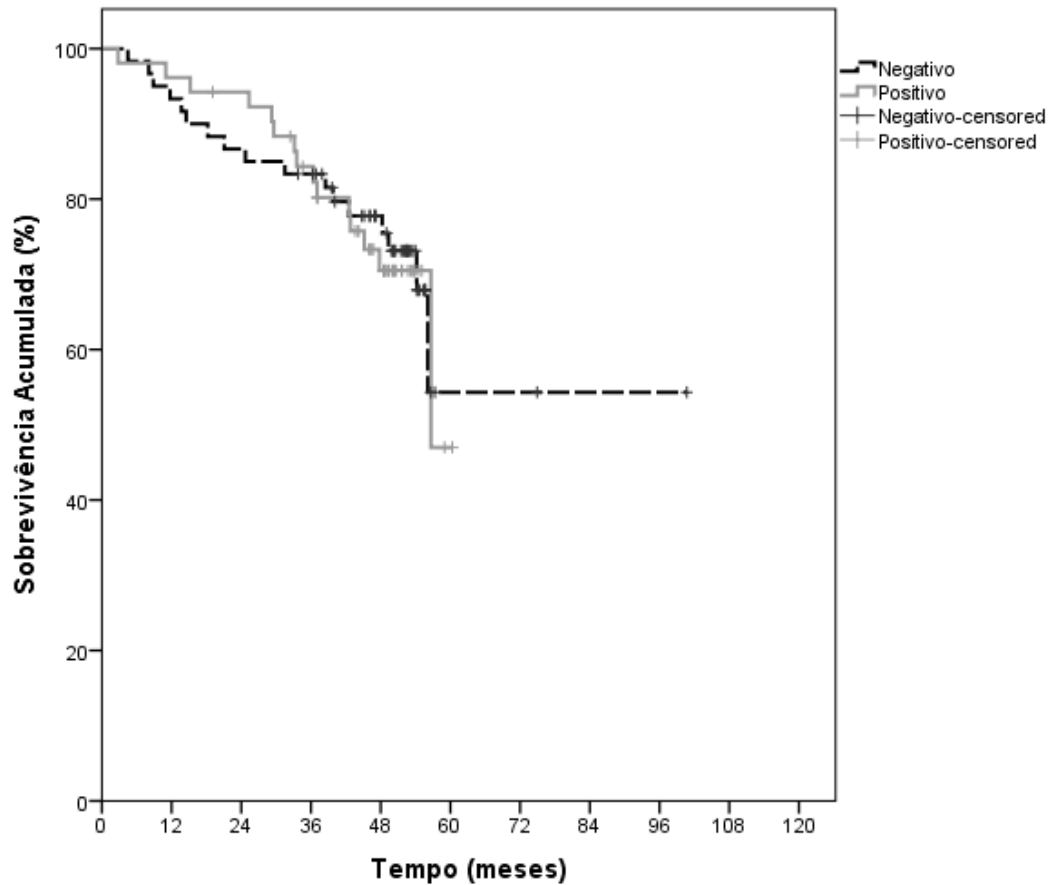


Figura 11 – Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica (estimado pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier) para pacientes com câncer de próstata cujos tumores apresentaram marcação positiva ou negativa para proteína ERG.

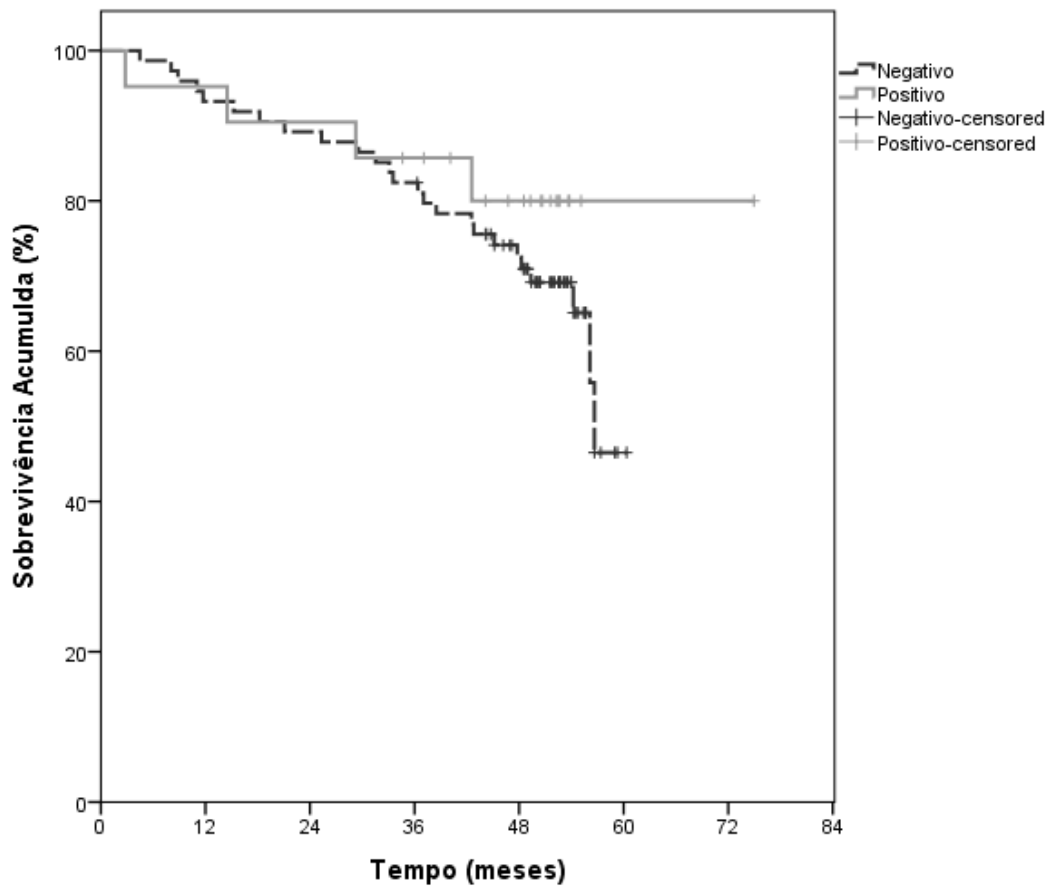


Figura 12 – Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica (estimado pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier) para pacientes com câncer de próstata cujos tumores apresentaram marcação positiva ou negativa para proteína PTEN.

