

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ANÁLISE MOLECULAR  
DA EXPRESSÃO DOS GENES KLK2 E KLK3  
E SUAS IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO  
DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

JULIANA MEOLA

UBERLÂNDIA – MG  
2003

**SISBI/UFU**



1000208544

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON  
515.6E-006.6  
0,5510  
TES/MEM

**ANÁLISE MOLECULAR  
DA EXPRESSÃO DOS GENES KLK2 E KLK3  
E SUAS IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO  
DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Aluna: Juliana Meola

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia para obtenção  
do Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área de concentração  
Genética)

UBERLÂNDIA-MG  
2003

---

---

## COMISSÃO JULGADORA

---

---

### MEMBROS TITULARES:

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart  
**Orientador**

Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart  
**Conselheira**

Profa. Dra. Leonilda Stanziola  
**Conselheira**

### MEMBROS SUPLENTE:

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

Profa. Dra. Amélia Hamaguchi

“ Ando devagar porque já tive pressa  
e levo esse sorriso porque já chorei demais.  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,  
eu só levo a certeza de que  
muito pouco eu sei, que eu nada sei...

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,  
um dia a gente chega e noutro vai embora.

Cada um de nós compõe a sua história  
e cada ser em si carrega o dom de ser capaz...  
de ser feliz...”

(“Tocando em frente”-Almir Sater/Renato Teixeira)

A Deus,  
por caminhar comigo sempre em todos os momentos,  
até mesmo naqueles em que eu não consegui perceber sua presença.

Aos meus pais amados,  
que são responsáveis por tudo o que sou e consegui até hoje.

Aos meus irmãos,  
pelo carinho e compreensão.

À minha Tia Bete  
que só ela sabe que alcancei esta vitória com sua ajuda.

A todos os demais da minha família,  
os quais amo muito...e sinto muitas saudades.

## AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, os quais tornaram esta pesquisa possível, mas que por outro lado infelizmente fazem parte dela.

À equipe Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, em especial Dr. Sebastião e Dr. Lindolfo.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Luiz Ricardo, pela confiança e disposição.

Aos membros da Banca Examinadora pelas correções e críticas que engrandeceram este trabalho.

Aos Docentes do Instituto de Genética e Bioquímica e aos funcionários pelo auxílio técnico e instrutivo.

Aos meus Amigos de Laboratório: Fred, Elis, Guilherme, Elaine, Walter, Cícero, Luciana, Rossana, Marcelo, Júlio, Tatianas, Paulas, Mércia, Renata, Katiana, Bethânia, Gates, Lígia, Lorraine, Bárbara, Fernando, Kleber, Ju São Julião, Wânia, Marcelo Giovanini, Machaim, Warley, Fausto, Rosana, Ju Cobo, Priscila.

À minha família de Laboratório, meu grupo de trabalho, pelo companheirismo: Adriana, Alexandra, Ana Cândida, Andréia, Ana Paula, Jaqueline, Ju Franco, Vivian, Waldesse.

Ao meu amigo Waldesse também pelos auxílios no computador.

Ao Prof. Heyder Diniz pela ajuda nas análises estatísticas.

A minha Amiga Ana Cândida, companheira, que estava presente em todos os momentos, inclusive naqueles de mau humor.

Aos meus amigos da Bioquímica.

Ao meu grande amigo e inseparável Willian.

Aos meus companheiros de graduação Rodrigo, Sílvio e Ana Flávia.

Às minhas amigas de sempre: Yara, Karine e Taninha.

É claro minhas irmãs de República-“Las Muchachas” (Minha irmã, Gi, Ceci, Cê, Keilinha, Pati) por todos esses anos juntas, compartilhando todas as dificuldades de convivência, que me fizeram crescer como pessoa, amiga ...

E a todos aqueles, que por falta de espaço não posso citá-los, mas que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação profissional e principalmente pessoal.

---

---

## ÍNDICE

---

---

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	iv
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
1. GLÂNDULA PROSTÁTICA.....	2
1.1. Características da Glândula.....	2
1.2. Anomalias Prostáticas.....	3
1.3. Aspectos Epidemiológicos.....	4
1.4. Etapas do Diagnóstico Clínico.....	5
1.5. Mecanismos de Regulação Geral da Próstata.....	6
2. CALICREÍNAS.....	7
2.1. Definições.....	7
2.2. Evolução das Serino Proteases.....	7
2.3. Cininogênio e Cininas.....	8
2.4. Classificação das Calicreínas.....	9
2.4.1. Calicreína Plasmática.....	9
2.4.2. Calicreínas Teciduais.....	10
2.4.2.1. Nomenclatura Oficial das Calicreínas Teciduais.....	13
2.4.2.2. Organização do <i>Loco</i> Gênico das Calicreínas Teciduais.....	15
2.4.2.3. Associação das Calicreínas com Doenças Humanas.....	15
3. GENES KLK2 E KLK3 FRENTE AO CÂNCER DE PRÓSTATA.....	18
3.1. Antígeno Próstata Específico (PSA ou hK3).....	18
3.1.1. Caracterização.....	18
3.1.2. Atividades Enzimáticas e Ações Fisiológicas.....	20
3.2. hK2.....	21
3.2.1. Caracterização.....	21
3.2.2. Atividades Enzimáticas e Ações Fisiológicas.....	22
3.3. Formas Moleculares do PSA e da hK2.....	23
3.4. Separação das Calicreínas hK2 e PSA pela Glândula Prostática.....	24
3.5. Aplicações Clínicas.....	25

3.6.	Expressão Tecidual dos Genes KLK2 e KLK3.....	28
3.7.	Regulação Hormonal dos Genes KLK2 e KLK3.....	30

<b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>32</b>
--------------------------------	-----------

<b>CAPÍTULO: ANÁLISE MOLECULAR DO GENE KLK2 E SUAS IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA.....</b>	<b>52</b>
--	-----------

RESUMO.....	53
-------------	----

ABSTRACT.....	54
---------------	----

1. INTRODUÇÃO.....	55
--------------------	----

2. PACIENTES E MÉTODOS.....	58
-----------------------------	----

2.1. Obtenção das Amostras.....	58
---------------------------------	----

2.2. Extração de RNA total de Sangue Periférico e Tecido.....	59
---	----

2.3. RT-PCR Multiplex Semi-quantitativa no Tecido Prostático.....	59
---	----

2.3.1. Transcrição Reversa (RT-síntese do cDNA).....	59
--	----

2.3.2. PCR Multiplex Semi-quantitativa (co-amplificação do cDNA por PCR-reação em cadeia da polimerase).....	60
--	----

2.3.2.1. PCR Multiplex Semi-quantitativa para o RNAm do Gene KLK2.....	60
--	----

2.3.2.2. PCR Multiplex Semi-quantitativa para o RNAm do Gene KLK3.....	62
--	----

2.3.3. Densitometria Ótica.....	63
---------------------------------	----

2.4. RT-PCR <i>Semi-nested</i> em Sangue Periférico.....	63
--	----

2.4.1. Transcrição Reversa (RT-síntese do cDNA).....	63
--	----

2.4.2. PCR- <i>Out</i> (primeira amplificação por PCR).....	64
---	----

2.4.3. PCR <i>Semi-nested</i> (segunda amplificação por PCR).....	65
---	----

2.5. Análise Estatística dos Dados.....	66
---	----

3. RESULTADOS.....	68
--------------------	----

4. DISCUSSÃO.....	82
-------------------	----

5. REFERÊNCIAS.....	89
---------------------	----

<b>ANEXO 1: Estadiamento dos Adenocarcinomas da Próstata pela Classificação de Whitmore-Jewett e TNM 1992.....</b>	<b>96</b>
--	-----------

<b>ANEXO 2: Sistema de Gradação Histológica de Gleason.....</b>	<b>97</b>
---	-----------

<b>ANEXO 3: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU.....</b>	<b>98</b>
--	-----------

<b>ANEXO 4:</b> Termo de Consentimento.....	99
<b>ANEXO 5:</b> Protocolo de Extração de RNA total de Sangue e Tecido.....	100
<b>ANEXO 6:</b> Método para Cálculo da Precisão, Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo (+) e Valor Preditivo (-) de um teste.....	101

---



---

## LISTA DE FIGURAS

---



---

### INTRODUÇÃO GERAL

<b>Figura 1.:</b> Representação da anatomia zonal da próstata.....	2
<b>Figura 2.:</b> Esquema usado no rastreamento clínico do câncer de próstata.....	6
<b>Figura 3.:</b> Esquema representando a formação de cininas por ação das caliceínas plasmática e teciduais na molécula de cininogênio.....	8
<b>Figura 4.:</b> Distribuição dos genes das caliceínas teciduais na região q13.3-13.4 do cromossomo 19.....	16
<b>Figura 5.:</b> Representação esquemática da proteína pré-pró-PSA.....	19

### CAPÍTULO: ANÁLISE MOLECULAR DA EXPRESSÃO DOS GENES KLK2 E KLK3 E SUAS IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

<b>Figura 1.1:</b> Padrão eletroforético do RNA total extraído de tecido prostático.....	68
<b>Figura 1.2.:</b> Padrão eletroforético do RNA total extraído de sangue periférico.....	68
<b>Figura 1.3A.:</b> Otimização do número de ciclos de PCR para a realização da RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK2 em tecido prostático.....	69
<b>Figura 1.3B.:</b> Gráfico com a média das densidades óticas dos fragmentos amplificados para os genes KLK2 e $\beta$ -2 microglobulina versus número de ciclos de PCR.....	69
<b>Figura 1.4A:</b> Otimização do número de ciclos de PCR para a realização da RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK3 em tecido prostático.....	70
<b>Figura 1.4B.:</b> Gráfico com a média das densidades óticas dos fragmentos amplificados para os genes KLK3 e $\beta$ -2 microglobulina versus número de ciclos de PCR.....	70
<b>Figura 1.5A.:</b> RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK2 para duas regiões analisadas de tecido prostático de pacientes com câncer de próstata.....	71
<b>Figura 1.5B.:</b> RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK2 para duas regiões analisadas de tecido prostático de pacientes com hiperplasia prostática benigna.....	71

<b>Figura 1.6A.:</b> RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK3 para duas regiões analisadas de tecido prostático de pacientes com câncer de próstata.....	72
<b>Figura 1.6B.:</b> RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK3 para duas regiões analisadas de tecido prostático de pacientes com hiperplasia prostática benigna.....	72
<b>Figura 1.7A.:</b> Gráfico representando a distribuição dos indivíduos com tumor e com HPB quanto a abundância média relativa do KLK2.....	73
<b>Figura 1.7B.:</b> Gráfico representando a distribuição dos indivíduos com tumor e com HPB quanto a abundância média relativa do KLK3.....	74
<b>Figura 1.8.:</b> Gráfico da abundância relativa média do gene KLK2 versus a frequência de indivíduos classificados para o valor de corte de 0.6.....	75
<b>Figura 1.9.:</b> Otimização do número de ciclos a serem utilizados na PCR <i>Semi-nested</i> do gene KLK2 em sangue periférico.....	77
<b>Figura 1.10.:</b> PCR <i>Semi-nested</i> de sangue periférico do gene KLK2 para pacientes com câncer de próstata ou hiperplasia prostática benigna.....	77
<b>Figura 1.11.:</b> PCR de sangue periférico do gene constitutivo $\beta$ -2 microglobulina para indivíduos com câncer de próstata ou hiperplasia prostática benigna.....	78
<b>Figura 1.12.:</b> Representação gráfica da regressão logística com os resultados combinados obtidos no sangue e tecido para o KLK2 em pacientes com tumor ou com HPB.....	81
<b>Figura 1.13.:</b> Proposta para o rastreamento clínico e molecular do tumor prostático.....	88

---



---

## LISTA DE TABELAS

---



---

### INTRODUÇÃO GERAL

<b>Tabela 1.:</b> Porcentagem de homologia protéica entre os membros da família multigênica das calicreínas teciduais.....	12
<b>Tabela 2.:</b> Nomenclatura Oficial das calicreínas teciduais humanas.....	14
<b>Tabela 3.:</b> Resumo geral das principais funções das calicreínas associadas a tumores, suas aplicações em doenças e seus tecidos de maior expressão.....	17

### CAPÍTULO

<b>Tabela 1.1.:</b> Seqüência dos <i>primers</i> para os genes KLK2 e $\beta$ -2 microglobulina usados na RT-PCR multiplex Semi-quantitativa.....	61
<b>Tabela 1.2.:</b> Seqüência dos <i>primers</i> para o gene KLK3 usado na RT-PCR multiplex Semi-quantitativa.....	62
<b>Tabela 1.3.:</b> Seqüência dos <i>primers</i> da PCR <i>Semi-nested</i> para o KLK2.....	65
<b>Tabela 1.4.:</b> Risco relativo ao desenvolvimento do câncer de próstata relacionado a abundância média relativa do gene KLK2.....	75
<b>Tabela 1.5.:</b> Risco relativo ao desenvolvimento do câncer de próstata envolvendo regiões prostáticas que apresentam abundância relativa do KLK2 $\geq 0.6$ .....	76
<b>Tabela 1.6.:</b> Risco relativo ao desenvolvimento de câncer de próstata relacionado a presença do KLK2 em sangue periférico.....	79
<b>Tabela 1.7.:</b> Dados obtidos no tecido para os genes KLK2 e KLK3, no sangue para o gene KLK2 e PSA bioquímico, e o estadiamento clínico para cada paciente.....	80

---

---

## LISTA DE ABREVIACÕES

---

---

A	adenina
A 217 V	substituição de alanina por valina na posição 217
ACT	$\alpha$ -1 antiqumotripsina
ACTP	fosfatase ácida testicular
API	$\alpha$ -1 inibidor de protease
AR	receptor de andrógeno
AREs	elementos de resposta a andrógenos
Asp	ácido aspártico
$\beta$ -2 M	$\beta$ -2 microglobulina
CaP	câncer de próstata
C	citosina
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CPM	carboxipeptidase M
CPN	carboxipeptidase N
°C	graus Celsius
DEPC	dietil pirocarbonato
DHT	5- $\alpha$ dihidrotestosterona
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
DNTP(s)	desoxirribonucleotídeo trifosfato
E	especificidade
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
EMSP1	serino protease 1 de matriz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
F(-)	falso-negativo
F(+)	falso-positivo
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama
G	guanina

GnRH	hormônio de liberação da gonadotropina
hGK1	calicreína glandular humana 1
His	histidina
HK	cininogênio de alto peso molecular
hK1	calicreína renal/pancreática
hK2	calicreína glandular humana 1
hK3	antígeno próstata específico
HSCCE	enzima quimotriptica do estrato córneo humano
HSCTE	enzima triptica do estrato córneo humano
HUGO	<i>Human Genome Organization</i>
HPB	hiperplasia prostática benigna
hPRK	calicreína humana pancreática/renal
IGFB-P3	fator de crescimento como insulina ligado à proteína 3
IGFB-Ps	fatores de crescimento como insulina ligado à proteínas
IGFs	fatores de crescimento como insulina
KI	cininase I
KII	cininase II
Kb	quilobase
KDa	quilo Dalton
KLK1	gene que codifica para a calicreína renal/pancreática ou hK1
KLK2	gene que codifica para a calicreína glandular humana 1 ou hK2
KLK3	gene que codifica para o PSA ou hK3
KLKB1	calicreína plasmática ou Fator de Fletcher
KLK-L	atividade enzimática semelhante a calicreína
LK	cininogênio de baixo peso molecular
LH	hormônio luteinizante
min	minuto
µg	micrograma
mg	miligrama
MG	α-2 macroglobulina
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
µL	microlitro
µM	micromolar

mL	mililitro
mM	milimolar
MMLV-RT	<i>Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
NES1	gene 1 específico de células epiteliais normais
ng	nanograma
NIP	neoplasia intraepitelial prostática
nm	nanômetro
OR	<i>odds ratio</i>
P	precisão
pb	pares de bases
PCI	inibidor de proteína C
PCR	reação em cadeia da polimerase
PSA	antígeno próstata específico ou hK3
PRSS	serino protease
PRSSL	semelhante a serino protease
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase
RTU	ressecção transuretral prostática
S	sensibilidade
Ser	serina
Siglec 9	receptor transmembrânico da superfamília das imunoglobulinas
T	timina
TADG-14	gene 14 diferencialmente expresso associado a tumor
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA polimerase)
TBE	tris/borato/EDTA
TLSP	serino protease semelhante a tripsina
TNM	<i>Tumor-Node-Metastasis</i>
U	unidade
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
uPA	ativador plasminogênio tipo urocinase

UV	ultravioleta
V(-)	verdadeiramente negativo
V(+)	verdadeiramente positivo
VP(-)	valor preditivo negativo
VP(+)	valor preditivo positivo

---

---

INTRODUÇÃO  
GERAL

---

---

# 1. GLÂNDULA PROSTÁTICA

## 1.1. Características da Glândula

A próstata é um órgão fibromuscular e glandular, esférico, situada abaixo da bexiga (Smith 1979, Gosling *et al.* 1992). É composta por ácinos e um complexo sistema de ductos ramificados, cujos produtos de excreção são lançados dentro da uretra prostática (Rohr & Barthsch 1980). Consiste de uma cápsula fibrosa sob a qual estão fibras de músculo liso, o estroma prostático (composto de tecido conjuntivo e elástico) e as glândulas epiteliais (Tanangho, 1992). Participa na constituição do esperma com 30% do volume, sendo 70% oriundos das vesículas seminais e menos de 1% de espermatozóides (Lowsley 1912).