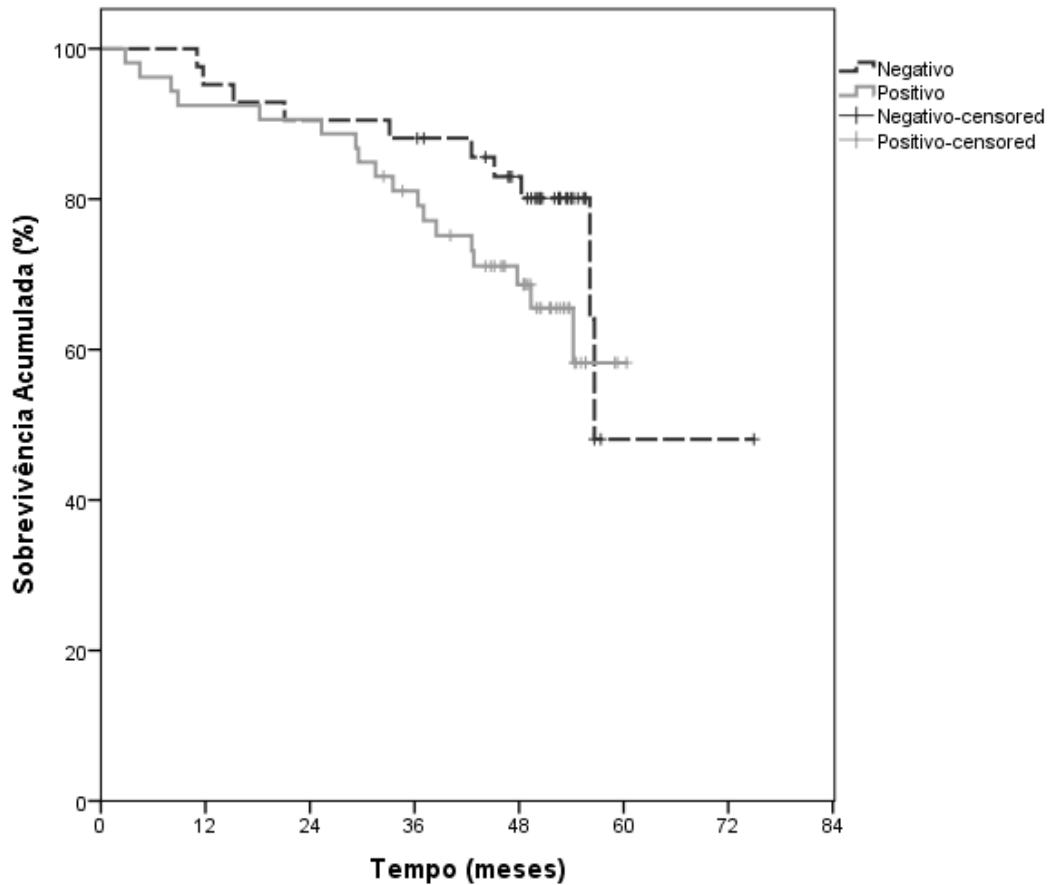


Figura 13 – Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica (estimado pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier) para pacientes com câncer de próstata cujos tumores apresentaram marcação positiva ou negativa para proteína AR.

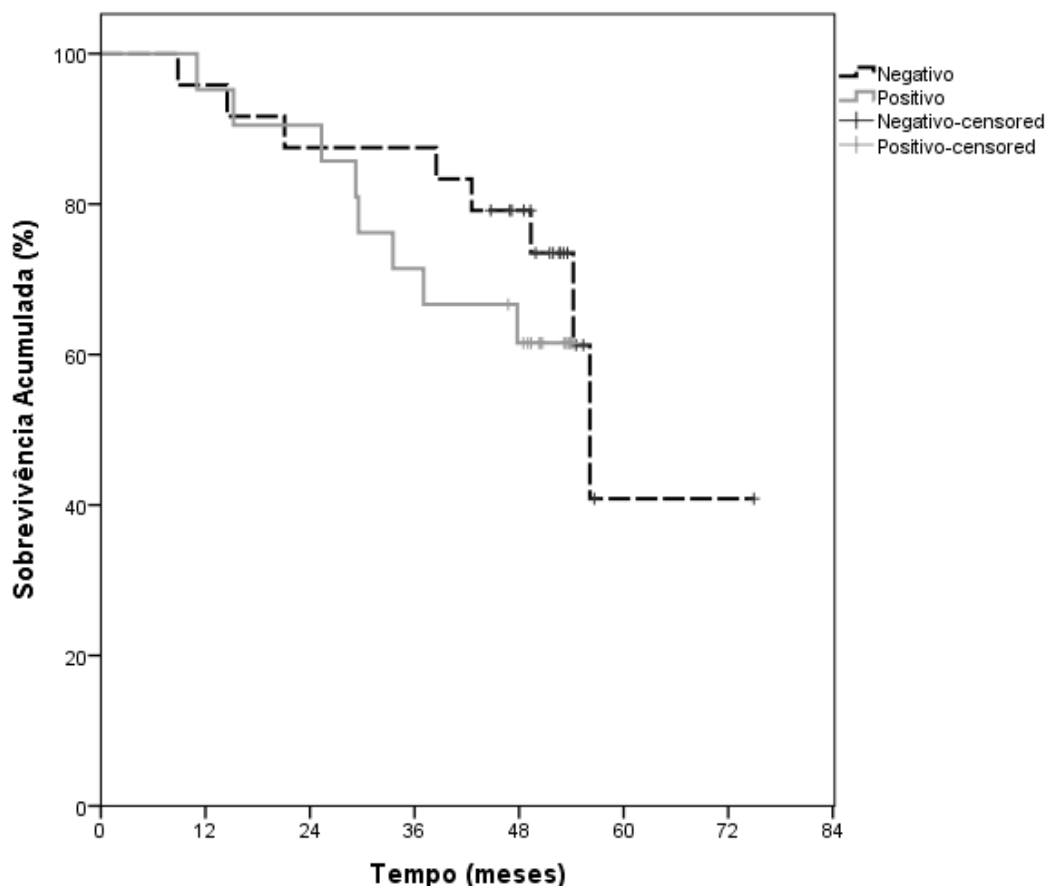


Figura 14 – Curva de sobrevida livre de recidiva bioquímica (estimado pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier) para pacientes com câncer de próstata cujos tumores apresentaram amplificação na qRT-PCR para o transcrito da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*.

4.7 Associação conjunta entre a imunorreação das proteínas ERG, PTEN e AR e a recidiva bioquímica

Para avaliar a relação multivariada entre a expressão das proteínas ERG, PTEN e AR, e a recidiva bioquímica, foi feita uma análise de correspondência. Quanto mais próximos os pontos estiverem da coordenada 0,0, ou mais afastados entre si, menor a relação existente entre os marcadores. Quanto mais afastados desta coordenada e mais próximos entre si, maior a relação entre eles.

Assim, nenhuma proteína teve relação com a outra, e nem com a recidiva bioquímica, sendo, portanto, marcadores independentes da presença ou ausência uns dos outros (Figura 15).