McNeil (1968, 1972, 1988) descreveu a anatomia zonal da próstata, utilizada atualmente, dividindo-a em zonas: fibromuscular anterior, que consiste basicamente de musculatura lisa; periférica, central e de transição, que contém, respectivamente, 70%, 20 a 25% e 5% das glândulas; e o esfíncter pré prostático, que separa as glândulas peri-uretrais da zona de transição evitando o refluxo do sêmem para a bexiga urinária (Figura 1)

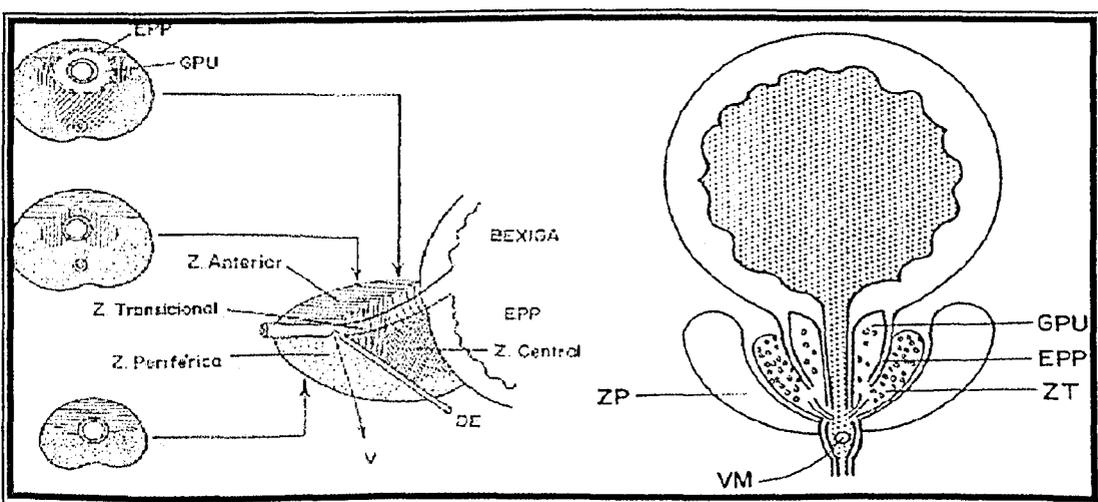


Figura 1: Anatomia Zonal da Próstata: EPP (Esfíncter pré Prostático), GPU (Glândulas peri Uretrais), ZT ( Zona de Transição), ZP (Zona Periférica) e VM (Vero Montanum).

Fonte: McNeil 1968, 1972, 1988.

## 1.2. Anomalias Prostáticas

Várias anomalias têm sido associadas à glândula prostática. Dentre elas, as principais são: adenocarcinoma, neoplasia intraepitelial prostática (NIP), hiperplasia prostática benigna (HPB), ou seja, aumento do número de células ao redor da uretra, e prostatite, inflamação prostática (Walsh & Worthington 1998).

Mais de 95% das neoplasias da próstata são representadas pelos adenocarcinomas. Os 5% restantes compreendem casos de sarcomas, carcinomas epidermóide e carcinomas de células transicionais (Byard & Mostofy 1972). Aproximadamente 70% dos adenocarcinomas são multifocais e ocorrem na zona periférica, menos de 5% na zona central e mais de 25% na zona de transição, denominados cânceres incidentais encontrados após ressecção transuretral da próstata (RTU) (Stamey & McNeal 1992, Srougi 1998, Bostwick 1999, Jarmulowicz 1999).

O câncer de próstata (CaP) é resultado de uma alteração no balanço entre proliferação e morte celular (Griffiths & Morton 1999). Nos estágios iniciais de seu desenvolvimento as células respondem aos mesmos fatores regulatórios (estágio hormônio-dependente), entretanto as taxas de crescimento celular são maiores do que as de morte (Griffiths & Morton 1999). Alterações neste processo regulatório, associadas a mutações genéticas, levam a graus de respostas anormais dos fatores de crescimento causando uma formação clonal autônoma de células malignas. Portanto, o crescimento passa a não responder mais ao controle hormonal por andrógenos (estágio hormônio-independente) (Griffiths & Morton 1999).

### 1.3. Aspectos Epidemiológicos

O câncer de próstata tem se manifestado como uma das causas mais comuns de doenças entre os homens mais velhos. É o segundo tipo de câncer mais diagnosticado nos Estados Unidos e no Brasil após o câncer de pele, não melanoma (Griffiths & Morton 1999, INCA 2002) e a segunda causa de morte em homens (Coffey 1993, Albright & Eeles 1995) depois do câncer de pulmão (Griffiths & Morton 1999).

A incidência de adenocarcinoma da próstata (Scott *et al.* 1969) em autópsias ou em amostras obtidas por cirurgias, mostra que o câncer da próstata é bastante raro antes dos 50 anos, mas sua incidência aumenta progressivamente com a idade sendo 4% entre 40 e 50 anos, 7% entre 50 e 59 anos, 12% entre 60 e 69 anos, de 18% a 41% entre 70 e 79 anos e 26% a 57% nos pacientes com idade maior ou igual a 80 anos.

Além disso, pacientes que tenham história familiar desse câncer nos parentes de primeiro (pai e irmãos) e segundo grau (avô e tios) chegam a ter 8 vezes mais chance de desenvolver a doença (Tulinius *et al.* 1992). Este relato e a maior prevalência destas neoplasias em certas áreas geográficas sugerem a influência de fatores genéticos associados a fatores ambientais no aparecimento do câncer de próstata.

A incidência do câncer de próstata e a taxa de mortalidade variam também de acordo com a distribuição geográfica e a raça dos pacientes. A incidência mais baixa foi encontrada no Oriente, chegando a 0,8 e 3,4 novos casos por 100.000 habitantes por ano, respectivamente, na China e no Japão (Buck 1995). E a mais alta foi encontrada na população afro-americana com 136 casos por 100.000 habitantes por ano (Buck 1995).

Além disso, a diagnóstico tardio desse tipo de câncer prende-se a fatores como a falta de informação da população leiga, a falta de campanha

dos órgãos de saúde e, principalmente, o preconceito em relação ao exame físico da próstata (toque digital).

#### **1.4. Etapas do Diagnóstico Clínico:**

O rastreamento de anomalias prostáticas é realizado principalmente por três etapas: o exame físico da próstata (toque retal), dosagem do antígeno próstata específico (PSA) e ultra-sonografia da próstata transretal (Figura 2).

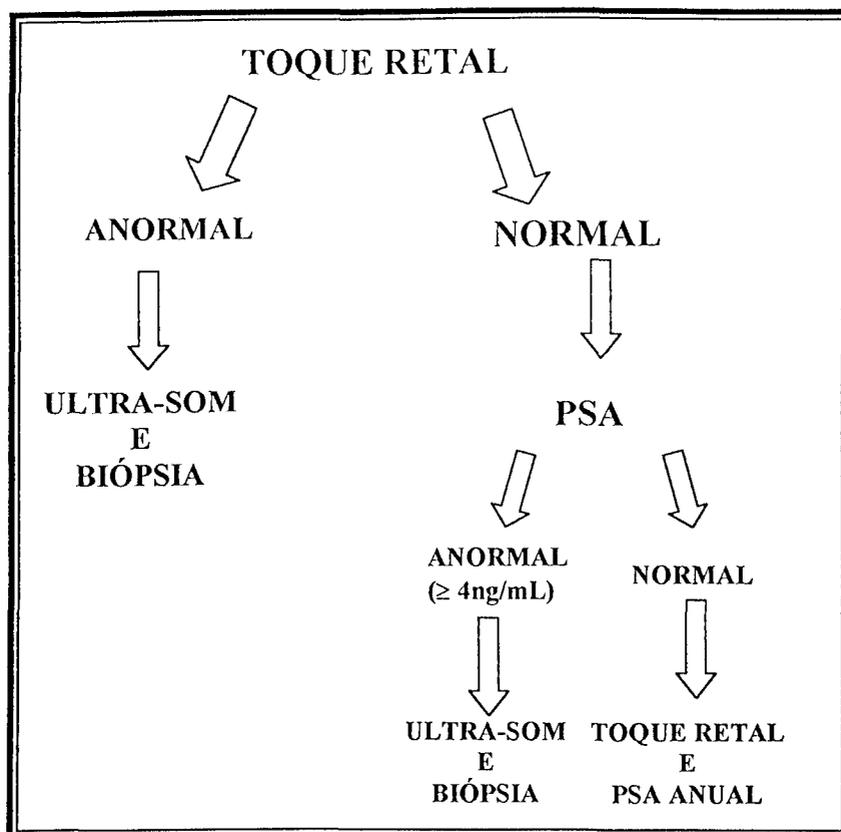
A *American Cancer Society*, juntamente com a *American Urology Association*, recomendam a realização anual do toque retal e da dosagem do PSA em todos homens a partir de 50 anos (Chamberlain *et al.* 1996, Selly *et al.* 1996). Nos grupos de alto risco, como em homens com história familiar desta neoplasia, as avaliações devem iniciar aos 40 anos de idade (Chamberlain *et al.* 1996, Selly *et al.* 1996).

Caso exista alguma suspeita de anomalia prostática é indicado que os pacientes sejam submetidos à biópsia.

O estadiamento clínico e o resultado histopatológico dos pacientes com câncer de próstata é de fundamental importância para o planejamento terapêutico. No estadiamento clínico utiliza-se a classificação de Whitmore-Jewett (Whitmore 1965, Jewett 1975, Hermanek & Sobin 1987) e também a classificação TNM 92 (Srougi 1998) (Anexo 1).

A análise histopatológica da neoplasia é baseada no sistema Gleason (1977). Este sistema valoriza o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático classificando os tumores em cinco graus, sendo grau 1 as lesões mais diferenciadas e as de grau 5 as mais indiferenciadas. Como o adenocarcinoma da próstata apresenta mais de um padrão histológico, o diagnóstico final na escala de Gleason é dado pela soma dos graus de padrão primário (área predominante) e do padrão secundário (áreas de menor

representatividade). Assim as neoplasias mais diferenciadas são classificadas como 2 (1+1) e as mais indiferenciadas grau 10 (5+5) (Anexo 2).



**Figura 2:** Esquema usado no rastreamento clínico do câncer de próstata.

Fonte: Walsh & Worthington 1998

### 1.5. Mecanismo de Regulação Geral da Próstata

O hipotálamo produz o hormônio de liberação da gonadotropina (GnRH) que estimula a hipófise anterior a secretar o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH). O FSH estimula a espermatogênese e o LH estimula no testículo as células de Leydig a produzir o hormônio masculino, testosterona (Guyton & Hall 1997, Walsh & Worthington 1998, Griffiths & Morton 1999). Após a liberação da testosterona na corrente sanguínea, ela entra nas células por difusão passiva e é transformada em  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) pela ação da  $5\alpha$ -redutase

(Walsh & Worthington 1998, Griffiths & Morton 1999). A DHT complexa-se ao receptor de andrógeno (AR) e este complexo liga-se a sítios específicos da molécula de DNA, participando na regulação da transcrição de genes responsáveis pela homeostase da glândula (Walsh & Worthington 1998).

## 2. CALICREÍNAS

### 2.1. Definições:

As calicreínas são um grupo de serino proteases encontradas em diversos tecidos e fluídos biológicos (revisadas por Bhoola *et al.* 1992, Yousef & Diamandis 2001). O termo calicreína foi introduzido na década de 30 por Kraut *et al.* (1930) e Werle (1934) (*apud* Yousef & Diamandis 2001) os quais acharam altos níveis da proteína no pâncreas (em grego, *Kallikreas*). Esta designação é usada para definir enzimas que atuam sobre uma molécula precursora, o cininogênio, para liberar um peptídeo bioativo, a cinina (Clements 1989, Bhoola *et al.* 1992, Yousef & Diamandis 2001).

Os termos cininase e cininogenase são usados, respectivamente, para nomear enzimas que inativam cininas e para descrever a ação das calicreínas na transformação do cininogênio (Yousef & Diamandis 2001).

### 2.2. Evolução das Serino Proteases

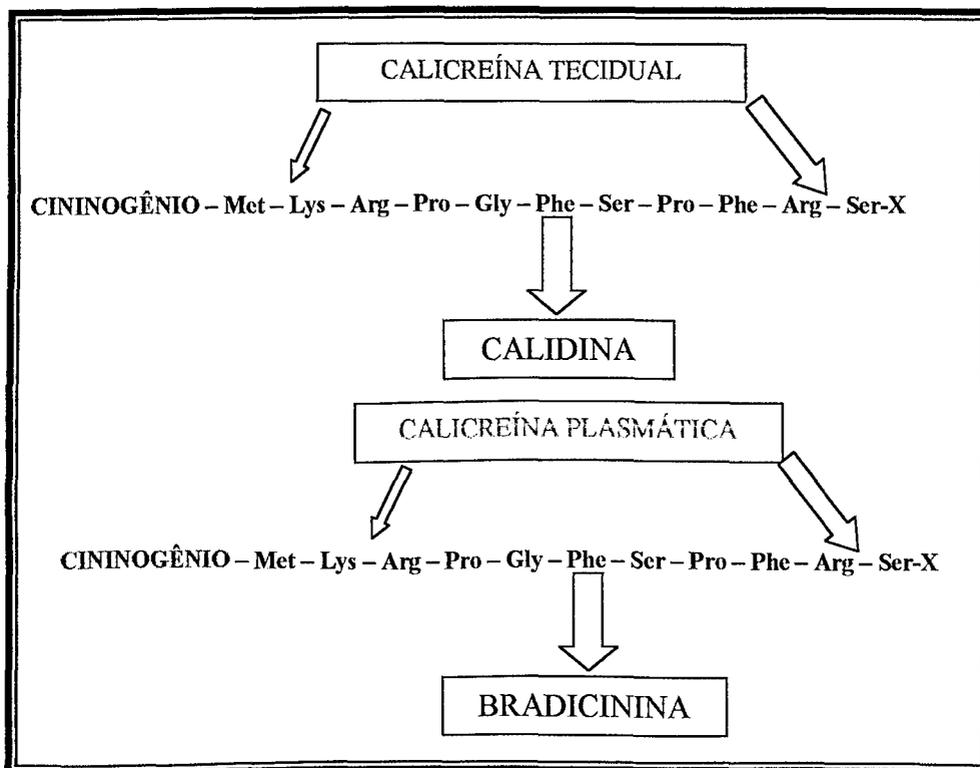
As serino proteases são divididas dentro de duas principais famílias evolutivas, as serino proteases semelhante as tripsinas e as pró-proteínas convertases semelhante as subtilisinas, as quais supostamente evoluíram por convergência (Creighton 1993 *apud* Yousef & Diamandis 2001). Acredita-se que as serino proteases tipo tripsinas evoluíram de um gene ancestral comum que no curso da evolução duplicou-se dando origem a outros genes, e que

gradualmente estes genes sofreram mutações originando as proteases relacionadas atualmente (Yousef & Diamandis 2001).

### 2.3. Cininogênio e Cininas

Três tipos de cininogênios têm sido descritos em mamíferos (Habermann 1963 *apud* Bhoola *et al.* 1992, Jacobsen 1966, Suzuki *et al.* 1967): o HK (cininogênio de alto peso molecular), forma predominante no sangue; o LK (cininogênio de baixo peso molecular), encontrado no sangue e em vários tecidos; e cininogênio-T (proteína que ocorre apenas em ratos).

De maneira geral é aceito que as calicreínas teciduais (exceto as de ratos e camundongos) formem a calidina (Lys-bradicinina) a partir do LK, e a calicreína plasmática forme a bradicinina a partir do HK (Müller-Esterl 1989) (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema representando a formação de cininas por ação das calicreínas plasmática e teciduais na molécula de cininogênio. A letra X representa a cadeia leve do cininogênio na região COOH-terminal.

Fonte: Bhoola *et al.* 1992.

As cininas são peptídeos vasoativos que influenciam em numerosos processos biológicos (Bhoola *et al.* 1992). São hipotensivas, aumentam a permeabilidade vascular, participam da contração do músculo liso da árvore broncopulmonar, intestino e útero, e aumentam a mobilidade dos espermatozoides. Nas células promovem o transporte de glucose e cloreto, liberam neurotransmissores, ativam a fosfolipase A2, e estimulam os osteoclastos.

As diferentes cininas, quando produzidas, são inativadas imediatamente por peptidases, cininases, encontradas no sangue e tecidos (Erdös 1990 *apud* Bhoola *et al.* 1992). As duas principais famílias de cininases são a cininase I (KI), composta pela carboxipeptidase N (CPN) e pela carboxipeptidase M (CPM); e a cininase II (KII), composta pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) e pela endopeptidase 24.11 (neprilisina).

## **2.4. Classificação das Calicreínas**

As calicreínas são divididas em dois grupos principais (Fiedler 1979, Movat 1979), pois diferem quanto ao seu peso molecular, ponto isoelétrico, substrato específico, características imunológicas, tipos de cininas liberadas e importância funcional.

### **2.4.1. Calicreína Plasmática**

A calicreína plasmática ou fator de Fletcher (símbolo oficial-KLKB1) é codificada por um único gene localizado no cromossomo 4, na região 4q35 (Yu *et al.* 1998). Tal gene é composto por 15 exons e codifica para uma proteína que atua no cininogênio de alto peso molecular liberando a bradicinina.

Tal caliceína tem funções na coagulação sanguínea, regulação do tônus vascular e em reações inflamatórias (Bhoola *et al.* 1992).

#### 2.4.2. Caliceínas Teciduais

As caliceínas teciduais compõem uma família multigênica que apresentam características gênicas e protéicas similares (Tabela 1) (Diamandis *et al.* 2000a, Yousef & Diamandis 2001). O termo caliceína tecidual não se restringe apenas a descrição de enzimas capazes de liberar cininas a partir do cininogênio, pois apenas as enzimas hK1 (caliceína renal/pancreática) e hK2 (caliceína glandular humana 1) exibem esta habilidade eficientemente ou em menores proporções, respectivamente (Frey *et al.* 1950 *apud* Bhoola *et al.* 1992, Deperthes *et al.* 1997, Charlesworth *et al.* 1999).

O termo caliceína tecidual engloba genes que apresentam as seguintes similaridades (Diamandis *et al.* 2000a): são colocalizados na mesma região cromossômica (cromossomo 19, região q 13.3-13.4) em um arranjo linear; codificam para serino proteases com uma tríade catalítica conservada (histidina, aspartato e serina); apresentam 5 exons codificantes (alguns membros desta família apresentam um ou mais exons não traduzidos) e 4 íntrons; as fases intrônicas, localização do íntron dentro do exon, são completamente conservadas sendo, nesta ordem, íntron fase I (ocorre depois do primeiro nucleotídeo do códon), íntron fase II (ocorre depois do segundo nucleotídeo do códon) e íntron fase 0 (ocorre entre códons); possuem seqüências homólogas, no DNA (ácido desoxirribonucléico) e na proteína, que variam de 30% a 80% de homologia; e na sua maioria são regulados por hormônios esteróides.

A família de genes das caliceínas teciduais humanas foi descoberta na década de 80, sendo que esta era composta por apenas três genes, o KLK1

(codifica a hK1 ou calicreína pancreática/renal), o KLK2 (codifica a hK2 ou calicreína glandular humana 1) e o KLK3 (codifica a hK3 ou PSA) (Evans *et al.* 1988, Riegman *et al.* 1989a, Qin *et al.* 1991, Richards *et al.* 1991, Riegman *et al.* 1992). Posteriormente, quinze novos genes desta família foram descobertos (Diamandis *et al.* 2000a, Yousef *et al.* 2000, Yousef & Diamandis 2001).

As calicreínas teciduais foram isoladas e identificadas em vários tecidos (Werle & Korsten 1938 e Frey *et al.* 1950 *apud* Mahabeer & Bhoola 2000, Gan *et al.* 2000, Harvey *et al.* 2000), sendo que as suas atividades enzimáticas e imunoreações foram demonstradas em glândula submandibular (Mason *et al.* 1983, Ashley & MacDonald 1985a, 1985b), pâncreas (Ashley & MacDonald 1985b, Wolf *et al.* 1998), rim (Figueroa *et al.* 1988, Cumming *et al.* 1994, Naicker *et al.* 1999), baço (Chao *et al.* 1984, Wolf *et al.* 1998), glândula pituitária (Jones *et al.* 1992), placenta (Hermann *et al.* 1996), glândulas salivares (Hofmann *et al.* 1983, Jenzano *et al.* 1992, Wolf *et al.* 1998), hipotálamo (Snyman *et al.* 1994), neutrófilo (Figueroa & Bhoola 1989, Naidoo *et al.* 1999), e cérebro (Chao *et al.* 1983, 1987, Raidoo *et al.* 1996, Raidoo & Bhoola 1998).

**Tabela 1:** Porcentagem de homologia protéica entre os membros da família multigênica das caliceínas teciduais humanas.

	hK1	hK2	hK3	hK4	hK5	hK6	hK7	hK8	hK9	hK10	hK11	hK12	hK13	hK14
hK1	100	67	62	34	31	37	37	36	35	31	36	27	37	39
hK2		100	77	34	33	41	38	38	36	33	36	27	41	40
hK3			100	34	33	36	37	36	34	31	34	26	40	38
hK4				100	45	36	43	35	31	29	35	25	35	40
hK5					100	36	38	38	38	33	39	25	38	39
hK6						100	38	42	36	34	38	32	46	45
hK7							100	40	33	36	36	28	38	41
hK8								100	42	40	42	33	41	44
hK9									100	33	49	29	37	40
hK10										100	35	31	34	35
hK11											100	30	41	40
hK12												100	31	30
hK13													100	43
hK14														100

Fonte: Harvey *et al.* 2000.

#### 2.4.2.1. Nomenclatura Oficial das Calicreínas Teciduais

A primeira nomenclatura proposta para as calicreínas teciduais de roedores e outros animais foi sugerida por Berg e colaboradores em 1992. Posteriormente, a *Human Genome Organization* (HUGO) propôs um guia para a nomenclatura dos genes humanos, alguns membros das calicreínas foram classificadas junto com outras serino proteases usando-se o prefixo PRSS (serino protease).

A construção do mapa detalhado do *loco* das calicreínas teciduais humanas (Diamandis *et al.* 2000a, Yousef & Diamandis 2000, Yousef *et al.* 2000) permitiu uma designação mais racional para os símbolos oficiais dos genes desta família gerando um consenso para a melhor forma de nomenclatura (Tabela 2) (Diamandis *et al.* 2000b).

**Tabela 2:** Nomenclatura oficial das calicreínas teciduais humanas

Símbolo Oficial do Gene <sup>a,b</sup>	Símbolo comum do Gene	Símbolo Oficial da Proteína	Outros nomes/símbolos para a proteína
KLK1	KLK1	hK1	Calicreína pancreática/renal, hPRK
KLK3	KLK3	hK3	Antígeno próstata específico, PSA
KLK2	KLK2	hK2	Calicreína Glandular Humana 1, hGK1
KLK4	PRSS17, KLK-L1, KLK4	hK4	Prostase, proteína KLK-L1, EMSP1
KLK5	KLK-L2	hK5	Proteína KLK-L2, HSCTE
KLK6	PRSS9	hK6	Zime, protease M, neurosin
KLK7	PRSS6	hK7	HSCCE
KLK8	PRSS19	hK8	Neuropsin, ovasin, TADG-14
KLK9	KLK-L3	hK9	Proteína KLK-L3
KLK10	PRSSL1, NES1	hK10	Proteína NES1
KLK11	PRSS20	hK11	TLSP/hipostasin
KLK12	KLK-L5	hK12	Proteína KLK-L5
KLK13	KLK-L4	hK13	Proteína KLK-L4
KLK14	KLK-L6	hK14	Proteína KLK-L6
KLK15	-----	hK15	-----

<sup>a</sup> Os genes estão representados na ordem que estão no cromossomo 19q 13.3-13.4 do centrômero para o telômero.

<sup>b</sup> O nome das siglas estão a seguir: hPRK (calicreína humana pancreática/renal), hGK1 (calicreína glandular humana 1), KLK-L (atividade enzimática semelhante a calicreína), EMSP1 (serino proteinase 1 de matriz), HSCTE (enzima trípica do estrato córneo humano), HSCCE (enzima quimotriptica do estrato córneo humano), TADG-14 (gene-14 diferencialmente expresso associado a tumor), NES1 (gene 1 específico de células epiteliais normais), TLSP (serino protease semelhante a tripsina), PRSS (serino protease), PRSSL (semelhante a serino protease).

Fonte: Diamandis *et al.* 2000 b, Yousef *et al.* 2000.

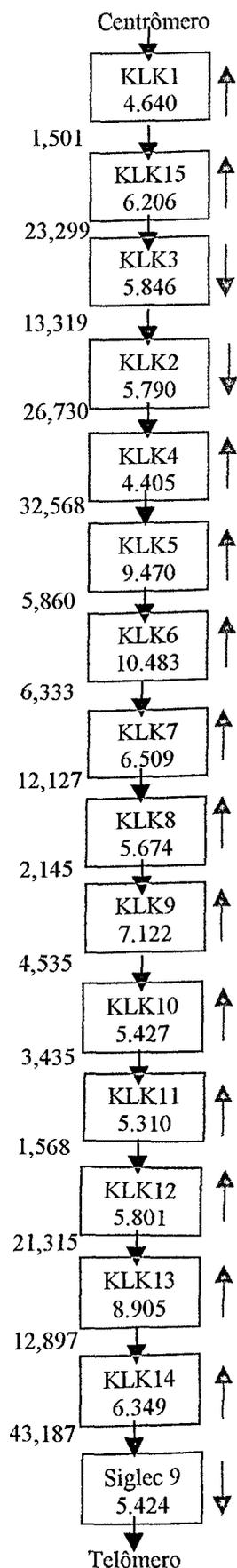
#### 2.4.2.2. Organização do *Loco* Gênico das Calicreínas Teciduais

A disponibilidade das seqüências genômicas ao redor da região 19q13.3-13.4, originadas pelo Projeto Genoma Humano, permitiu uma correta localização dos quinze genes da família das calicreínas teciduais humanas com uma precisão de mais ou menos 1 nucleotídeo (Figura 4) (Yousef *et al.* 2000).

O gene vizinho mais próximo do KLK1, região centromérica, é o gene da fosfatase ácida testicular (ACTP-GenBank acesso nº AF321918) não considerado como calicreína, e o mais próximo do KLK14, região telomérica, é o gene Siglec 9 (receptor transmembrânico da superfamília das imunoglobulinas), que também não é uma calicreína (Foussias G *et al.* 2000 *apud* Yousef & Diamandis 2001).

#### 2.4.2.3. Associação das Calicreínas com doenças humanas

As calicreínas teciduais vêm sendo estudadas e associadas com os mais variados tipos de doenças humanas. A tabela 3 resume as principais funções das calicreínas associadas a tumores, suas implicações em doenças, e seu tecido de maior expressão (Diamandis *et al.* 2000a, Yousef & Diamadis 2001).



**Figura 4:** Representação esquemática da distribuição da família multigênica das caliceínas teciduais humanas, região 19q 13.3-13.4, em aproximadamente 300 quilobase (kb). A direção da transcrição de cada gene está ilustrada pela seta rosa. As caixas representam os genes com seus respectivos nomes e comprimento genômico em pares de bases (pb). A distância entre os genes está descrita entre as caixas em pb. A figura não está representada em escala de tamanho.

Fonte: Yousef *et al.* 2000.

**Tabela 3:** Resumo geral das principais funções das calicreínas teciduais associadas a tumores, suas aplicações em doenças e seus tecidos de maior expressão.

Gene	Tecido (s) de maior expressão	Possíveis Funções em doenças tumorais	Doenças de maneira geral
KLK1	Pâncreas, rim, glândulas salivares		Inflamações, pancreatitis, metabolismo ósseo, doenças cardíacas, doenças renais, câncer.
KLK2	Próstata	Gene coexpresso com o KLK3 em tecidos e secreções de mama, superexpresso em tumor de próstata, ativador da pro-forma do hK3, regulação de fatores de crescimento.	Câncer de próstata e de mama.
KLK3	Próstata	Indução de apoptose, redução de proliferação celular, redução do potencial tumorigênico de linhas celulares tumorais, regulação negativa em câncer de mama e próstata, inibidor de angiogênese, anticarcinogênico, regulação de fatores de crescimento.	Câncer de próstata e de mama.
KLK4	Próstata.	Hormonalmente regulado e expresso em tecido de mama e próstata, funções em metástase óssea regulação de fatores de crescimento.	Câncer de ovário.
KLK5	Mama, cérebro, testículo, pele		Câncer de ovário.
KLK6	Sistema nervoso central, rim, útero	Regulado negativamente em tecido de mama e principalmente em focos metastáticos.	Câncer de mama, câncer de ovário, Doença de Alzheimer.
KLK7	Pele, sistema nervoso central, rim, mama	Superexpresso em carcinomas ovarianos.	Queratinização patológica, psoríase, câncer ovariano.
KLK8	Sistema nervoso central, pele, ovário	Superexpresso em carcinomas ovarianos.	Injúrias no sistema nervoso central, epilepsia, câncer ovariano.
KLK9	Timo, testículo, traquéia, sistema nervoso central		
KLK10	Mama, ovário, testículo, próstata	Regulado negativamente em câncer, anula a habilidade de células tumorais crescerem de maneira independente de ancoragem, diminui a proliferação celular, supressor de tumor	Câncer de mama, câncer de próstata.
KLK11	Cérebro, pele, glândulas salivares, estômago, útero, pulmão, timo, próstata, baço, fígado, intestino, traquéia		
KLK12	Glândula salivar, estômago, útero, taquéia, próstata, timo, pulmão, colo, cérebro, mama, tireóide.		Câncer de mama.
KLK13	Mama, próstata, glândulas salivares, testículo		Câncer de mama.
KLK14	Sistema nervoso central		Câncer de mama.
KLK15	Tireóide, glândulas salivares, próstata		Câncer de próstata.

Fonte: Diamandis *et al.* 2000a. Yousef & Diamandis 2001.