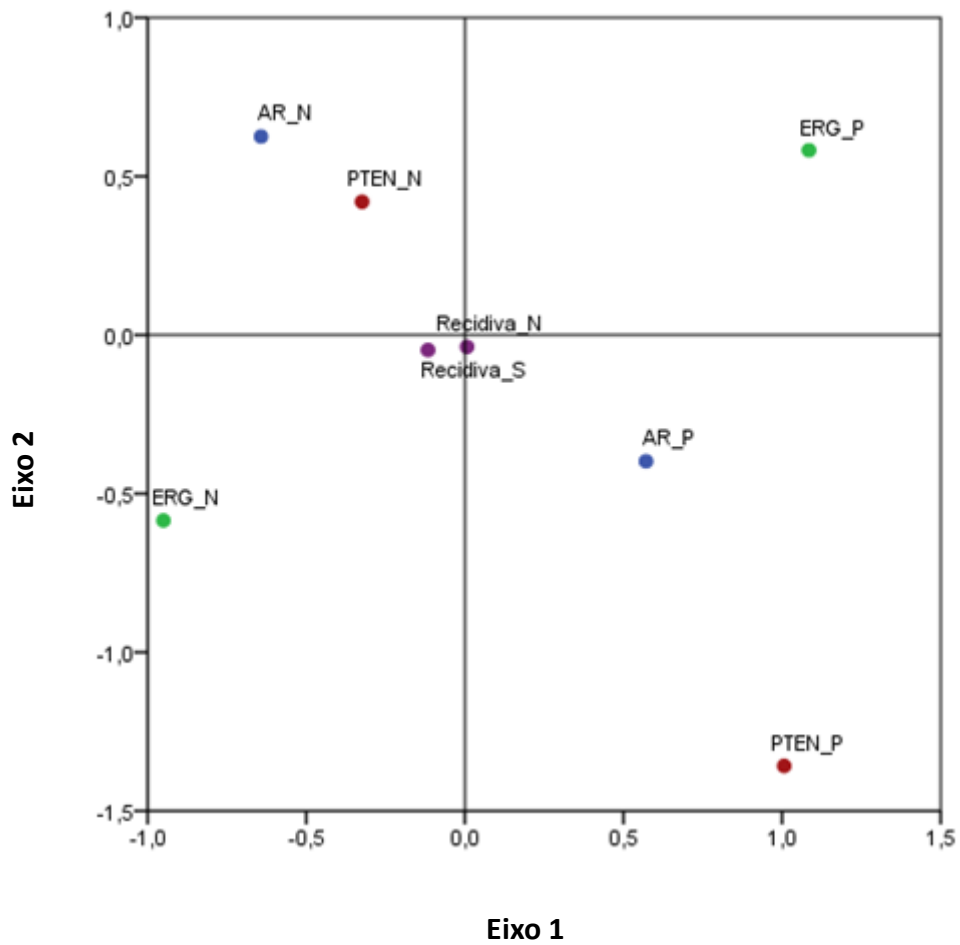


Figura 15 – Análise de correspondência entre as expressões das proteínas ERG, PTEN e AR, e a recidiva bioquímica. ERG_P, PTEN_P e AR_P: imunohistoquímica positiva para a expressão dessas proteínas. ERG_N, PTEN_N e AR_N: imunohistoquímica negativa para a expressão dessas proteínas. Recidiva_S: recidiva bioquímica positiva. Recidiva_N: recidiva bioquímica negativa.

5. DISCUSSÃO

A possibilidade de previsão de doença agressiva é um dos mais importantes e necessários etapas no controle do câncer, e tal fato é especialmente aplicável ao câncer de próstata. Estes carcinomas exibem uma grande diversidade comportamental e, embora sua classificação patológica seja um poderoso indicador dos aspectos da doença, é pouco provável uma distinção precisa entre câncer prostático indolente e agressivo com base somente em variáveis clínicas e patológicas [20, 23, 25, 74, 75]. Neste aspecto, o câncer de próstata representa uma oportunidade para se identificar e compreender características moleculares que podem ser utilizadas para estratificar pacientes em subgrupos clínicos e realizar uma melhor seleção de tratamento.

Progressos tem sido alcançados nos anos recentes ao se identificar alterações genômicas e epigenéticas em câncer prostático localizado e avançado [75]. Quebras na dupla fita de DNA podem ocorrer durante os processos de replicação ou transcrição. A falta de reparo adequado destas quebras pode resultar em rearranjos intra e intercromossômicos. Grande parte dos tumores primários de próstata possuem o rearranjo gênico *TMPRSS2:ERG*, o que resulta no controle da atividade do oncogene *ERG* pelo elemento responsivo a andrógeno *TMPRSS2* [22]. Estudos de perfil de expressão desse gene sugerem que os tipos tumorais que apresentam essa fusão representam um subconjunto que apresenta vias de progressão específicas, com potenciais implicações prognósticas e terapêuticas [23].

Partindo de dados na literatura em relação à alta frequência desta fusão gênica em tumores prostáticos e seu potencial valor prognóstico, avaliou-se no presente estudo a presença da proteína ERG, bem como da fusão *TMPRSS2:ERG*, em portadores de câncer prostático. A associação deste biomarcador com componentes de vias de sinalização, comumente comprometidas neste tipo de lesão, também foi explorada. Optou-se pela avaliação, individual e conjunta, de proteínas relacionadas com a progressão tumoral prostática porque este câncer está dentre os tumores mais heterogêneos, e é esperado que para a predição da progressão tumoral, um modelo multigênico seja mais aceito e confiável [75].

Na primeira etapa do presente estudo foi realizada a coleta de dados dos prontuários de pacientes portadores de câncer de próstata que adentraram o HCB entre os anos de 2006 e 2007. Esta minuciosa análise epidemiológica permitiu caracterizar o grupo de pacientes

selecionados para o estudo e segregá-los de diferentes formas. Parte destes dados foi correlacionada com as análises imunohistoquímicas e moleculares propostas.

Desde a descoberta da fusão *TMPRSS2:ERG* em câncer de próstata, vários estudos tentaram relacionar sua presença como prognóstico a alguns fatores de risco, como grau de Gleason, nível de PSA, câncer de próstata metastático ou morte específica por este tipo tumoral, apresentando resultados bastante divergentes [39, 43, 46, 76, 77].

Na caracterização da amostra estudada, a idade média dos pacientes no início do tratamento foi de 62,9 anos (D.P. = 6,99), faixa etária que corrobora com dados epidemiológicos descritos para diferentes amostras populacionais já analisadas [48, 69, 78]. Cerca de 60% da amostra foi classificada no grupo de risco intermediário para metástase, mas não houve relação entre idade ou grupo de risco com a expressão da proteína ERG. Schaefer e colaboradores, num estudo recente, encontraram relação entre a presença da proteína ERG e pacientes com idade menor que 55 anos ($p < 0,0001$), mas não com grupo de risco para metástase, seguindo a mesma classificação proposta por D'Amico [45, 70].

A frequência de indivíduos que afirmou na anamnese ter algum parente que teve câncer (47,0%) foi bastante representativa. Embora, a fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, aparentemente, não tenha sido relacionada à pré-disposição genética, uma avaliação mais detalhada destes pacientes e seus familiares poderá trazer mais informações sobre a origem destes rearranjos.

Quanto ao potencial de agressividade tumoral, os resultados encontrados por este trabalho não demonstraram relação entre a presença da proteína ERG e o estadió clínico, concordando com outros estudos [39, 79, 80]. Foi encontrada uma tendência dos pacientes a apresentarem imunorreação positiva para ERG quando o nível de PSA foi menor que 4,0ng/mL ($p=0,051$), assim como demonstrado anteriormente por outros pesquisadores [45, 81]. Sun e colaboradores concluíram, a partir de modelo celular e animal, que a superexpressão da proteína ERG aumenta a regulação do oncogene *c-MYC*. Este evento ocorre porque ERG é capaz de interagir fisicamente com elementos de ligação a ETS dentro da região promotora do oncogene. A regulação positiva de *c-MYC* bloqueia a expressão de genes associados à diferenciação de células prostáticas, como *MSMB*, *SLC45A3* e *PSA*, alterando o programa de diferenciação do epitélio. Tal evento talvez possa explicar o fato da expressão de ERG estar associada com níveis mais baixos desta última proteína [82]. Estudos anteriores relataram relação da fusão gênica *TMPRSS2:ERG* com menor ou com maior grau de Gleason [83, 84]. Neste trabalho, não houve relação entre essa categoria e a imunorreação de ERG,

corroborando com outros estudos que também não encontraram esse tipo de associação. [77, 80].

Apesar da presença da fusão gênica em questão já ter sido relacionada com recidiva bioquímica [26, 34, 58, 85], neste estudo, não foi encontrada nenhuma relação entre essas duas características, corroborando com outros estudos e com uma metanálise [77, 80, 81].

A não relação entre grau de Gleason, estadiamento clínico ou recidiva bioquímica e a expressão de ERG e, ainda, sua relação com níveis mais baixos de PSA sérico, podem ser sinais de que a presença ou ausência da fusão *TMPRSS2:ERG* talvez não seja um preditor forte de prognóstico para câncer de próstata. Entretanto, seu papel na patogênese e progressão desta neoplasia ainda está começando a ser estudada [81].

Alguns trabalhos demonstraram que existe concordância entre a expressão da proteína ERG e a presença da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, mostrando uma correlação de 87-96% [48-50, 86]. Neste estudo, foram encontradas 45,8% de imunorreações positivas para a proteína ERG, estando esta frequência de superexpressão acordada com a literatura [44, 87, 88].

Na detecção da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, a imunohistoquímica teve sensibilidade de 81,0% e especificidade de 83,3%, sendo que na análise de curva ROC obteve-se uma área abaixo da curva de 0,821 ($p < 0,001$). Chaux e colaboradores validaram a imunohistoquímica para ERG por FISH, encontrando sensibilidade e especificidade de 86% e 89%, respectivamente, e uma área abaixo da curva ROC de 0,87 ($p < 0,00001$) [49]. Esses resultados reforçam o fato de que a fusão gênica *TMPRSS2:ERG* é recorrente em câncer prostático, levando à superexpressão da proteína ERG como produto desta fusão, sendo o mais frequente oncogene em neoplasia prostática [22].

A associação da fusão *TMPRSS2:ERG* com outras alterações genômicas em câncer prostático parece envolver deleções de regiões cromossômicas onde se encontram os genes *PTEN* e *p53* [59]. Dessa forma, juntamente com a presença da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, a perda de função do gene *PTEN* está entre as alterações mais recorrentes em câncer de próstata [57, 89]. Estudos mostram que a perda da expressão da proteína PTEN, detectada por imunohistoquímica, foi bem correlacionada, ainda que não perfeitamente, com a perda de um ou ambos os alelos de *PTEN*, determinada por FISH, sendo capaz de detectar 75% a 86% dos casos com deleção genômica [65].

Apesar deste trabalho ter encontrado uma frequência elevada de casos considerados negativos na imunorreação para a proteína PTEN (77,3%), não houve relação estatisticamente

significativa com nenhuma característica clínica avaliada. Na análise de sobrevivência, não houve diferença entre o tempo de recidiva bioquímica entre os pacientes que expressaram e os que não expressaram a proteína PTEN. Alguns autores relacionaram, através de análise de Kaplan-Meier, a imunorreação negativa para a proteína PTEN com a diminuição no tempo para metástase, mas na análise multivariada de Cox, não foi encontrada relação entre a perda da expressão da proteína e qualquer parâmetro clínico [65]. Em outro trabalho, a imunorreação negativa para PTEN foi considerada fator prognóstico negativo para sobrevida livre de progressão [90]

Como o câncer de próstata surge após anos do pico nos níveis androgênicos, isso indica que a exposição hormonal por longo período pode ser necessária para o desenvolvimento do câncer. Essa relação também parece estar associada com o surgimento da fusão gênica. Alguns estudos propuseram haver sinergia entre *AR* e *TMPRSS2:ERG* para promover o desenvolvimento de adenocarcinoma invasivo, já que a transcrição do gene *TMPRSS2* é dependente de andrógeno [39, 91]. Em contrapartida, também foi descrito que a proteína ERG interrompe a sinalização de AR, inibindo sua expressão [92].

Em tumores que recidivam após terapia de privação androgênica, o AR também desempenha importante papel no desenvolvimento do câncer prostático e suas funções transcricionais são parcial ou amplamente restauradas [93]. Em um estudo, recente Chen e colaboradores conseguiram demonstrar que tanto em humanos como em modelo animal quando há associação de perda de PTEN e expressão de ERG, as células tumorais apresentam parcial restauração da sinalização por AR [94]. A transcrição de AR é dependente de andrógenos e estimulada por AKT. Em situações de privação desse hormônio, a célula pode transcrever AR devido a presença de AKT fosforilado, como via alternativa para a manutenção da sobrevivência celular. A deleção de PTEN leva à ativação constante de AKT, podendo ser uma explicação para a sobrevivência de células tumorais hormônio refratárias [95, 96].

Apesar das correlações descritas na literatura entre esses biomarcadores, este estudo encontrou que as presenças das proteínas ERG, PTEN e AR são independentes entre si, ou seja, a expressão ou não expressão de uma não depende da expressão ou não expressão de outra.

Embora ainda haja controvérsias, a associação de rearranjo gênico com a carcinogênese prostática tem gerado uma grande quantidade de informações a respeito da biologia tumoral. Entretanto, o impacto clínico desta alteração genômica ainda está sendo

desvendado, o que torna evidente a importância de estudos de coortes compostas por diferentes amostras populacionais. Adicionalmente, um estudo de *microarray* de linhagens de células revelou que mais de 2000 genes ficam desregulados quando existe alta atividade de ERG [97].

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que os pacientes selecionados para o presente estudo são adequados para análises referentes à expressão imunohistoquímica de ERG, bem como para a fusão gênica *TMPRSS2:ERG*. Permitem também inferir que a via carcinogênica prostática associada à alteração na regulação do fator de transcrição *ERG* está presente de forma frequente entre indivíduos diagnosticados com câncer prostático. Ainda não há um biomarcador altamente específico para diagnóstico precoce do câncer de próstata e tal constatação, justifica o grande número de pesquisa neste campo, na atualidade [98].

A presença da proteína ERG como prognóstico a alguns fatores de risco ainda permanece divergente, mas sua frequência, especificidade e recorrência em CAP fazem com que emergja como uma potencial ferramenta adjuvante no diagnóstico desta neoplasia. Neste contexto, a aplicação de ensaios envolvendo fusão gênica parece promissora, podendo contribuir ao se somar com os já conhecidos marcadores rotineiros, ou seja, PSA e PCA3.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A frequência encontrada de imunorreações positivas para ERG corrobora o fato de se tratar de uma oncoproteína comum em câncer de próstata. Pacientes com níveis baixos de PSA sérico tiveram mais chance de apresentar positividade na imunorreação para ERG. A elevada porcentagem de pacientes com perda de expressão proteica de PTEN infere uma possível perda da função ou deleção do gene PTEN.

- A imunohistoquímica foi eficiente para detectar a presença da fusão gênica através da expressão proteica de ERG, fato validado por qRT-PCR.

- Não houve diferença nem nos índices de recidiva bioquímica, nem no tempo do diagnóstico de câncer de próstata até a recidiva bioquímica, entre pacientes com imunorreações positivas ou negativas para a proteína ERG.