### 3. Genes KLK2 e KLK3 frente ao Câncer de Próstata

#### 3.1. Antígeno Próstata Específico (PSA ou hK3)

##### 3.1.1. Caracterização

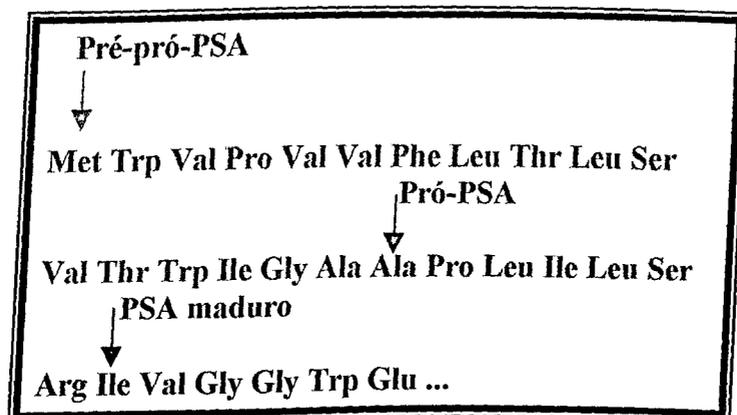
O PSA foi caracterizado como uma glicoproteína de 30 a 36 KDa, em 1979, em tecido prostático normal, hiperplásico e tumoral, líquido seminal, e em sangue de pacientes com câncer de próstata (Wang *et al.* 1979, Wang *et al.* 1981). Na metade da década de 80 revelou-se que o PSA possuía uma tríade catalítica conservada com histidina (His), aspartato (Asp) e serina (Ser), sendo esta descoberta a responsável pela inclusão do PSA na família das serino proteases (Ban *et al.* 1984).

A proteína é secretada no lúmen dos ductos prostáticos e está presente em altos níveis no líquido seminal (Wang *et al.* 1979), contudo não é exclusiva da próstata (Diamandis & Yu 1997). Quantidades mínimas extra prostáticas foram encontradas (Diamandis & Yu 1995, Diamandis & Yu 1997, Diamandis 1998) em tecidos de mama normal e tumoral (Diamandis *et al.* 1996a, Zarghami & Diamandis 1996, Howarth *et al.* 1997), leite de lactantes, fluidos de mama com cisto (Yu & Diamandis 1995a, Diamandis *et al.* 1996b), fluido amniótico (Yu & Diamandis 1995b), fluido aspirado de mamilo (Sauter *et al.* 1996) e em vários outros tipos de tumores (Levesque *et al.* 1996). A interferência do PSA extra prostático na análise clínica do câncer de próstata, análises sorológicas e imunohistoquímicas, parece ser mínima (Rittenhouse *et al.* 1998).

A elevação do PSA no soro de pacientes com câncer de próstata não se deve a mutações no gene, pois não foi encontrada nenhuma mutação em tecido prostático tumoral quando comparado com o normal (Baff *et al.* 1996). Entretanto, foram encontrados nove tipos diferentes de formas variantes de

transcritos do gene (Riegman *et al.* 1988, Riegman *et al.* 1989b, Heuze *et al.* 1999, Tanaka *et al.* 2000). Desses variantes, cinco foram estudados e resultam de: sítio acceptor de *splicing* alternativo e retenção de parte do íntron 3, gerando proteínas truncadas (Riegman *et al.* 1988, Riegman *et al.* 1989b); *splicing* alternativo do íntron 4 gerando uma pré-pró-PSA variante (Heuze *et al.* 1999); e uma deleção no exon 3 resultando na perda de 44 aminoácidos (Tanaka *et al.* 2000).

O RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) do gene KLK3 é traduzido em uma pré-pró-proteína de 261 aminoácidos, uma seqüência hidrofílica sinal de 17 aminoácidos (pré-pró-região) e um pró-peptídeo de 7 aminoácidos, que deve ser processada resultando na proteína madura de 237 aminoácidos (Figura 5) (Lundwall & Lilja 1987).



**Figura 5:** Representação esquemática da proteína pré-pró-PSA. As respectivas setas e cores indicam o início e término da seqüência de aminoácidos que compõem o pré-pró-PSA.

Fonte: Kumar *et al.* 1997.

### 3.1.2. Atividades Enzimáticas e Ações Fisiológicas

O antígeno próstata específico tem funções substrato específicas como a quimotripsina (Ban *et al.* 1984, Watt *et al.* 1986, Akiyama *et al.* 1987, Christensson *et al.* 1990). Esta função difere das calicreínas de maneira geral, elas têm atividade como tripsina, por uma substituição de Ser por Asp na posição 183. O resíduo de Ser, nesta posição, é essencial para coordenar o sítio catalítico da enzima, pois direciona a especificidade enzimática como tripsina.

Os maiores focos do estudo das funções do PSA são no líquido seminal, devido a sua presença em altas concentrações (Wang *et al.* 1979). Acredita-se que o PSA tenha funções na liquefação do coágulo seminal após a ejaculação, pois participa da rápida hidrólise da seminogelina I, II e fibronectina, produzidas pela vesícula seminal, e desta forma, acentua a mobilidade dos espermatozoides (Lilja 1987, Lilja *et al.* 1989).

O PSA tem mostrado ser capaz de clivar e inativar o fator de crescimento semelhante a insulina ligado a proteína 3 (IGFBP-3) (Cohen *et al.* 1992). A inativação do IGFBP-3, particularmente no local de metástase prostática, poderia aumentar a disponibilidade de fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs) altamente mitogênicos e desta forma, estimular o crescimento do tumor. Em contraste, outros trabalhos apontam o PSA como uma molécula inibidora de crescimento celular, anticarcinogênica, indutora de apoptose, e portanto, uma molécula supressora de tumor (Diamandis *et al.* 2000a, Diamandis 2000).

## 3.2. hK2

### 3.2.1. Caracterização

Schedlich e colaboradores (1987) isolaram o DNA genômico do KLK2 de 5,2 Kb e determinaram que o gene codifica para uma pré-pró-proteína hK2 de 261 aminoácidos. A proteína madura é de 237 aminoácidos e tem 66% e 80% de homologia com a hK1 e a hK3, respectivamente.

Assim como o PSA, a hK2 não é apenas encontrada no tecido prostático, estando presente também em mama, tireóide, glândulas salivares e diversos fluídos biológicos (Catalona *et al.* 1991, Lövgren *et al.* 1999a, Magklara *et al.* 1999a, Black *et al.* 2000).

O KLK2 possui duas mutações, uma encontrada no DNA genômico (Herrala *et al.* 1997), e a outra em linhas celulares prostáticas tumorais (Young *et al.* 1992). A mutação encontrada no DNA genômico é uma mutação de ponto, troca de citosina (C) por timina (T) na posição 792, que resulta em uma proteína inativa. Contudo, a associação dessas mutações com o câncer de próstata é desconhecida.

Foram encontradas seis formas variantes de transcritos do KLK2 (Schedlich *et al.* 1987, Riegman *et al.* 1991a, Liu *et al.* 1999). Dessas formas, duas foram mais estudadas e são resultados de: um sítio doador de *splicing* no íntron 4, resultando em um transcrito com 37 nucleotídeos adicionais (Riegman *et al.* 1991a), e de uma deleção de 13 nucleotídeos entre os exons 3 e 4 (Liu *et al.* 1999). Os dois tipos de transcritos resultam em proteínas truncadas (Riegman *et al.* 1991a, Liu *et al.* 1999).

### 3.2.2. Atividades Enzimáticas e Ações Fisiológicas

A primeira idéia da atividade da hK2 foi obtida a partir da sua purificação do líquido seminal por cromatografia (Deperthes *et al.* 1996, Frenette *et al.* 1997a). A hK2 tem atividade enzimática semelhante a tripsina, e apesar desta atividade comum com a hK1, elas possuem especificidades distintas para substratos específicos derivados de serpinas (Bourgeois *et al.* 1997). Além dessas atividades, a hK2 exibe baixa atividade de cininogenase, sendo esta 1000 vezes menor que a da hK1 (Deperthes *et al.* 1997), e é incapaz de clivar peptídeos de angiotensina 1 a 14, não exibindo atividade semelhante a quimotripsina (Mikolajczyk *et al.* 1998).

Uma mutação na hK2, gerada pela substituição de alanina por valina (A 217 V), próxima ao local de ligação ao substrato reduz a eficiência da atividade catalítica da enzima (Vihinen 1994, Bridon & Dowell 1995). Um estudo *in vitro*, desta mutação, mostra que a hK2 tem capacidade de autoativação, contudo, quando a enzima é mutante (A 217 V) esta capacidade é perdida (Mikolajczyk *et al.* 1997a).

Assim como o PSA, a hK2 é capaz de clivar seminogelina I, II e fibronectina, só que em resíduos de arginina semelhante à tripsina, sendo esta clivagem mais rápida que a do PSA e é em diferentes sítios (Deperthes *et al.* 1996). Também tem sido demonstrado que esta é capaz de clivar, mais rapidamente que o PSA, os IGFBNs, sugerindo funções similares àquelas sugeridas para o PSA (Dube & Tremblay 1997). Além disso, a hK2 tem 20.000 vezes mais atividade de protease que o PSA (Mikolajczyk *et al.* 1997b, 1998).

É possível que a hK2 exiba ação fisiológica sinérgica na regulação da ativação do PSA, pois ela é capaz *in vitro* de ativar a pró-forma do PSA (244 resíduos de aminoácidos), transformando-o em PSA maduro (237 resíduos de aminoácidos) (Kumar *et al.* 1997, Lövgren *et al.* 1997, Takayama *et al.* 1997).

O ativador plasminogênio tipo urocinase (uPA) é associado com a invasão do câncer de próstata e metástase (Achbarou *et al.* 1994, Lyon *et al.* 1995). Esta proteína é sintetizada na forma zimogênica e requer sua ativação por outras enzimas para adquirir suas funções biológicas. Uma vez ativado, o uPA atua na geração de plasmina a partir do plasminogênio, e esta está relacionada com ativação de fatores de crescimento (Achbarou *et al.* 1994, Lyon *et al.* 1995). A hK2 ativa *in vitro* a forma zimogênica do uPA, sugerindo ter influência na cascata proteolítica extracelular das células prostáticas tumorais (Frenette *et al.* 1997b, Takayama *et al.* 1997).

Foi encontrado que quantidades normais de zinco na próstata inibem reversivelmente a atividade da hK2, contudo esta regulação pode ser prejudicada por alterações tumorais (Lövgren *et al.* 1999b).

### 3.3. Formas Moleculares do PSA e da hK2

Várias formas moleculares do PSA e da hK2 têm sido identificadas em tecido prostático, fluidos biológicos e em sistemas de expressão celular recombinantes (McCormack *et al.* 1995, Rittenhouse *et al.* 1998, Lilja 2001): a pró-forma (zimogênica ou inativa), a madura, a degradada e a complexada com inibidores de proteases.

Tanto o PSA como a hK2 formam complexos com os membros da família de inibidores serpinas ( $\alpha_1$ -antiquimotripsina-ACT, o  $\alpha_1$ -inibidor de protease-API,  $\alpha_2$ -antiplasmina, antitrombina III, e o inibidor de proteína C-PCI) e com a  $\alpha_2$ -macroglobulina (MG) (Rittenhouse *et al.* 1998).

No tecido prostático, ambos PSA e hK2 são quase que inteiramente livres, contudo diferem na forma livre predominante, madura para o PSA e zimogênica para a hK2 (Rittenhouse *et al.* 1998). No líquido seminal o PSA livre compreende de 50% a 70% da sua forma enzimática intacta ativa e 30%

a 50% na forma clivada inativa (Zhang *et al.* 1995). Já a hK2 encontra-se complexada com o PCI em quantidades quase que iguais à forma livre (Deperthes *et al.* 1995). No sangue, o PSA complexado com ACT representa 80% do PSA sorológico total e as formas clivadas representam uma pequena porcentagem (Mikolajczyk *et al.* 1997b). Apenas a forma complexada com ACT é encontrada no sangue, entretanto a complexada com PCI é ausente (Rittenhouse *et al.* 1998).

Os complexos formados com a MG não são detectados pelos métodos de imunoenaios comerciais, pois o seu tamanho encobre epítomos do PSA ou da hK2 (Lilja 2001). Porém, os baixos níveis desse complexo *in vivo* se deve às rápidas taxas de sua eliminação através de receptores específicos do sistema hepático (Mast *et al.* 1991 *apud* Rittenhouse *et al.* 1998). O MG tem maior eficiência em se complexar com o PSA na corrente sanguínea do que o ACT (Mikolajczyk *et al.* 1997b).

O PSA livre no sangue pode ser resultado de três formas: o clivado ou degradado, o não clivado mas desnaturado, e o zimogênico ou pró-PSA (Rittenhouse *et al.* 1998). O PSA livre é a forma inativa, que não pode complexar-se, e compreende de 5% a 45% do PSA em circulação (Lilja 2001), sendo que 30% deste PSA livre é representado pelo PSA degradado (Chen *et al.* 1997).

### **3.4. Separação das caliceínas hK2 e PSA pela glândula prostática**

A separação das caliceínas hK2 e PSA pela glândula prostática é rigorosa, com um milhão de vezes mais PSA e dez mil vezes mais alta concentração da hK2 no tecido prostático e líquido seminal que na circulação sanguínea (Deperthes *et al.* 1995, Finlay *et al.* 1998). A próstata saudável tem várias barreiras físicas que quase completamente previnem a liberação do PSA e da hK2 para o sangue, contudo quando estas barreiras são rompidas

por traumas físicos ou doenças (HPB, NIP, prostatite, transformações malignas e outras) essas caliceínas são liberadas em maiores quantidades do compartimento glandular para a corrente sangüínea (Rittenhouse *et al.* 1998). A elevação delas no sangue é forte indicio de doenças prostáticas ou traumas (Rittenhouse *et al.* 1998).

Tanto o PSA quanto a hK2 são traduzidas nas formas de pré-pró-proteínas (Lundwall & Lilja 1987, Schedlich *et al.* 1987). O pré-pró-peptídeo PSA tem um peptídeo sinal (pré-peptídeo de 17 aminoácidos), este pré-peptídeo direciona a proteína para atravessar a membrana do retículo endoplasmático, onde este é clivado gerando a pró-proteína PSA (McCormack *et al.* 1995). O pró-PSA é transportado por meio de vesículas até a membrana plasmática por onde é secretado para o interior dos ductos prostáticos, neste momento o pró-peptídeo é retirado e o PSA encontra-se na forma ativa (McCormack *et al.* 1995). O PSA que cai na corrente sangüínea, quando na forma inativa é retirado de circulação pelos rins, e quando está na forma ativa, complexado com ACT, é retirado por receptores de serpinas no fígado e por receptores no retículo endotelial celular, quando complexado com MG (Travis & Salvesen 1983, Pizzo *et al.* 1988 *apud* McCormack *et al.* 1995).

É possível que a hK2, levando-se em consideração que é sintetizada em uma pré-pró-proteína, passe pelos mesmos caminhos descritos acima para o PSA.

### 3.5. Aplicações Clínicas

O teste do PSA sangüíneo ganhou enormes aplicações clínicas devido sua capacidade em auxiliar na detecção precoce do câncer de próstata (Large *et al.* 1989, Catalona *et al.* 1991, 1994, Oesterling 1991). As medidas sorológicas do PSA, aplicadas ao diagnóstico de pacientes com câncer de

próstata, foram estabelecidas precocemente na década de 80 e aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o monitoramento em 1986 (Rittenhouse *et al.* 1998).

A detecção do tumor prostático pelo PSA permite encontrar muitos homens com câncer de próstata confinado ao órgão e potencialmente curáveis. Entretanto, alguns homens com apenas hiperplasia prostática benigna seriam submetidos a uma biópsia desnecessária. Os valores de PSA sorológico entre 4 e 10 ng/mL estão em uma faixa de medida crítica pois detectam falso-positivos (Rittenhouse *et al.* 1998). Além disso, valores abaixo de 4ng/mL não asseguram a ausência do tumor, pois 22% dos pacientes com tumor localizado apresentam valores mais baixos do que este (Catalona *et al.* 1997). O teste do PSA, com o valor de corte acima de 4 ng/mL, para indicação de biópsia da próstata, mostra para um grande número de pacientes uma precisão de 56% a 90%, sensibilidade de 58% a 92%, especificidade de 40 % a 84%, valor preditivo positivo de 31% a 54% e valor preditivo negativo de 88% a 98% (Brawer & Kirby 1998).