- A expressão das proteínas ERG, PTEN e AR não interferiram nas expressões umas das outras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abate-Shen C and Shen MM, *Molecular genetics of prostate cancer*. Genes & Dev 2000. **14**: p. 2410-2434.
2. Bonkhoff H and Remberger K, *Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model*. Prostate, 1996. **28**: p. 98-106.
3. ACS, *Facts and Figures 2010*. Atlanta: American Cancer Society, 2010.
4. INCA, *Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, *Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância*. 2011: p. 118.
5. Lee C, Kozlowski JM, and Grayhack JT, *Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth*. Prostate, 1997. **31**: p. 131-138.
6. Taplin ME and Ho S-M, *The endocrinology of prostate cancer*. J Clin Endocr Metabol, 2001. **86**: p. 3467-3477.
7. Cunha, G.R., A.A. Donjacour, and Y. Sugimura, *Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate*. Biochem Cell Biol, 1986. **64**(6): p. 608-14.
8. Debes, J.D. and D.J. Tindall, *The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer*. Cancer letters, 2002. **187**(1-2): p. 1-7.
9. Gronberg, H., *Prostate cancer epidemiology*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 859-64.
10. Hsing, A.W., J.K. Reichardt, and F.Z. Stanczyk, *Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions*. The Prostate, 2002. **52**(3): p. 213-35.
11. Galbraith, S.M. and G.M. Duchesne, *Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy*. European journal of cancer, 1997. **33**(4): p. 545-54.
12. Ateeq, B., et al., *Role of dutasteride in pre-clinical ETS fusion-positive prostate cancer models*. The Prostate, 2012. **72**(14): p. 1542-9.
13. Lee, Y.F., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase pathway by the antiandrogen hydroxyflutamide in androgen receptor-negative prostate cancer cells*. Cancer Research, 2002. **62**(21): p. 6039-44.
14. Ruijter, E., et al., *Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma*. Endocr Rev, 1999. **20**(1): p. 22-45.

15. Bastian, P.J., et al., *Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2005. **11**(11): p. 4037-43.
16. Sidransky D, *Emerging molecular markers of cancer* *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**: p. 210-219.
17. Liu J-W, et al., *ssDNA-binding protein 2 is frequently hypermethylated and suppresses cell growth in human prostate cancer* *Clin Cancer Res*, 2008. **14**: p. 3754-3760.
18. Rouprêt M, et al., *Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage* *Clin Cancer Res*, 2007. **13**: p. 1720-1725.
19. Oikawa T and Yamada T, *Molecular biology of the Ets family of transcription factors*. *Gene*, 2003. **303**: p. 11-34.
20. Seth A and Watson DK, *ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**: p. 2462–2478.
21. Lin B, et al., *Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2*. *Cancer Res*, 1999. **4180–4184**.
22. Tomlins SA, et al., *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer*. *Science*, 2005. **310**: p. 644–648.
23. Tomlins SA, et al., *ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice*. *Eur Urol*, 2009. **56**: p. 275-286.
24. Wang J, et al., *Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer*. *Cancer Res*, 2006 **66**: p. 8347-8351.
25. Oikawa, T., *ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy*. *Cancer science*, 2004. **95**(8): p. 626-33.
26. Perner S, et al., *TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**: p. 8337–8341.
27. Yoshimoto M, et al., *Three-color FISH analysis of TMPRSS2/ERG fusions in prostate cancer indicates that genomic microdeletion of chromosome 21 is associated with rearrangement* *Neoplasia*, 2006. **8**: p. 465–469.

28. Tu JJ, et al., *Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues* Mod Pathol, 2007. **20**: p. 921-928.
29. Guo CC, et al., *Prostate cancer of transition zone origin lacks TMPRSS2-ERG gene fusion*. Mod Pathol, 2009. **22**: p. 866-871.
30. Mwamukonda, K., et al., *Quantitative expression of TMPRSS2 transcript in prostate tumor cells reflects TMPRSS2-ERG fusion status*. Prostate cancer and prostatic diseases, 2010. **13**(1): p. 47-51.
31. Furusato B, et al., *Mapping of TMPRSS2-ERG fusions in the context of multi-focal prostate cancer*. Mod Pathol, 2008. **21**: p. 67-75.
32. Mosquera JM, et al., *Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer*. J Pathol, 2007 **212**: p. 91-101.
33. Clark J, et al., *Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate*. Oncogene, 2007. **26**: p. 2667–2673.
34. Mehra R, et al., *Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases*. Cancer Res, 2007. **67**: p. 7991-7995.
35. Watson SK, et al., *Minimum altered regions in early prostate cancer progression identified by high resolution whole genome tiling path BAC array comparative hybridization*. Prostate, 2009. **69**: p. 961-975.
36. Huang W and Wanknitz M, *ETS gene fusions and prostate cancer*. Am J Transl Res, 2009. **1**: p. 341-351.
37. Wu, F., S. Ding, and J. Lu, *Truncated ERG proteins affect the aggressiveness of prostate cancer*. Medical hypotheses, 2013.
38. St John, J., et al., *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): p. 94-101.
39. Nam RK, et al., *Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer*. Br J Cancer, 2007. **97**: p. 1690-1695.
40. Mosquera JM, et al., *Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications*. Clin Cancer Res, 2008. **14**: p. 3380-3385.

41. Bonaccorsi L, et al., *Persistence of expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene after pre-surgery androgen ablation may be associated with early prostate specific antigen relapse of prostate cancer: preliminary results*. J Endocrinol Invest, 2009. **32**: p. 590-596.
42. Hofer MD, et al., *Genome-wide linkage analysis of TMPRSS2-ERG fusion in familial prostate cancer*. Cancer Res, 2009. **69**: p. 640-646.
43. Demichelis F, et al., *TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort*. Oncogene, 2007. **26**: p. 4596–4599.
44. Spencer, E.S., et al., *Prognostic value of ERG oncoprotein in prostate cancer recurrence and cause-specific mortality*. The Prostate, 2013.
45. Schaefer, G., 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.
46. Gopalan A, et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy*. Cancer Res, 2009. **69**: p. 1400-1406.
47. Holcomb IN, et al., *Comparative analyses of chromosome alterations in soft-tissue metastases within and across patients with castration-resistant prostate cancer*. Cancer Res, 2009. **69**: p. 7793-7802.
48. Park, K., et al., *Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer*. Neoplasia, 2010. **12**(7): p. 590-8.
49. Chaux, A., et al., *Immunohistochemistry for ERG expression as a surrogate for TMPRSS2-ERG fusion detection in prostatic adenocarcinomas*. The American journal of surgical pathology, 2011. **35**(7): p. 1014-20.
50. Falzarano, S.M., et al., *ERG gene rearrangement status in prostate cancer detected by immunohistochemistry*. Virchows Archiv : an international journal of pathology, 2011. **459**(4): p. 441-7.
51. van Leenders, G.J., et al., *Antibody EPR3864 is specific for ERG genomic fusions in prostate cancer: implications for pathological practice*. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 2011. **24**(8): p. 1128-38.