Vários cálculos e algoritmos têm sido feitos com o intuito de acentuar a aplicação do teste do PSA no câncer de próstata, são eles: o cálculo da velocidade de crescimento do PSA com avanço das patologias prostáticas (Carter *et al.* 1992), da densidade do PSA (Seaman *et al.* 1993, Benson & Olsson 1994), e das medidas do PSA para idades específicas (Oesterling *et al.* 1993).

Além desses cálculos, vários trabalhos têm sido feitos com as formas moleculares do PSA (livre ou complexado) no sangue. A determinação da proporção de PSA livre pelo PSA total (porcentagem de PSA livre) nos pacientes tem demonstrado uma redução do número de biópsias desnecessárias mantendo-se uma boa sensibilidade clínica (Catalona 1997). A porcentagem de PSA livre pode informar sobre a agressividade do tumor

(Carter *et al.* 1997, Arcangeli *et al.* 1998, Pannek *et al.* 1998), bem como separar os pacientes com tumor dos pacientes com HPB, pois nestes essa porcentagem é maior (Stenman *et al.* 1991).

O uso da dosagem da hK2 sorológica como uma ferramenta adicional à dosagem do PSA para a diagnóstico precoce de câncer de próstata tem melhorado o trabalho clínico (Kwiatkowski *et al.* 1998). A concentração da hK2 no sangue de pacientes com câncer de próstata é maior do que em indivíduos com HPB. Em contraste, a porcentagem de PSA livre é maior em pacientes com HPB, desta forma, o uso combinado da proporção hK2 pelo PSA livre melhora a detecção do câncer de próstata (Kwiatkowski *et al.* 1998). A proporção de hK2 por PSA livre é mais alta em pacientes com CaP do que em indivíduos sem tumor (Becker *et al.* 1998, Magklara *et al.* 1999b, Becker *et al.* 2000a, 2000b, Haesen *et al.* 2000, Nam *et al.* 2000). Entretanto, não é possível separar CaP localizado de metastático usando esta proporção (Becker *et al.* 2000b, Haesen *et al.* 2000).

Como a liberação de células epiteliais prostáticas para a corrente sanguínea é um evento raro e propiciado por alterações no arranjo glandular prostático. O fato dos RNAm dos genes KLK2 e KLK3 serem achados quase que exclusivamente em células epiteliais prostáticas associado à técnicas de biologia molecular muito sensíveis, como a PCR (reação em cadeia da polimerase) e suas variações (RT-PCR *Semi-nested*), permitem a detecção de uma célula prostática em um milhão de células sanguíneas (Rittenhouse *et al.* 1998). Estudos *in vitro* indicam que duas células tumorais circulantes por mL de sangue parecem ser o suficiente para difundir um tumor por disseminação hematogênica (Liotta *et al.* 1974 *apud* Loric *et al.* 1995), e que de 20 a 30% dos cânceres prostáticos localizados sofrem recorrência devido a células não detectáveis em circulação (Corey *et al.* 1997).

Os resultados produzidos por RT-PCR (transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase), em casos pré-operatórios, por análises combinadas dos genes KLK2 e KLK3 indicam que o limite de detecção de ambos é parecido (Corey *et al.* 1997), contudo em casos de estudos pós-cirúrgicos o KLK2 mostra-se como sendo um melhor marcador para tumores agressivos (Shariat *et al.* 2002). Levando-se em consideração que a concentração do RNAm do KLK2 é menor que do KLK3, resultados positivos apenas para o KLK2 indicam uma regulação positiva desse gene e negativa para o KLK3 (Corey *et al.* 1997).

Aplicações de formas variantes da PCR também são interessantes no estudo de tratamentos com a terapia hormonal. As respostas para a terapia anti-androgênica e a expressão do RNAm do KLK2 são correlacionadas, em contraste com a do KLK3, indicando que o KLK2 é um marcador para o *screening* correto do câncer de próstata (Kawakami *et al.* 1997). Contudo, existem controvérsias quanto a presença e a quantidade de expressão desses marcadores quando comparados indivíduos hormônio-dependentes com hormônio-independentes (Ylikoski *et al.* 2001, Ylikoski *et al.* 2002).

Apesar dos resultados animadores apontados acima deve ficar claro que as técnicas de biologia molecular não são capazes somente de detectar células tumorais prostáticas com potencial metastático, mas também células que não têm este potencial gerando o falso-positivo (Sokoloff *et al.* 1996).

### **3.6. Expressão Tecidual dos genes KLK2 e KLK3**

A concentração do RNAm do KLK2 corresponde de 10% a 60% da concentração do RNAm do KLK3 em tecido prostático humano (Chapdelaine *et al.* 1988, Henttu *et al.* 1990, Young *et al.* 1992). Contudo essas expressões variam com o aparecimento de doenças prostáticas. A literatura apresenta a

expressão dos genes KLK2 e KLK3 em tecido prostático com anomalias de forma ambígua.

O gene KLK3 parece ser mais expresso em tecidos benignos quando comparados com malignos (Pretlow *et al.* 1991, Darson *et al.* 1997, Herrala *et al.* 2001, Magklara *et al.* 2000a, Qiu *et al.* 1990), além disso acredita-se que as baixas expressões do KLK3 em tecido tumoral estão associadas com o desenvolvimento de tumores potencialmente mais agressivos (Stege *et al.* 2000). Entretanto outros trabalhos mostram que não existe diferença de expressão do gene KLK3 em tecidos com as patologias CaP e HPB (Gallee *et al.* 1990, Henttu *et al.* 1990, Hakalahti *et al.* 1993). Contudo, Darson e colaboradores (1999) detectaram por imunohistoquímica, usando anticorpos mono e policlonais, maiores concentrações de PSA em tecido tumoral que em benigno, e sugeriram que os resultados ambíguos de expressão se devem às reações cruzadas entre o PSA e a hK2 produzidas por anticorpos policlonais.

Assim como o KLK3, a expressão do KLK2 tem resultados controversos, estudos imunohistoquímicos apontam a superexpressão do gene com o avanço patológico do câncer de próstata (Darson *et al.* 1997, 1999, Herrala *et al.* 2001). Entretanto, foi encontrada maior expressão para o gene em tecido benigno comparado com o maligno (Magklara *et al.* 2000a), já Henttu e colaboradores (1990) apontam nenhuma diferença de expressão para o gene em tecido benigno comparado com o maligno.

Para explicar estes resultados dúbios várias especulações são propostas. Primeiro, as diferenças discrepantes entre os níveis de RNAm e proteico, obtidos por diferentes técnicas, talvez possam ser explicadas devido a eventos, que ocorrem em tecidos tumorais, que possam mascarar epítomos importantes para o reconhecimento de anticorpos (Herrala *et al.* 2001). Tais eventos incluem processamentos heterogêneos na região N-terminal gerando isoformas (Herrala *et al.* 1998 *apud* Herrala *et al.* 2001) e irregulares

glicosilações proteicas (Huber *et al.* 1995 *apud* Herrala *et al.* 2001). Segundo, como a hK2 ativa a pró-forma do PSA (Kumar *et al.* 1997, Lövgren *et al.* 1997, Takayama *et al.* 1997) e este tem função de supressor de tumor (Diamandis *et al.* 2000a, Diamandis 2000), talvez altas concentrações da hK2 induzam a ação do PSA para impedir a progressão do tumor (Herrala *et al.* 2001). Entretanto, ao mesmo tempo as baixas expressões do KLK3 com o avanço do câncer de próstata podem estar associadas com o perda da sua função de supressor de tumor (Magkalaria *et al.* 2000a).

### 3.7. Regulação Hormonal dos genes KLK2 e KLK3

Tanto KLK2 como o KLK3 são hormonalmente regulados por andrógenos (Young *et al.* 1992, Murtha *et al.* 1993). Entretanto, a regulação da expressão desses genes não é apenas mediada por andrógenos, mas também por fatores autócrinos e parácrinos sugerindo um mecanismo de controle de expressão muito complexo (Young *et al.* 1995, Sadar *et al.* 1999). Além disso, variações na expressão dos genes na próstata indicam uma regulação diferenciada desses genes (Darson *et al.* 1999). Diferentes linhagens celulares tumorais de mama exibiram padrões de expressão distintos para vários receptores nucleares co-reguladores e é possível que os níveis relativos de expressão desses co-ativadores ou co-repressores possam diferencialmente modular a atividade transcricional do AR dentro da região promotora dos genes KLK2 e KLK3 (Magklara *et al.* 2002).

O promotor do KLK3 possui três AREs (elementos de resposta a andrógenos) (Riegman *et al.* 1991b, Cleutjens *et al.* 1996, Schuur *et al.* 1996) e o promotor do KLK2 dois AREs (Riegman *et al.* 1991a, Murtha *et al.* 1993, Magklara *et al.* 2000b). Esses AREs são necessários para a regulação positiva dos genes por andrógenos mostrados *in vitro* em linhagens celulares tumorais prostáticas na região 5' do promotor (Murtha *et al.* 1993). Entretanto, foram

encontrados outros elementos de resposta a hormônios esteróides, diferentes do andrógeno, próximos a região promotora dos genes oferecendo bases moleculares para a expressão desses genes em tecidos extra prostáticos que tenham receptores de esteróides (Shan *et al.* 1997).

Há evidências de que os AREs do KLK2 têm maior resposta androgênica que os AREs do KLK3 sugerindo que existem outras regiões regulatórias do promotor do KLK3, pois a quantidade de RNAm desse gene é bem superior ao do KLK2 (Rittenhouse *et al.* 1998). Além disso, o KLK2 e o KLK3 são superexpressos em linhagens celulares tumorais prostáticas andrógenos dependentes comparadas com andrógenos independentes (Riegman *et al.* 1991a, Vaarala *et al.* 2000). Uma das principais diferenças entre as respostas androgênicas e não androgênicas em linhagens celulares tumorais prostáticas é a presença efetiva do receptor de andrógeno em células hormônio dependentes (Riegman *et al.* 1991a, 1991b), bem como a presença de outras vias, independentes do AR, capazes de ativar esses genes (Sadar *et al.* 1999).

---

---

## REFERÊNCIAS GERAIS

---

---

Achbarou A, Kaiser S, Tremblay G, Ste-Marle LG, Brodt P, Goltzman D, Rabbani AS 1994 Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells *in vivo* *Cancer Res.* 54 (9) 2372-2377.

Albright LC & Eeles R 1995 Progress in prostate cancer. *Nature Genetics* 9 336-338.

Arcangeli CG, Humphrey PA, Smith DS, Harmon TJ, Shepherd DL, Keetch DW, Catalona WJ 1998 *Urol.* 51 (4) 558-565.

Ashley P & Mc Donald 1985a Kallikrein -related mRNAs of the rat submaxillary gland: nucleotide sequences of four distinct types including tonin. *Biochemistry.* 24 4512-4520.

Ashley P & Mc Donald 1985b Tissue specific expression of kallikrein-related genes in rat. *Biochemistry.* 24 4520-4527.

Akiyama K, Nakamura T, Iwanaga S, Hara M 1987 The chymotrypsin-like activity of human prostate-specific antigen, gamma-seminoprotein. *FEBS Lett.* 225 (1-2) 168-172.

Baff R, Moreno JG, Monne M, Veronese ML, Gomella LG 1996 A comparative analysis of prostate-specific antigen gene sequence in benign and malignant prostate tissue. *Urology.* 47 (6) 795- 800.

Ban Y, Wang MC, Watt KW, Loo R, Chu TM 1984 The proteolytic activity of human prostate-specific antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* 123(2) 482-488.

Becker C, Fernlund P, Lilja H, Hugosson J, Piironen T, Pettersson K 1998 Percent human glandular kallikrein 2 (hK2) to free PSA in serum in the detection of prostate cancer and discrimination of tumor grade. *J Urol.* 159 178-183.

Becker C, Piironen T, Pettersson K, Björk T, Wojno KJ, Oesterling JE, Lilja H 2000a Discrimination of men with prostate cancer from those with benign disease by measurements of human glandular kallikrein 2 (hK2) in serum. *J Urol.* 163 311-316.

Becker C, Piironen T, Pettersson K, Hugosson J, Lilja H 2000b Clinical value of human glandular kallikrein 2 and free and total prostate – specific antigen in serum from a population of men with prostate-specific antigen levels 3.0 ng/mL or greater. *Urol.* 55 (5) 694-699.

Benson MC & Olsson CA 1994 Prostate-specific antigen and prostate-specific density. Roles in patient evaluation and management. *Cancer.* 74 (6) 1667-1673.

Berg T, Bradshaw RA, Carretero AO, Chao J, Chao L, Clements JA, Fahnestock, Fritz H, Gauthier F, McDonald RJ, Margolius HS, Morris BJ, Richards RI, Scicli AG 1992 A common nomenclature for members of the tissue (glandular) kallikrein gene families. In *Recent progress on kinins: agents and actions*. Eds Fritz H, Muller-Esterl W, Jochum M, Roscher A, Luppertz, 38 (Suppl. 1) 19-25.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K 1992 Bioregulation of kinins: kallikrein, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 44 1-80.

Black MA, Magklara A, Obiezu C, Levesque MA, Sutherland DJA, Tindall DJ, Young CYF, Sauter ER, Diamandis EP 2000 Expression of a prostate-associated protein human glandular kallikrein (hK2), in breast tumors and in normal breast secretions. *Br J Cancer.* 82 361-367.

Bostwick DG 1999 Prostatic intraepithelial neoplasia. In *Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment*, pp 35-50. Eds AV Kaisary, GP Murphy, Denis L & Griffiths. London: Martin Dunitz Ltd.

Bourgeois L, Brillard – Bourdet M, Deperthes D, Juliano MA, Juliano L, Tremblay RR, Dube JY, Gauthier F 1997 Serpin-derived peptide substrates for investigating the substrate specificity of human tissue kallikreins hK1 and hK2. *The Journal of Biological Chemistry.* 272 (47) 29590-29595.

Brawer MK & Kirby R 1998 In: *Prostate specific antigen*. Abingdon: Health Press Limited.

Bridon DP & Dowell BL 1995 Structural comparison of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein using molecular modeling. *Urol.* 45 (5) 801-806.

Buck CA 1995 In: *Prostate Cancer*. Hampshire: Merit Publishing International. 110p.

Byard DP & Mostofy 1972 Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies. Examined by step-section technique. *Cancer* 30 5

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, Fozard JL, Walsh PC 1992 Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA*. 267 (16) 2215-2220.

Carter HB, Partin AW, Luderer AA, Metter EJ, Landis P, Chan DW, Fozard JL, Pearson JD 1997 Percentage of free prostate-specific antigen in sera predicts aggressiveness of prostate cancer a decade before diagnosis. *Urol.* 49 (3) 379-384.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, Petros JA, Andriole GL 1991 Measurement of prostate-specific antigen serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med.* 324 1156-1161.

Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hundson MA, Scardino PT, Flanigan RC, de Kernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL 1994 Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6.630 men. *J Urol.* 151 (5) 1283-1290.

Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK 1997 Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA*. 277 (18) 1452-1455.

Chamberlain J, Melia J, Moss S, Brown J 1996 The diagnosis, management, treatment and cost of cancer in England and Wales. London: Sutton Cancer Screening Evaluation Unit, Institute of Cancer Research.

Chao J, Woodley C, Chao L, Margolius HS 1983 Identification of tissue kallikrein in brain cell free translation product encoded by brain mRNA. *J Biol Chem.* 258 15173-15178.

Chao J, Chao L, Margolius HS 1984 Isolation of tissue kallikrein in rat spleen by monoclonal antibody-affinity chromatography. *Biochim. Biophys Acta.* 801 244-249.