52. Braun, M., 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): p. 165-9.
53. Popanda O, et al., *Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation*. Mutat Res, 2009. **667**: p. 58-69.
54. Mani, R.S., et al., *Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1230.
55. Rieger KE, et al., *Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004. **101**: p. 6635-6640.
56. Zhang, S. and D. Yu, *PI(3)king apart PTEN's role in cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010. **16**(17): p. 4325-30.
57. Yoshimoto, M., 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): p. 678-85.
58. Yoshimoto, M., 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): p. 1451-60.
59. Taylor, B.S., et al., *Integrative genomic profiling of human prostate cancer*. Cancer Cell, 2010. **18**(1): p. 11-22.
60. Bismar, T.A., et al., *PTEN genomic deletion is an early event associated with ERG gene rearrangements in prostate cancer*. BJU international, 2011. **107**(3): p. 477-85.
61. Yoshimoto, M., et al., *PTEN genomic deletions that characterize aggressive prostate cancer originate close to segmental duplications*. Genes, chromosomes & cancer, 2012. **51**(2): p. 149-60.
62. Carver, B.S., et al., *Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer*. Cancer Cell, 2011. **19**(5): p. 575-86.
63. Squire JA, *TMPRSS2-ERG and PTEN loss in prostate cancer*. Nat Genet, 2009. **41**: p. 509-510.

64. Reid, A.H., 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): p. 678-84.
65. Lotan, T.L., 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): p. 6563-73.
66. Carver, B.S., et al., *Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate*. Nature genetics, 2009. **41**(5): p. 619-24.
67. Di Cristofano, A., et al., *Pten is essential for embryonic development and tumour suppression*. Nature genetics, 1998. **19**(4): p. 348-55.
68. King, J.C., et al., *Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis*. Nature genetics, 2009. **41**(5): p. 524-6.
69. FitzGerald LM, et al., *Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 230.
70. D'Amico, A.V., et al., *Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 1998. **280**(11): p. 969-74.
71. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nature medicine, 1998. **4**(7): p. 844-7.
72. Camp RL, Charette LA, and Rimm DL, *Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma*. Lab Investigation, 2000. **80**: p. 1943-1949.
73. van de Rijn M and Gilks CB, *Applications of microarrays to histopathology*. Histopathology, 2004. **44**: p. 97-108.
74. Bismar, T.A., et al., *Interrogation of ERG gene rearrangements in prostate cancer identifies a prognostic 10-gene signature with relevant implication to patients' clinical outcome*. BJU international, 2013.
75. Schoenborn, J.R., P. Nelson, and M. Fang, *Genomic profiling defines subtypes of prostate cancer with the potential for therapeutic stratification*. Clinical cancer

- research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2013. **19**(15): p. 4058-66.
76. Leinonen KA, et al., *Association of SPINK1 expression and TMPRSS2:ERG fusion with prognosis in endocrine-treated prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(10): p. 2845-2851.
 77. Rubio-Briones, J., et al., *Clinical implications of TMPRSS2-ERG gene fusion expression in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy*. The Journal of urology, 2010. **183**(5): p. 2054-61.
 78. Tavukcu, H.H., et al., *Preliminary Results of Noninvasive Detection of TMPRSS2:ERG Gene Fusion in a Cohort of Patients With Localized Prostate Cancer*. Korean J Urol, 2013. **54**(6): p. 359-63.
 79. Miyagi, Y., et al., *ETS family-associated gene fusions in Japanese prostate cancer: analysis of 194 radical prostatectomy samples*. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 2010. **23**(11): p. 1492-8.
 80. Hoogland, A.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): p. 471-9.
 81. Pettersson, A., et al., *The TMPRSS2:ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2012. **21**(9): p. 1497-509.
 82. Sun, C., et al., *TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation*. Oncogene, 2008. **27**(40): p. 5348-53.
 83. Bismar, T.A., et al., *ERG protein expression reflects hormonal treatment response and is associated with Gleason score and prostate cancer specific mortality*. European journal of cancer, 2012. **48**(4): p. 538-46.

84. Fine, S.W., et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion is associated with low Gleason scores and not with high-grade morphological features*. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 2010. **23**(10): p. 1325-33.
85. Attard, G., et al., *Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer*. *Oncogene*, 2008. **27**(3): p. 253-63.
86. Furusato, B., et al., *ERG oncoprotein expression in prostate cancer: clonal progression of ERG-positive tumor cells and potential for ERG-based stratification*. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 2010. **13**(3): p. 228-37.
87. Nagle, R.B., et al., *ERG overexpression and PTEN status predict capsular penetration in prostate carcinoma*. *The Prostate*, 2013. **73**(11): p. 1233-40.
88. Weinmann, S., et al., *Immunohistochemical expression of ERG in the molecular epidemiology of fatal prostate cancer study*. *The Prostate*, 2013. **73**(13): p. 1371-7.
89. Yoshimoto, M., 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**(2): p. 128-37.
90. Antonarakis, E.S., et al., *An immunohistochemical signature comprising PTEN, MYC, and Ki67 predicts progression in prostate cancer patients receiving adjuvant docetaxel after prostatectomy*. *Cancer*, 2012.
91. Leshem O, et al., *TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model*. *Plos One*, 2011. **6**: p. e21650.
92. Yu, J., et al., *An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(5): p. 443-54.
93. Lamont, K.R. and D.J. Tindall, *Androgen regulation of gene expression*. *Adv Cancer Res*, 2010. **107**: p. 137-62.
94. Chen, Y., et al., *ETS factors reprogram the androgen receptor cistrome and prime prostate tumorigenesis in response to PTEN loss*. *Nature medicine*, 2013. **19**(8): p. 1023-9.
95. Mikhailova, M., et al., *AKT regulates androgen receptor-dependent growth and PSA expression in prostate cancer*. *Adv Exp Med Biol*, 2008. **617**: p. 397-405.
96. Sircar, K., et al., *PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer*. *The Journal of pathology*, 2009. **218**(4): p. 505-13.

97. Becker-Santos DD, et al., *Integrin-linked kinase as a target for ERG-mediated invasive properties in prostate cancer models*. *Carcinogenesis*, 2012. **in press**.
98. Bradford TJ, et al., *Molecular markers of prostate cancer*. *Urol Oncol*, 2006. **24**: p. 538–551.

ANEXO A



Comitê de Ética em Pesquisa CEP

Para: Silvana Gisele Pegorin de Campos

De: Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 05/01/2011

Projeto de Pesquisa: 425/2010

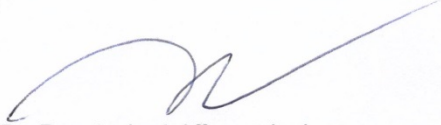
Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos analisou em reunião ordinária de 20/12/2010 o projeto de pesquisa **425/2010 “Avaliação da super-expressão das proteínas TMRSS2 e ERG e a fusão gênica TMRSS2:ERG em portadores de câncer prostático”**, decidindo que o mesmo encontra-se:

“Aprovado”

Solicitamos, que sejam encaminhados ao CEP, relatórios semestrais e final, bem como possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo a fim de se fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,



Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Barretos

ANEXO B

Ficha de coleta utilizada para coletar dados de pacientes com câncer de próstata do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, no período de 2006-2007.