- Chao J, Chao L, Swain CC, Tsai J, Margolius HS 1987 Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and oestrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology*. 120 475-482.
- Chapdelaine P, Paradis G, Tremblay RR, Dube JY 1988 High level of expression in the prostate of a human glandular kallikrein mRNA related to prostate - specific antigen. *FEBS Lett*. 236 (1) 205-208.
- Charlesworth MC, Young CY, Miller VW, Tindall DJ 1999 Kininogenase activity of prostate-derived human glandular kallikrein (hK2) purified from seminal fluid. *J. Androl*. 20 220-229.
- Chen Z, Chen H, Stamey TA 1997 Prostate-specific antigen in benign prostatic hyperplasia: purification and characterization. *J Urol*. 157 (6) 2166-2170.
- Christensson A, Laurell CB, Lilja H 1990 Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem*. 194(3) 755-763.
- Clements JA 1989 The glandular kallikrein family of enzymes: tissue-specific expression and hormonal regulation. *Endocr. Rev.*, 10 393-419.
- Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkman AO, Trapman J 1996 Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem*. 271 6379-6388.
- Coffey DS 1993 Prostate Cancer: an overview of an increasing dilemma. *Cancer Supplement* 71 880-886.
- Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Giudice LC, Rosenfeld RG 1992 Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 75 (4) 1046-1053.
- Corey E, Arfman EW, Oswin MM, Melchior SW, Tindall DJ, Young CYF, Ellis WJ, Vessella RL 1997 Detection of circulating prostate cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of human glandular kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen (PSA) messages. *Urol*. 50 (2) 184-188.

Creighton TE 1993 *Proteins: Structures and Molecular Properties*, ed 2. WH Freeman and Company, New York.

Cumming AD, Timothy W, Wojtacha D, Fleming S, Thomson D, Jenkins DAS 1994 Expression of tissue kallikrein in human kidney. *Clin. Sci.* 87 5-11.

Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Young CYF, Klee GG, Tindall DJ, Bostwick DG 1997 Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. *Urol.* 49 (6) 857-862.

Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Saeid MS, Young CYF, Klee GG, Tindall DJ, Bostwick DG 1999 Human glandular kallikrein 2 expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urol.* 53 (5) 939-944.

Deperthes D, Chapdelaine P, Tremblay RR, Brunet C, Berton J, Hebert J, Lazure C, Dube JY 1995 Isolation of prostatic kallikrein hK2, also known as hGK-1, in human seminal plasma. *Bioch Biophys Acta.* 1245 (3) 311-316.

Deperthes D, Frenette G, Brillard-Bourdet M 1996 Potential involvement of kallikrein hK2 in the hydrolysis of the human seminal vesicle proteins after ejaculation. *J Androl.* 17 659-665.

Deperthes D, Marceau F, Frenette G, Lazure C, Tremblay RR, Dube JY 1997 Human kallikrein hK2 has low kininogenase activity while prostate-specific antigen (hK3) has none. *Biochim. Biophys Acta.* 1343 102-106.

Diamandis EP & Yu H 1995 New biological function of prostate-specific antigen? *J Clin Endocrinol Metab.* 80 1515-1517.

Diamandis EP & Yu H, Sutherland DJ 1996a Detection of prostate-specific antigen immunoreactivity in breast tumors. *Breast cancer Res Treat.* 32 301-310.

Diamandis EP, Yu H, Lopez-Otin C 1996b Prostate-specific antigen-a new constituent of breast cyst fluid. *Breast cancer Res Treat.* 38 259-264.

Diamandis EP & Yu H 1997 Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *Urol Clinics of North Am.* 2 275-282.

- Diamandis EP 1998 Prostate-specific antigen or human kallikrein 3? Recent developments. *Tumor Biol.* 19 65-68.
- Diamandis EP 2000 Prostate-specific antigen: a cancer fighter and a valuable messenger? *Clin Chem.* 46 (7) 896-900.
- Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu CV 2000a The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 11 54-60.
- Diamandis EP, Yousef GM, Clements J, Ashworth LK, Yoshida S, Egelrud T, Nelson PS, Shiosaka S, Little S, Lilja H, Stenman U, Rittenhouse HG, Wain H 2000 b New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family. *Clin. Chem.* 46 1855-1858.
- Dube JY & Tremblay RR 1997 Biochemistry and potential roles of prostatic kallikrein hK2. *Mol Urol.* 1 279-285.
- Erdös EG 1990 Some old and new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15 (suppl. 6) 520-524.
- Evans BA, Yun ZX, Close JA, Tregear GW, Kitamura N, Nakanishi S, Callen DF, Baker E, Hyland VJ, Sutherland GR, Richards RI 1988 Structure and chromosomal localization of the human renalkallikrein gene. *Biochemistry.* 27 3124-3129.
- Fiedler F 1979 Enzymology of glandular kallikreins. In *Bradykinin, Kallidin and kallikrein*, Eds Erdos EG, pp 103-161, Berlin: New York.
- Figuroa CD, Maciver AG, Mackenzie JC, Bhoola KD 1988 Localisation of immunoreactive kininogen and tissue kallikrein in the human nephron. *Histochemistry.* 89 437-442.
- Figuroa CD & Bhoola KD 1989 Leukocyte tissue kallikrein: in a acute phase signal for inflammation. In *The Kallikrein-kinin System in health and disease*. Eds Fritz H, Schmidt I, Dietz G. pp 311-320. Braunschweig: Limbach-Verlag.
- Finlay JA, Evans CL, Day JR, Payne JK, Mikolajczyk SD, Millar LS, Kuus-Reichel K, Wolfert RL, Rittenhouse HG 1998 Development of monoclonal antibodies specific for human glandular kallikrein (hK2): development of a dual antibody immunoassay for hK2 with negligible prostate - specific antigen cross-reactivity. *Urology.* 51 (5) 804-809.

- Foussias G, Yousef GM, Diamandis EP 2000 Identification and molecular characterization of a novel member of the siglec family (Siglec 9). *Genomics*. 67 171-178.
- Frenette G, Deperthes D, Tremblay RR 1997a Purification of enzymatically active kallikrein hK2 from seminal plasma. *Biochem Biophys Acta*. 1334 109-115.
- Frenette G, Tremblay RR, Lazure C, Dube JY 1997b Prostatic kallikrein hK2, but not prostate – specific antigen (hK3), activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Int J Cancer*. 71 (5) 897-899.
- Frey EK, Kraut H, Werle E 1950 Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. *Arch. Klin. Chir.* 142 663.
- Gallee MP, Visser-de Jong E, van der Korput JA, van der Kwast TH, Kate FJ, Schroeder FH, Trapman J 1990 Variation of prostate-specific antigen expression in different tumour growth patterns present in prostatectomy specimens. *Urol Res*. 18 181-187.
- Gan L, Lee I, Smith R, Argonza-Barrett R, Lei H, McCuaig J, Moss P, Paepers B, Wang K 2000 Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q 13 region. *Gene*. 257 119-130.
- Gleason F 1977 Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In *Urologic Pathology: the prostate*, pp 171, Eds Tannenbaum M, Lea & Febiger. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Gosling JA, Harris PF, Humpherson JR, Whitmore I & Willan PLT 1992 Pelve e Períneo. In *Anatomia Humana*, end 5, pp 5.16-5.17. São Paulo: Manole.
- Griffiths K & Morton MS 1999 Aspects of the cell biology of prostate cancer. In *Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment*, pp 16-33. Eds AV Kaisary, GP Murphy, Denis L & Griffiths. London: Martin Dunitz Ltd.
- Guyton AC & Hall JE 1997 Tratado de Fisiologia médica, edn 9, pp 847-857. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Haberman 1963 Über pH-bedingte Modifikationen des kininliefernden  $\alpha$ -globulins aus Rinderserum und das molekulargewicht von kininogen. *Biochem. Z.* 337 440.

Haesen A, Becker C, Noldus J, Graefen M, Huland E, Huland H, Lilja H 2000 Human glandular kallikrein 2: a potential serum marker for predicting the organ confined versus nonorgan confined growth of prostate cancer. *J Urol.* 163 1491-1497.

Hakalahti L, Vihko P, Henttu P, Autio-Harmainen H, Soini Y, Vihko R 1993 Evaluation of PAP and PSA gene expression in prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma using Northern-blot analyses, in situ hybridization and immunohistochemical stainings with monoclonal and bispecific antibodies. *Int J Cancer.* 55 590-597.

Harvey JT, Hooper JD, Myers AS, Stephenson S, Ashworth LK, Clements JÁ 2000 Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *The Journal of Biol. Chemistry.* 275 (48) 37397-37406.

Henttu P, Lukkarinen O, Vihko P 1990 Expression of the gene coding for human prostate-specific antigen and related hGK-1 in benign and malignant tumors of the human prostate. *Int J Cancer.* 45 654-660.

Hermanek P & Sobin LH 1987 TNM Classification of malignant tumours. edn 4, p 124. New York: Springer-Verlag.

Herrman A, Buchinger P, SomLev B, Rehbock J 1996 High and low molecular weight kininogen and plasma prekallikrein/plasma kallikrein in villous capillaries of human term placenta. *Placenta.* 17 223-230.

Herrala A, Kurkela R, Porvari K, Isomäki R, Henttu P, Vihko P 1997 Human prostate-specific glandular kallikrein is expressed as an active and an inactive protein. *Clin Chem.* 43 (2) 279-284.

Herrala A, Kurkela R, Vihinen M, Kalkkinen N, Vihko P, 1998 Androgen-sensitive human prostate cancer cells, LNCaP, produce both N-terminally mature and truncated prostate-specific antigen isoforms. *Eur J Biochem.* 255 329-235.

Herrala AM, Porvari KS, Kyllönen AP, Vihko PT 2001 Comparison of human prostate specific glandular kallikrein 2 and Prostate-specific antigen gene expression in prostate with gene amplification and overexpression of prostate specific glandular kallikrein 2 in tumor tissue. *Cancer.* 92 (12) 2975-2984.

Heuze N, Olayat S, Gutman N, Zani ML, Courty Y 1999 Molecular cloning and expression of an alternative hKLK3 transcript coding for a variant protein of prostate-specific antigen. *Cancer Res.* 59 2820-2824.

Hofmann W, Junk A, Geiger R 1983 Human tissue kallikrein. Isolation and characterisation of human saliva kallikrein. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 364 425-432.

Howarth DJC, Aronson IB, Diamandis EP 1997 Immunohistochemical localization of prostate-specific antigen in benign and malignant breast tissues. *Br J Cancer.* 75 1646-1651.

Huber P, Schmid HP, Mattarelli G, Strittmatter B, van Steenbrugge G, Maurer A 1995 Serum free prostate specific antigen: isoenzymes in benign hyperplasia and cancer of the prostate. *Prostate.* 27 212-219.

HUGO (Human Genome Organization)-Gene Nomenclature Committee. Disponível em: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Câncer de próstata. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 20 fevereiro de 2002. Disponível em: <http://www.inca.org.br/cancer/tipos/prostata>.

Jacobsen S 1966 Separation of two different substrates for plasma kinin-forming enzymes. *Nature*, 210 98-99.

Jarmulowicz MR 1999 The role of pathology in biopsy, diagnosis and management of prostate cancer. In *Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment*, pp 16-33. Eds AV Kaisary, GP Murphy, Denis L & Griffiths. London: Martin Dunitz Ltd.

Jenzano JW, Su HW, Featherstone GL, Lundblad RL 1992 Molecular diversity of tissue kallikrein in human saliva. *Agents Actions.* 38 137-144.

Jewett HJ 1975 The present status of radical prostatectomy for stages A and B prostatic cancer. *Urol. Clin. North. Am.* 2:105

Jones TH, Figueroa CD, Smith SM, Bhoola KD 1992 Tissue kallikrein and the effect of bromocriptine in human prolactin and growth hormone-secreting adenomas. *Agents Actions Suppl Recent Progr Kinins.* 38 175-182.

- Kawakami M, Okaneya T, Furihata K, Nishizawa O, Katsuyama T 1997 Detection of prostate cancer cells circulating in peripheral blood by reverse transcription-PCR for KLK2. *Cancer Res.* 57 4167-4170.
- Kraut H, Frey EK, Werle E 1930 Der Nachweis eines Kreislauf-hormon in Pankreasdruse. *Hoppe-Seylers Z Physiol. Chem.* 189 97-106.
- Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS 1997 Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Res.* 57 3111-3114.
- Kwiatkowski MK, Recker F, Piironen T, Pettersson K, Otto T, Wernli M, Tscholl R 1998 In prostatism patients the ratio of human glandular kallikrein to free PSA improves the discrimination between prostate cancer and benign hyperplasia within the diagnostic "gray zone" of total PSA 4 to 10 ng/mL. *Urol.* 52 (3) 360-365.
- Large PH, Ercole CJ, Lightner DJ, Fraley EE, Vessella R 1989 The value of serum prostate-specific antigen determination before and after radical prostatectomy. *J Urol.* 141 (4) 873-879.
- Levesque M, Hu H, D'Costa M 1996 Prostate-specific antigen expression by various tumors. *J Clin Lab Anal.* 9 123-128.
- Lilja H. 1987 Seminal vesicle-secreted proteins and theirs reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest.* 80 281-285.
- Lilja H, Abrahamsson PA, Lundwall A 1989 Semenogelin, the predominant protein in human semen. *J Biol Chem.* 264 1894-1900.
- Lilja H 2001 Role of hK2, free PSA, and complexed PSA measurements in the very early detection of prostate cancer. *Eur Urol.* 39 (suppl 4) 47-48.
- Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM 1974 Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* 34 997-1003.
- Liu XF, Essand M, Vasmatzis G, Lee B, Pastan I 1999 Identification of three new alternative human kallikrein 2 transcripts: evidence of long transcript and alternative *splicing*. *Bioch Biophys Res Commun.* 264 833-839.

- Loric S, Dumas F, Eschwege P, Blanchet P, Benoit G, Jardin A, Lacour B 1995 Enhanced detection of hematogenous circulating prostatic cells in patients with prostate adenocarcinoma by using nested reverse transcription polymerase chain reaction assay based on prostate-specific antigen. *Clin Chem.* 41 (12) 1698-1704.
- Lövgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall A, Lilja H 1997 Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 238 549-555.
- Lövgren J, Valtonen-Andre C, Marsal K, Lilja H, Lundwall A 1999a Measurement of prostate-specific antigen and glandular kallikrein 2 in different body fluids. *J Androl.* 20 348-355.
- Lövgren J, Airas K, Lilja H 1999b Enzymatic action of human glandular kallikrein 2 (hK2): substrate specific and regulation by  $Zn^{2+}$  and extracellular protease inhibitors. *Eur J Biochem.* 262 781-789.
- Lowsley OS 1912 The development of human prostate gland with reference to the development of other structures and neck of the urinary bladder. *Am J Anat.* 13 299-349.
- Lundwall A & Lilja H 1987 Molecular cloning of human prostate-specific antigen cDNA. *FEBS Lett.* 214 317-322.
- Lyon PB, See WA, Xu Y, Cohen MB 1995 Diversity and modulation of plasminogen activator activity in human prostate carcinoma cell lines. *Prostate.* 27 (4) 179-186.
- Magklara A, Scorilas A, López-Otin C, Vizoso F, Ruibal A, Diamandis EP 1999a Human glandular kallikrein in breast milk, amniotic fluid, and breast cyst fluid. *Clin Chem.* 45 1774-1780.
- Magklara A, Scorilas A, Catalona WJ, Diamandis EP 1999b The combination of human glandular kallikrein and free prostate-specific antigen (PSA) enhances discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in patients with moderately increased total PSA. *Clin Chemistry.* 45 (11) 1960-1966.

- Magklara A, Scorilas A, Stepha C, Kristiansen GO, Hauptmann S, Jung K, Diamandis EP 2000a Decreased concentrations of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in malignant versus nonmalignant prostatic tissue. *Urol.* 56 (3) 527-532.
- Magklara A, Grass L, Diamandis EP 2000b Differential steroid hormone regulation of human glandular kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen (PSA) in breast cancer cell line. *Breast Cancer Res Treat.* 59 263-270.
- Magklara A, Brown TJ, Diamandis EP 2002 Characterization of androgen and nuclear receptor co-regulator expression in human breast cancer cell lines exhibiting differential regulation of kallikreins 2 and 3. *Int J Cancer.* 100 (5) 507-514.
- Mahabeer R & Bhoola KD 2000 Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacology & Therapeutics.* 88 77-89.
- Mason AJ, Evans BA, Cox DR, Shine J, Richards RL 1983 Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biologically active peptides. *Nature.* 303 300-307.
- Mast AE, Enghild JJ, Pizzo SV, Salvesen G 1991 Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed, and reactive site cleaved serpins: comparison of alpha 1-proteinase inhibitor, alpha 1 – antichymotrypsin, antithrombin III, alpha 2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. *Biochemistry.* 30 (6) 1723-1730.
- McCormack RT, Rittenhouse HG, Finlay JA, Sokoloff RL, Wang TJ, Wolfert RL, Lilja H, Oesterling JE 1995 Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era. *Urol.* 45 (5) 729-744.
- McNeil JE 1968 Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Pathol.* 49 347-357.
- McNeil JE 1972 The prostate and prostate urethra: a morphologic synthesis. *J Urol.* 107 1008-1016.
- McNeil JE 1988 Normal anatomy of the prostate and changes in benign prostatic hypertrophy and carcinoma. *Sem Ultras CT and MR.* 9 329-334.

Mikolajczyk SD, Millar LS, Marker KM, Grauer LS, Goel A, Cass MM, Kumar A, Saedi MS 1997a Ala217 is important for the catalytic function and autoactivation of prostate-specific human kallikrein 2. *Eur J Biochem.* 246 (2) 440-446.

Mikolajczyk SD, Grauer LS, Millar LS, Hill TM, Kumar A, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Saedi MS 1997b A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum. *Urol.* 50 (5) 710-714.

Mikolajczyk SD, Millar LS, Kumar A, Saedi MS 1998 Human glandular kallikrein, hK2, shows arginine-restricted specificity and forms complexes with plasma protease inhibitors. *Prostate.* 34 (1) 44-50.

Movat HZ 1979 The plasma kallikrein-kinin system and its interrelationship with other components of blood. In *Bradykinin, kallidin and kallikrein*, Eds Erdos EG, pp 1-89, Berlin: New York.

Müller-Esterl W 1989 Kininogens, kinins and kinships. *Thromb. Haemost.* 61 2-6.

Murtha P, Tindall DJ, Young CYF 1993 Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hK2: characterization of an androgen response element in the 5' promoter region of the gene. *Biochem.* 32 6459-6464.

Naicker S, Naidoo S, Ramsaroop R, Moodley D, Bhoola KD 1999 Tissue kallikrein and kinins in renal disease. *Immunopharmacology.* 44 183-192.

Naidoo Y, Snyman C, Raidoo DM, Bhoola KD, Kemme M, Müller-Esterl W 1999 Cellular visualization of tissue prokallikrein in human neutrophils and myelocytes. *Br J Haematol.* 105 599-612.

Nam RK, Diamandis EP, Toi A, Trachtenberg J, Magklara A, Scorilas A, Papnastasiou PA, Jewett MAS, Narod SA 2000 Serum human glandular kallikrein 2 protease levels predict the presence of prostate cancer among men with elevated prostate-specific antigen. *J Clin Oncology.* 18 (5) 1036-1042.

Oesterling JE 1991 Prostate-specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of prostate. *J Urol.* 145 (5) 907-923.

Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HÁ, Girman CJ, Panser LA, Lieber MM 1993 Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA*. 270 (7) 860-864.

Pannek J, Rittenhouse HG, Chan DW, Epstein JI, Walsh PC, Partin AW 1998 The use of percent free prostate specific antigen for staging clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 159 (4) 1238-1242.

Pretlow TG, Pretlow TP, Yang P, Kaetzel Cs, Delmoto CM, Kamts S, Bodner DR, Kursh E, Resnick MI, Bradley Jr EL 1991 Tissue concentrations of prostate-specific antigen in prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Inf J Cancer*. 49 645-649.

Pizzo SV, Mast AE, Feldman SR, Salvesen G 1988 In vivo catabolism of  $\alpha_1$ -antichymotrypsin is mediated by the serpin receptor which binds  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor, antithrombin II and heparin cofactor II. *Biochem Biophys Acta*. 967 158-162.

Qin H, Kemp J, Yip M, Lam-Po-Tang PRL, Morris BJ 1991 Localization of human glandular kallikrein 1 gene to chromosome 19q 13.3-13.4 by *in-situ* hybridization. *Hum.Hered*. 41 222-226.

Qiu SD, Young CY, Billhartz DL, Prescott JL, Farrow GM, He WW, Tindall DJ 1990 In situ hybridization prostate-specific antigen RNA in human prostate. *J Urol*. 144 1550-1556.

Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Bhoola KD 1996 Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology*. 32 39-47.

Raidoo DM & Bhoola KD 1998 Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther*. 79 105-127.

Richards RI, Holman K, Shen Y, Kozman H, Harley H, Brook D, Shaw D 1991 Human glandular kallikrein gene: genetics and physical mapping of the KLK1 locus using a highly polymorphic microsatellite PCR marker. *Genomics* 11 77-82.

Riegman PHJ, Klassen P, Van der Korput JAGM, Romijn JC, Trapman J 1988 Molecular cloning and characterization of novel prostate antigen cDNAs. *Biochem Res Commun*. 155 181-188.

Riegman PHJ, Vlietstra RJ, Klaassen P, Van der Korput JAGM, Guerts van Kessel A, Romijn JC, Trapman J 1989a The prostate-specific antigen gene and the human glandular kallikrein 1 gene are tandemly located on chromosome 19. *FEBS Lett.* 247 123-126.

Riegman PHJ, Vlietstra RJ, Van der Korput JAGM, Romijn JC, Trapman J 1989b Characterization of the prostate-specific antigen gene: a novel human kallikrein-like gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 159 95-102.

Riegman PHJ, Vlietstra RJ, van der Korput HAGM, Romijn JC, Trapman J 1991a Identification and androgen-regulated expression of two major human glandular kallikrein-1 (hGK-1) mRNA species. *Mol Cell Endocr.* 76 181-190.

Riegman PHJ, Vlietstra RJ, van der Korput JAGM, Brinkmann AO, Trapman J 1991b The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol.* 5 1921-1930.

Riegman PHJ, Vlietstra RJ, Suurmeijer L, Cleutjens CBJM, Trapman J 1992 Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics.* 14 6-11.

Rittennhouse HG, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Partin AW 1998 Human kallikrein 2 (hK2) and Prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 35 (4) 275-368.

Rohr HP & Bartsch G 1980 Human benign prostatic hyperplasia: a stromal disease? New perspectives by quantitative morphology. *Urology* 16 625-633.

Sadar MD, Hussain M, Bruchofsky N 1999 Prostate cancer: molecular biology of early progression to androgen independence. *Endocrine-related Cancer.* 6 487-502.

Sauter ER, Daly M, Lenahan K 1996 Prostate-specific antigen levels in nipple aspirate fluid correlate with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5 967-970.

Schedlich LJ, Bennetts BH, Morris B 1987 Primary Structure of a human glandular kallikrein gene. *DNA.* 6 (5) 429-437.

Schuur ER, Henderson GA, Kmetec LS, Miller JD, Lamparski HG, Henderson DR 1996 Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *J Biol Chem.* 271 7043-7051.

Scott RJr, Mutchnik DL, Laskowski TZ, Schmalhorst WR 1969 Carcinoma of the prostate in elderly men: incidence, growth characteristics and clinical significance. *J. Urol.* 101 602-607.

Seaman E, Whang M, Olsson CA, Katz A, Cooner WH, Benson MC 1993 PSA density (PSAD). Role in patient evaluation and management. *Urol Clin North Am.* 20 (4) 653-663.

Selly S, Donovan J, Faulkner A, Coast J, Gillat D 1996 Diagnosis, management and screening of earle localized prostate cancer: a systematic reveiw. Bristol: Health Care Evaluation Unit, University of Bristol.

Shan JD, Porvari K, Ruokonen M, Karhu A, Launonen V, Hedberg P, Oikarinen J, Vihko P 1997 Steroid-involved transcriptional regulation of human genes encoding prostatic acid phosphatase, prostate-specific antigen, and prostate-specific glandular kallikrein. *Endocrinology.* 138 (9) 3764 3770.

Shariat SF, Gottenger E, Nguyen C, Song W, Kattan MW, Andenoro J, Wheeler TM, Spencer DM, Slawin KM 2002 Preoperative blood reverse transcriptase-PCR assay for prostate-specific antigen and human glandular kallikrein for prediction of prostate cancer progression after radical prostatectomy. *Cancer Res.* 62 5974-5979.

Smith DF 1979 *Urologia Geral*, end 9, pp 505. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Snyman C, Naidoo Y, Narotam PK, Figueroa CD, van Dellen JR, Bhoola KD 1994 Cellular localisation of atrial natriuretic peptide and tissue kallikrein in the human hypothalamus. *Braz. J. Med Biol Res.* 27 1877-1883.

Sokoloff MH, Tso C, Kaboo R, Nelson S, Ko J, Dorey F, Figlin RA, Pang S, de Kernion J, Bellidegrun A 1996 Quantitative polymerase chain reaction does not improve preoperative prostate cancer staging: a clinicopathological molecular analysis of 121 patients. *J Urol.* 156 1560-1566.

Srougi M 1998 Câncer de próstata. In *Nefrologia, Urologia, Clínica*, pp 510. Eds N Schor & M Srougi. São Paulo: Sarvier.

Stamey TA & McNeal JE 1992 Adenocarcinoma of the prostate. In *Campbell's Urology*, edn 6, pp 1159-1221. Eds PC Walsh, AB Retik, TA Stamey & ED Vaughan. Philadelphia: W. B. Saunders Company.

- Steger R, Grande M, Carlstrom K, Tribukait B, Pousette A 2000 Prognostic significance of tissue prostate – specific antigen in endocrine – treated prostate carcinomas. *Clin Cancer Res.* 6 160-165.
- Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O 1991 A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res.* 51 222-226.
- Suzuki T, Iwanaga S, Kato T, Nagasawa S, Kato H, Yano M, Horiuchi K 1967 Biochemical properties of kininogens and kinin-releasing enzymes. In *International Symposium on Vasoactive Peptides: bradykinin and related kinins*, Eds Rocha M & Rothschild AH, pp 27, Society for Brazilian Pharmacology Experimental Therapeutics. São Paulo: Brasil.
- Takayama TK, Fujikawa K, Davie EW 1997 Characterization of the precursor of prostate-specific antigen: activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J Biol Chemistry.* 272 (34) 21582-21588.
- Tanangho, EA 1992 Anatomia do trato genitourinário. In *Urologia Geral.* end 13, pp 7-8, Eds Tanagho EA, McAninch JWS. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Tanaka T, Isono T, Yoshiki T, Yuasa T, Okada Y 2000 A novel form of prostate-specific antigen transcript produced by alternative *splicing*. *Cancer Res.* 60 56-59.
- Tulinius H, Egilsson V, Olafsdottir GH, Sigvaldason H 1992 Risk of prostate, ovarian, and endometrial cancer among relatives of women with breast cancer. *B Medical J.* 305 855-857.
- Travis J & Salvesen GS 1983 Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem.* 52 655-709.
- Vaarala MH, Porvari K, Kyllönen AP, Vihko P 2000 Differentially expressed genes in two LNCaP prostate cancer cell lines reflecting changes during prostate cancer progression. *Lab Invest.* 8 1259-1268.
- Vihinen M 1994 Modeling of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein structures. *Biochem Biophys Res Commun.* 204 (3) 1251-1256.

- Walsh PC & Worthington JF 1998 Doenças da próstata: um guia para homens e para as mulheres que os amam. end 1, pp 1-22. Eds Camargo JL, Pisetta A, Ramos MN. São Paulo: Martins Fontes.
- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM 1979 Purification of a Human Prostate-specific antigen. *Invest Urol.* 17 159-163.
- Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM 1981 Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate.* 2(1) 89-96.
- Watt KW, Lee PJ, M'Timkulu T, Chan WP, Loo R 1986 Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83 (10) 3166-3170.
- Werle E 1934 Zur Kennfnis des haushalfts des Kallikreins. *Biochem Z,* 269 415-434.
- Werle E & Korsten A 1938 Der kallikreingehalt des harns, des speichels und des Blutes bei Gesunden und Kranken. *Z Ges Exp Med.* 103 153
- Whitmore WF 1965 Hormone therapy in prostate cancer. *Am J Med.* 21 697.
- Wolf WC, Harley RA, Sluce D, Chao L, Chao J 1998 Cellular localization of kallistatin and tissue kallikrein in human pancreas and salivary gland. *Histochem Cytochem.* 110 477- 484.b
- Ylikoski A, Karp M, Pettersson K, Lilja H, Lövgren T 2001 Simultaneous quantification of human glandular kallikrein 2 and prostate-specific antigen mRNA in peripheral blood from prostate cancer patients. *J Mol Diagn.* 3 111-122.
- Ylikoski A, Pettersson K, Nurmi J, Irjala K, Karp M, Lilja H, Lövgren T, Nurmi M 2002 Simultaneous quantification of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 mRNA in blood samples from patients with prostate cancer and benign disease. *Clin Chem.* 48 (8) 1265-1271.
- Young CY, Andrews PE, Montgomery BT, Tindall DJ 1992 Tissue-specific and hormonal regulation of human prostate-specific glandular kallikrein. *Biochemistry.* 31 (3) 818-824.

Young CY, Andrews PE, Tindall DJ 1995 Expression and androgenic regulation of human prostate-specific kallikreins. *J Androl.* 16 (2) 97-99.

Yousef GM, Chang A, Scorilas A, Diamandis EP 2000 Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19 q13.3-13.4. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 16 125-133.

Yousef GM & Diamandis EP 2000 The expanded human kallikrein gene family: locus characterization and molecular cloning of a new member KLK-L3. *Genomics.* 65 184-194.

Yousef GM & Diamandis EP 2001 The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: structure, function, and association to disease. *Endocrine Reviews*, 22 (2) 184-204.

Yu H & Diamandis EP 1995a Prostate-specific antigen in milk of lactating woman. *Clin Chem.* 41 54-58.

Yu H & Diamandis EP 1995b Prostate-specific antigen immunoreactivity in amniotic fluid. *Clin Chem.* 41 204-210.

Yu H, Bowden DW, Spray BJ, Roch SS, Freedman BI 1998 Identification of human plasma kallikrein gene polymorphisms and evaluation of their role in end-stage renal disease. *Hypertension*, 31 906-911.

Zarghami N & Diamandis EP 1996 Detection of prostate-specific antigen mRNA and protein in breast tumors. *Clin Chem.* 42 361-366.

Zhang WM, Leinonen J, Kalkkinen N, Dowell B, Stenman UH 1995 Purification and characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid. *Clin Chem.* 41 (11) 1567-1573.