FICHA DE COLETA DE DADOS – Projeto TMRSS2:ERG em CAP			
1	Identificação	1	
2	Nome	2	
3	Registro hospitalar	3	
4	Data de nascimento DD/MM/AAAA	4	
5	Data da primeira consulta no Hospital DD/MM/AAAA	5	
6	Cidade	6	
7	Estado	7	
8	Estado Civil 1- Solteiro; 2- Casado / União estável; 3- Divorciado / Separado; 4- Viúvo; 99- Ignorado	8	
9	Cor 1- Branca; 2- Negra; 3- Parda; 4- Amarela; 99- ignorado	9	
10	Escolaridade 1- Analfabeto; 2- Fundamental incompleto; 3- Fundamental completo; 4- Médio incompleto; 5- Médio completo; 6- Superior incompleto; 7- Superior completo; 99- Ignorado	10	
11	Toque retal 0- Normal; 1- Suspeito; 2- Não realizado; 99- Ignorado	11	
12	PSA progressivo 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	12	
13	Valor de PSA progressivo (origem) 9999- Ignorado	13	
14	Antecedente de câncer familiar 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	14	
15	Antecedente de câncer próstata familiar 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	15	
16	História clínica de câncer 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	16	
17	Valor do PSA total (HCB)	17	

FICHA DE COLETA DE DADOS – Projeto TMRSS2:ERG em CAP			
		9999- Ignorado	
18	Valor do PSA livre (HCB)	0- Não realizado; 9999- Ignorado	18
19	Ultrassonografia trans-retal – volume prostático	0- Não realizado cm³	19
20	Ressonância magnética – volume prostático	0- Não realizado cm³	20
21	Cintilografia óssea	0- Negativo; 1- Positivo; 2- Não realizada	21
22	Data da 1 ^a biópsia	DD/MM/AAAA	22
23	Necessidade de estudo imuno-histoquímico para diagnóstico do tumor	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	23
24	Achado principal - biópsias 1- Hiperplasia; 2- Prostatite crônica; 3- PIN; 4- Adenocarcinoma acinar; 5- Hiperplasia atípica de pequenos ácinos; 6- Atrofia; 7- Outro, qual? _____; 88- Não realizado; 99- Ignorado		24
25	Número de biópsias necessárias para o diagnóstico	999- Ignorado	25
26	Necessidade de biópsia de zona transicional	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	26
27	Zona transicional positiva	0- Não; 1- Sim; 888- Não realizada; 999- Ignorado	27
28	Número de fragmentos da primeira biópsia	888- Não realizado; 999- Ignorado	28
29	Número de fragmentos da segunda biópsia	888- Não realizado; 999- Ignorado	29
30	Número de fragmentos da terceira biópsia	888- Não realizado; 999- Ignorado	30
31	Número de fragmentos da quarta biópsia	888- Não realizado; 999- Ignorado	31
32	Número de fragmentos da quinta biópsia	888- Não realizado; 99- Ignorado	32
33	Número total de fragmentos para o diagnóstico	88- Não realizado; 99- Ignorado	33
34	Número total de fragmentos positivos (última biópsia +)	88- Não realizado; 99- Ignorado	34
35	Porcentagem fragmento positivo	(%) 888- Não realizado; 999- Ignorado	35
36	Data da biópsia diagnóstica		36

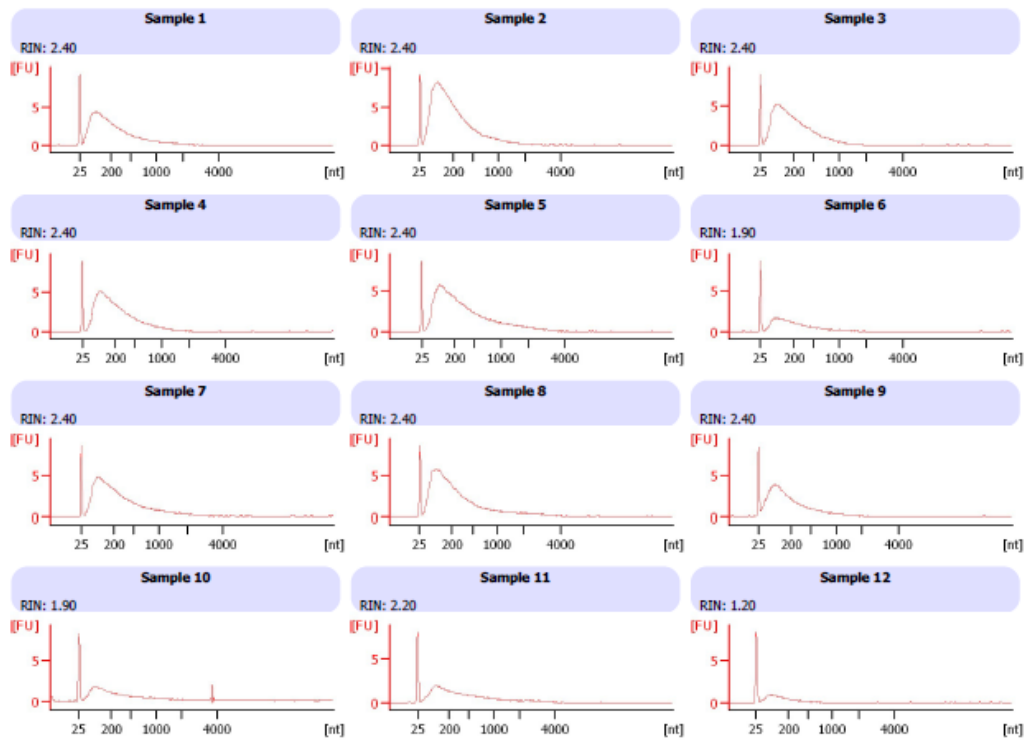
FICHA DE COLETA DE DADOS – Projeto TMRSS2:ERG em CAP			
		DD/MM/AAAA	
37	Gleason total (biópsia)	888 - Sem biópsia / sem tumor; 999-Ignorado	37
38	Gleason após prostatectomia	888 - não foi realizada prostatectomia; 999-Ignorado	38
39	Localização tumoral – Ápice direito	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	39
40	Localização tumoral – Ápice esquerdo	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	40
41	Localização tumoral – Terço médio direito	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	41
42	Localização tumoral – Terço médio esquerdo	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	42
43	Localização tumoral – Base direita	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	43
44	Localização tumoral – Base esquerda	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	44
45	Margens positivas	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	45
46	Transposição capsular	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	46
47	Invasão de vesículas seminais	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	47
48	Infiltração neural	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	48
49	Invasão angiolinfática	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	49
50	Estadiamento cT	1 - 1a/1b/1c; 2 - 2a/2b; 3 - 3a/3b/3c; 4 - 4a/ 4b; 5 - x; 99 - Ignorado	50
51	Estadiamento cN	0 - 0; 1 - 1; 2 - 2; 3 - 3; 4 - x; 99 - Ignorado	51
52	Estadiamento cM	0 - 0; 1 - 1a; 2 - 1b; 3 - 1c; 4 - x; 99 - Ignorado	52
53	Estadiamento clínico	1 - I; 2 - II; 3 - III; 4 - IV; 99 - Ignorado	53
54	Radioterapia	0 - Não; 1 - Sim; 99 - Ignorado	54
55	Data de radioterapia	DD/MM/AAAA	55
56	Prostatectomia Radical		56

FICHA DE COLETA DE DADOS – Projeto TMRSS2:ERG em CAP			
		0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
57	Data de prostatectomia radical	DD/MM/AAAA	57
58	Orquiectomia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	58
59	Data de orquiectomia	DD/MM/AAAA	59
60	Hormonioterapia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	60
61	Data de hormonioterapia	DD/MM/AAAA	61
62	Quimioterapia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	62
63	Data da Quimioterapia	DD/MM/AAAA	63
64	Linfadenectomia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	64
65	Valor do PSA total - 1	9999- Ignorado	65
66	Data do PSA - 1	DD/MM/AAAA	66
67	Valor do PSA total - 2	9999- Ignorado	67
68	Data do PSA - 2	DD/MM/AAAA	68
69	Valor do PSA total - 3	9999- Ignorado	69
70	Data do PSA - 3	DD/MM/AAAA	70
71	Valor do PSA total - 4	9999- Ignorado	71
72	Data do PSA - 4	DD/MM/AAAA	72
73	Valor do PSA total - 5	9999- Ignorado	73
74	Data do PSA - 5	DD/MM/AAAA	74
75	Valor do PSA total - 6	9999- Ignorado	75
76	Data do PSA - 6		76

FICHA DE COLETA DE DADOS – Projeto TMRSS2:ERG em CAP			
		DD/MM/AAAA	
77	Valor do PSA total -7	9999- Ignorado	77
78	Data do PSA - 7	DD/MM/AAAA	78
79	Valor do PSA total -8	9999- Ignorado	79
80	Data do PSA - 8	DD/MM/AAAA	80
81	Valor do PSA total -9	9999- Ignorado	81
82	Data do PSA - 9	DD/MM/AAAA	82
83	Valor do PSA total -10	9999- Ignorado	83
84	Data do PSA - 10	DD/MM/AAAA	84
85	Valor do PSA total -11	9999- Ignorado	85
86	Data do PSA - 11	DD/MM/AAAA	86
87	Valor do PSA total -12	9999- Ignorado	87
88	Data do PSA - 12	DD/MM/AAAA	88
89	Valor do PSA total -13	9999- Ignorado	89
90	Data do PSA - 13	DD/MM/AAAA	90
91	Valor do PSA total -14	9999- Ignorado	91
92	Data do PSA - 14	DD/MM/AAAA	92
93	Valor do PSA total -15	9999- Ignorado	93
94	Data do PSA - 15	DD/MM/AAAA	94
95	Estado atual da paciente	1- Vivo sem doença; 2- Vivo com doença 3- Tratamento fora; 4- Óbito por CA; 5- Óbito por outra causa; 99- Ignorado	95

FICHA DE COLETA DE DADOS – Projeto TMRSS2:ERG em CAP			
96	Perda de seguimento	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	96
97	Data da última informação	DD/MM/AAAA	97
98	Data do levantamento	DD/MM/AAAA	98
99	Levantamento realizado por:		99


ANEXO C



Eletroferogramas da análise da qualidade de RNA, feita em *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies), com os respectivos números de integridade do RNA (RIN).

ANEXO D

Documento comprobatório de artigo científico submetido à revista Scientific Reports.

	manuscripttrackingssystem	SCIENTIFIC REPORTS
tracking system home	author instructions	reviewer instructions
? help	tips	logout
journal home		

Manuscript #	SREP-13-06224-T
Current Revision #	0
Submission Date	12th December 13
Current Stage	Manuscript under consideration
Title	The role of TMPRSS2:ERG in molecular stratification of PCa and its association with tumor aggressiveness: a study in Brazilian patients
Running Title	Gene fusion in brazilian patients with PCa
Manuscript Type	Original Research
Corresponding Author	Dr. Silvana Campos (spegorin@hotmail.com) (Microscopy and Microanalysis Center, São Paulo State University, IBILCE/UNESP)
Contributing Authors	Miss Flavia Eguchi , Dr. Eliney Faria , Dr. Cristovam Scapulatempo Neto , Adhemar Longatto-Filho, PhD , Ms. Cleyton Zanardo-Oliveira , Dr. Sebastião Taboga
Authorship	Yes
Abstract	The aim of this study was to assess the presence of transcription factor ERG and gene fusion TMPRSS2:ERG in prostate cancer patients from Brazil and to correlate it with individual response to treatment. Samples from 118 patients diagnosed with PCa and 27 from individuals without PCa were tested for ERG, AR and PTEN immunohistochemistry (IHC), and the presence of TMPRSS2:ERG transcripts was confirmed by qRT-PCR. The results showed that 45.8% of tumors tested positive for ERG IHC, and this finding was consistent with the results of qRT-PCR testing ($k=0.694$, $p<0.001$). IHC had a specificity of 83.3% and a sensitivity of 81% in detecting TMPRSS2:ERG fusion. Patients with PSA<4.0ng/mL tended to show positive immunoreactivity for ERG ($p=0.051$). Kaplan-Meier analysis suggested that ERG presence did not influence the time of biochemical recurrence. Multivariate Correspondence Analysis showed that ERG, PTEN and AR and biochemical recurrence showed they are independent from each other. This study demonstrates that both IHC and qRT-PCR are useful tools in detecting TMPRSS2:ERG gene fusions. A correlation between ERG immunoreactivity and clinical and pathological parameters was not found, but the frequency, specificity and recurrence of ERG in PCa suggests that ERG testing may be a potential adjunct diagnostic tool.
Subject Categories	Prostate cancer, immunohistochemistry, TMPRSS2:ERG gene fusion, qRT-PCR
Techniques	Life sciences techniques, Structural biology [Antibodies]; Life sciences techniques, Gene expression analysis [Reverse transcriptase polymerase chain reaction]; Life sciences techniques, Gene expression analysis [RNA isolation and purification];
Subject Terms	Health sciences/Biomarkers Health sciences/Biomarkers/Diagnostic markers
Competing Financial Interest	There is NO Competing Interest.

Manuscript Items

1. Author Cover Letter [PDF \(46KB\)](#) [Source File \(DOC\) 40KB](#)
2. Merged File containing manuscript text and 5 Figure files. [PDF \(567KB\)](#)
 - a. Article File [PDF \(143KB\)](#) [Source File \(DOC\) 311KB](#)
 - b. Figure 1 [PDF \(213KB\)](#) [Source File \(TIF\) 1043KB](#)
 - c. Figure 2 [PDF \(49KB\)](#) [Source File \(TIF\) 16KB](#)
 - d. Figure 3 [PDF \(55KB\)](#) [Source File \(TIF\) 35KB](#)
 - e. Figure 4 [PDF \(58KB\)](#) [Source File \(TIF\) 46KB](#)
 - f. Figure 5 [PDF \(53KB\)](#) [Source File \(TIF\) 26KB](#)

More Manuscript Info and Tools

- [Send Manuscript Correspondence](#)
[Check Status](#)



ANEXO E

E-mail de revisor da revista Scientific Reports com sugestão para revisão e reenvio do artigo científico.

Date: Tue, 24 Dec 2013 08:13:32 -0500

To: spegorin@hotmail.com

Subject: Scientific Reports: Decision letter for SREP-13-06224-T

From: scientificreports@nature.com

** Please ensure you delete the link to your author homepage in this e-mail if you wish to forward it to your coauthors **

Dear Dr Campos,

Your manuscript entitled "The role of Tmprss2:ERG in molecular stratification of PCa and its association with tumor aggressiveness: a study in Brazilian patients" has now been seen by the referee(s), whose comments are appended below. You will see that, while they find your work of interest, they have raised points that need to be addressed by a major revision.

We therefore invite you to revise and resubmit your manuscript, taking into account the points raised. At the same time, we ask that you ensure your manuscript complies with our format requirements explained in full at <http://www.nature.com/srep/authors/submit.html>.

We look forward to hearing from you soon.

Best regards,

Yu Chen

Editorial Board Member Scientific Reports