---

**CAPÍTULO**  
**ANÁLISE MOLECULAR**  
**DA EXPRESSÃO DOS GENES KLK2 E KLK3**  
**E SUAS IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO**  
**DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

---

## RESUMO

O câncer de próstata (CaP) tem se manifestado como uma das causas mais comuns de doenças entre homens mais velhos. É o segundo tipo de câncer mais diagnosticado nos Estados Unidos e no Brasil após o câncer de pele, não melanoma. O rastreamento de anomalias prostáticas é realizado principalmente por três etapas: o exame físico da próstata (toque retal), dosagem do antígeno próstata específico (PSA) e ultra-sonografia da próstata transretal, e posteriormente biópsias confirmatórias. O uso de marcadores moleculares que possibilitem a detecção precoce e o diagnóstico clínico do tumor aumentam as chances de cura dessa patologia. Este trabalho tem por objetivos estudar a expressão dos genes KLK2 e KLK3 em tecido prostático e do gene KLK2 em sangue periférico de pacientes diagnosticados com câncer de próstata (CaP) ou hiperplasia prostática benigna (HPB), e avaliar se genes são potenciais marcadores para aplicações no rastreamento clínico. O uso da RT-PCR multiplex semi-quantitativa possibilitou estimar as expressões dos genes KLK2 e KLK3 em tecido prostático tumoral ou hiperplásico, demonstrando que o KLK2 é melhor marcador molecular tecidual, quando comparado com o KLK3, para separar os grupos CaP e HPB, apantando a expressão do KLK2 maior em tecido tumoral quando comparado com HPB. Em aplicações clínicas, as análises teciduais para o KLK2 passam a ter importância quando o valor limítrofe de 0.6 (60% da expressão do gene constitutivo) é alcançado, notando-se que indivíduos com valor médio igual ou excedente a este limite possuem um risco aumentado em 15 vezes de ter ou desenvolver o tumor, e um risco aumentado em 7 e 45 vezes quando uma ou as duas regiões analisadas de tecido, respectivamente, são positivas para esse valor. Ao analisar qualitativamente o KLK2 em sangue periférico por RT-PCR *semi-nested* (presença ou ausência do gene) foi possível separar indivíduos com CaP de indivíduos com HPB, detectando-se um risco aumentado de 6 vezes para a presença do tumor prostático quando a expressão do gene foi detectada. Nesta pesquisa as análises teciduais para o KLK2 apontam 81% de precisão, 86% de sensibilidade, 71.4% de especificidade, 86% de valor preditivo positivo e 71% de valor preditivo negativo. Para os estudos em sangue periférico foram obtidos: 67% de precisão, 59% de sensibilidade, 82% de especificidade, 87% de valor preditivo positivo e 50% de valor preditivo negativo. A análise conjunta dos dados permite propor um novo rastreamento clínico e molecular para o tumor prostático. O diagnóstico molecular do CaP, considerando sangue e biópsia, tem 92% de precisão, considerando a detecção no sangue e nas biópsias. Quando combinados com o PSA sorológico e o anátomo-patológico este acerto tende a tornar-se maior e mais seguro.

## ABSTRACT

The prostate cancer (PCa) has become one of the most important and common diseases in elderly men. It is the second diagnosed cancer in Brazil and in USA after the melanoma cancer. The tracing of prostatic anomalies is done by physical examination (digital exam), laboratory analysis of the prostate specific antigen (PSA) and the trans-rectum ultrasound, followed by confirmatory biopsies. The molecular markers utilization in clinical procedures may improve the diagnosis through an early detection of prostate cancer, increasing the chance of cure. This investigation aimed analysing gene expression levels of KLK2 and KLK3 (PSA) in both peripheral blood and prostate biopsies of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH). A semiquantitative multiplex RT-PCR was used to estimate transcriptional levels of KLK2 and KLK3 genes in prostate tissues, for which it has been demonstrated that only KLK2 was able to discriminate PCa from BPH. Clinical applications of this result may have important implications to the diagnostics. A 0.6 borderline limit (greater than 60% of the constitutive gene expression level) in biopsies had an odds ratio of 15, favorable to the tumor development. The borderline limit obtained for one or two biopsies of the same patient presented a risk factor of 7 and 45, respectively. The qualitative analysis to the KLK2 in the peripheral blood by semi-nested RT-PCR (presence or absence) has allowed discrimination between PCa and BPH patients, with a calculated risk 6 times greater for the tumor presence. This work of KLK2 expression levels in prostate tissues had an estimated accuracy of 81%, sensisitivity of 86%, specificity of 71.4%, predictive positive value of 86%, and predictive negative value of 71%. In the peripheral blood the precision was 67%, sensitivity of 59%, specificity of 82%, predictive positive value of 87% and predictive negative value of 50%. The combined analysis of the KLK2 in blood and biopsies has permitted a new proposal for clinical examination routine. The molecular diagnostic had a precision of 92%, considering the detection in blood and in biopsies. The association of serum PSA, histological analyses and molecular markers may provide a more accurate diagnostic.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) tem se manifestado como uma das causas mais comuns de doenças entre homens mais velhos. É o segundo tipo de câncer mais diagnosticado nos Estados Unidos e no Brasil após o câncer de pele, não melanoma (Griffiths & Morton 1999, INCA 2002) e a segunda causa de morte em homens (Coffey 1993, Albright & Eeles 1995) depois do câncer de pulmão (Griffiths & Morton 1999).

O rastreamento de anomalias prostáticas é realizado principalmente por três etapas: o exame físico da próstata (toque retal), dosagem do antígeno próstata específico (PSA) e ultra-sonografia da próstata transretal. Caso exista alguma anomalia prostática é indicado aos pacientes biópsia. Quando o tumor é detectado nas biópsias é de fundamental importância o estadiamento clínico e o resultado histopatológico dos pacientes para o planejamento terapêutico adequado.

O PSA (antígeno próstata específico) foi caracterizado como uma glicoproteína de 30 a 36 KDa, em 1979, em tecido prostático normal, hiperplásico e tumoral, líquido seminal, e em sangue de pacientes com câncer de próstata (Wang *et al.* 1979, Wang *et al.* 1981). A proteína é secretada no lúmen dos ductos prostáticos e está presente em altos níveis no plasma seminal (Wang *et al.* 1979), contudo não é exclusiva da próstata (Diamandis & Yu 1997). Foram encontradas quantidades mínimas extra prostática (Diamandis & Yu 1995, Diamandis & Yu 1997, Diamandis 1998). Entretanto, a interferência do PSA extra prostático em análises clínicas do câncer de próstata, análises sorológicas e imunohistoquímicas, parece ser mínima (Rittenhouse *et al.* 1998).

Os maiores focos de estudos das funções do PSA são no líquido seminal devido sua presença em altas concentrações (Wang *et al.* 1979).

Acredita-se que o PSA tenha funções na liquefação do coágulo seminal após a ejaculação participando da rápida hidrólise da seminogelina I, II e fibronectina (Lilja 1987, Lilja *et al.* 1989). Também tem mostrado ser capaz de clivar e inativar o IGFBP-3 (fator de crescimento tipo insulina ligado a proteína 3) (Cohen *et al.* 1992) e portanto, indiretamente, estimular o crescimento de tumor por disponibilizar outros fatores de crescimento. Em contraste, outros trabalhos apontam o PSA como uma molécula inibidora de crescimento celular, anticarcinogênica, indutora de apoptose e portanto, uma molécula supressora de tumor (Diamandis 2000, Diamandis *et al.* 2000).

O PSA faz parte do grupo das calicreínas que são serino proteases encontradas em diversos tecidos e fluidos biológicos (Bhoola *et al.* 1992, Yousef & Diamandis 2001). As calicreínas são classificadas em dois grupos principais (Fiedler 1979, Movat 1979): a calicreína plasmática e as calicreínas teciduais. As teciduais compõem uma família multigênica, para a qual quinze genes já foram descritos (Diamandis *et al.* 2000, Yousef *et al.* 2000, Yousef & Diamandis 2001), que apresentam similaridades gênicas e proteicas (Diamandis *et al.* 2000, Yousef & Diamandis 2001).

Dentre esses quinze genes, três foram mais bem caracterizados: o KLK1 (codifica a hK1 ou calicreína pancreática/renal), o KLK2 (codifica a hK2 ou calicreína glandular humana 1) e o KLK3 (codifica a hK3 ou PSA) (Evans *et al.* 1988, Riegman *et al.* 1989, Qin *et al.* 1991, Richards *et al.* 1991, Riegman *et al.* 1992).

Assim como o PSA, a hK2 não é apenas encontrada no tecido prostático, foi estudada em mama, tireóide, glândulas salivares e diversos fluidos biológicos (Catalona *et al.* 1991, Lövgren *et al.* 1999, Magklara *et al.* 1999, Black *et al.* 2000). É capaz de clivar seminogelina I, II e fibronectina (Deperthes *et al.* 1996), e também tem mostrado ser capaz de atuar, mais rapidamente que o PSA, sobre os IGFbps (fatores de crescimento tipo

insulina ligados a proteínas) sugerindo funções similares àquelas sugeridas para o PSA (Dube & Tremblay 1997). A hK2 ativa *in vitro* a forma zimogênica do uPA (ativador plasminogênio tipo urocinase) sugerindo ter influência na cascata proteolítica extracelular das células tumorais prostáticas (Frenette *et al.* 1997, Takayama *et al.* 1997), visto que o uPA está associado com a invasão do câncer de próstata e metástase (Achbarou *et al.* 1994, Lyon *et al.* 1995). É também possível que a hK2 exiba função fisiológica sinérgica na regulação da ativação do PSA, pois ela é capaz *in vitro* de ativar a pró-forma do PSA transformando-a em PSA maduro (Kumar *et al.* 1997, Lövgren *et al.* 1997, Takayama *et al.* 1997).

A busca por marcadores moleculares que possam auxiliar no rastreamento de anomalias prostáticas é de fundamental importância, haja visto que, atualmente os métodos são invasivos e envolvem o preconceito masculino, o que dificulta a chance de um diagnóstico precoce. Portanto, este trabalho tem por objetivos: estudar a expressão dos genes KLK2 e KLK3 em tecido prostático e do gene KLK2 em sangue periférico de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma prostático (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB), e avaliar se esses genes são potenciais marcadores moleculares para aplicação no rastreamento clínico de anomalias prostáticas.

## 2. PACIENTES E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção das amostras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU, número 005/2001 (Anexo 3). As amostras de sangue periférico e tecido prostático foram coletadas no Hospital de Clínicas da UFU pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia, mediante autorização dos pacientes, os quais assinaram um Termo de Consentimento (Anexo 4). O procedimento de coleta foi realizado dentro da rotina do setor cirúrgico, sem causar desconforto adicional aos pacientes.

Após coleta, o material foi levado para o Laboratório de Genética Molecular da UFU e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior processamento. Todas as técnicas de manipulação do material biológico seguiram as normas do Código de Ética Médica. Os pacientes foram identificados por seus números de prontuários.

No presente trabalho foram estudados 42 pacientes, sendo 14 HPB, 15 CaP localizado (de pT1a a pT2c) e 13 CaP metastático (de pT3a a pT4b) com idade média de 69 anos (estadiamento dos adenocarcinomas-Anexo 1). Para cada paciente foram retirados fragmentos de duas regiões adjacentes da próstata, escolhidos macroscopicamente, obtidos após os procedimentos cirúrgicos. Dos 84 tecidos analisados, 56 tecidos tinham alterações morfológicas (adenocarcinoma prostático), obtidos por prostatectomia radical, e 28 tinham alterações benignas na próstata (HPB), obtidos a partir de ressecção transuretral da próstata (RTU).

Além disso, dos 42 indivíduos que tiveram seu tecido analisado, 33, dos quais 11 eram HPB e 22 adenocarcinoma, tiveram sangue periférico pré-operatório coletado em tubo tipo *vacutainer*<sup>TM</sup> contendo  $\text{K}_2\text{EDTA}$  7.2 mg.

## 2.2. Extração de RNA total de Sangue Periférico e Tecido

O RNA (ácido ribonucléico) total foi extraído da camada de leucócitos de sangue periférico e macerado de tecido, utilizando-se o Reagente TRIZOL (INVITROGEN), conforme protocolo otimizado no Laboratório de Genética Molecular da UFU e segundo recomendações do fabricante (Anexo 5).

O padrão do RNA foi verificado em gel de agarose 1,2% por 1,0 hora a 100 Volts em tampão TBE 0,5X (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0), corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio e, em seguida, visualizado no sistema de videodocumentação-VDS (PHARMACIA BIOTECH).

A quantificação do RNA foi realizada no espectrofotômetro Ultrospech 1000 de luz ultravioleta (PHARMACIA) a um comprimento de onda de 260 nm. Após visualização, o material foi estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.3. RT-PCR Multiplex Semi-quantitativa no Tecido Prostático

### 2.3.1. Transcrição Reversa (RT-síntese do cDNA)

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra de RNA obtida do tecido prostático, utilizando 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, 10 U (unidade) de inibidor de RNase (INVITROGEN), 40 U de MMLV-RT (AMERSHAM PHARMACIA), 1x de Tampão da MMLV-RT (AMERSHAM PHARMACIA), 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfato-dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 6  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. O volume final de cada reação foi completado para 20  $\mu\text{L}$  com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ RESEARCH INC.) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora e aquecida a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para desnaturação

do híbrido RNA-cDNA e também para inativação da enzima MMLV-RT. Uma reação controle foi realizada utilizando água ao invés de RNA para verificar possíveis contaminantes provenientes dos reagentes.

Após a transcrição reversa, as amostras foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior amplificação.

### **2.3.2. PCR multiplex Semi-quantitativa (co-amplificação do cDNA por PCR-reação em cadeia da polimerase)**

O produto da transcrição reversa (cDNA) foi co-amplificado por PCR utilizando-se dois diferentes pares de *primers*, desenhados para terem homologia apenas com o RNAm do gene em estudo (KLK2 ou KLK3) e do gene constitutivo  $\beta$ -2 microglobulina.

O gene constitutivo foi utilizado como controle interno da reação para caracterizar a qualidade do RNA e da reação, além de normalizar os níveis de expressão do gene alvo.

#### **2.3.2.1. PCR multiplex Semi-quantitativa para o RNAm do gene KLK2**

O produto da transcrição reversa (cDNA) foi co-amplificado por PCR em termociclador PTC-100 (MJ RESEARCH INC.). Para cada reação foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  de cDNA, sintetizados na transcrição reversa, 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (AMERSHAM PHARMACIA); 0,4  $\mu\text{M}$  do par de *primer* KLK2 e 0,96  $\mu\text{M}$  do par de *primer*  $\beta$ -2M (Tabela 1.1), 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$  (PROMEGA); 1,5 U de Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA); 1x do tampão da Taq (PHONEUTRIA) e o volume final foi completado para 25  $\mu\text{L}$  com água ultra-pura. A mistura foi aquecida a  $95^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, seguida de 29 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $59^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos e  $72^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos e uma extensão final de 10 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . A reação de controle foi realizada

seguinte os mesmos procedimentos citados acima, só que com 2  $\mu$ L provenientes da reação de controle negativo da RT.

**Tabela 1.1.:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores da PCR para os genes KLK2 (*primer* KLK2) e  $\beta$ 2 – microglobulina (*primer*  $\beta$ -2 M).

<i>Primers</i>	Sequência 5' – 3'	Regiões de anelamento dos <i>primers</i>	Fragmento esperado
$\beta$ -2 M * <sup>1</sup> :			
<i>sense</i>	AGC AGA GAA TGG AAA GTC AAA	Exon 2	534 pb
<i>Antisense</i>	TGT TGA TGT TGG ATA AGA GAA	Exon 4	
<b>KLK2:</b>			341 e 378 pb
<i>Sense</i> * <sup>2</sup>	CAG CAT CGA ACC AGA GGA GT	Exon 3	* <sup>4</sup>
<i>Antisense</i> * <sup>3</sup>	ACT AGA GGT AGG GGT GGG AC	Exon 5	

\*<sup>1</sup>: seqüências dos *primers* descritas por Bussemakers *et al.* 1999.

\*<sup>2</sup>: desenhado no laboratório por meio do software Primer Designer (versão 2.0) e do software OligoTech (versão 1.0).

\*<sup>3</sup>: seqüência de *primer* descrita por Gan *et al.* 2000.

\*<sup>4</sup>: o fragmento de 378 pb é resultado do *splicing* alternativo descrito por Riegman *et al.* 1991.

Para realização da PCR multiplex semi-quantitativa, foi necessário determinar o número ideal de ciclos de PCR para que a co-amplificação estivesse na fase exponencial e para isso foram feitas reações, de dois pacientes com CaP escolhidos ao acaso, variando o número de ciclos de 25 a 31. A mistura foi amplificada conforme descrito acima e os tubos das reações foram sendo retirados do termociclador, em duplicatas, nos respectivos ciclos: 25, 27, 29 e 31. Todos os tubos foram recolocados no termociclador para uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Após a co-amplificação, 10  $\mu$ l de cada produto de PCR misturados com 2 $\mu$ L de *loading dye* (12,5 mg de azul de bromofenol, 4,0 g de sacarose e

5,0 mL de água) foram analisados, por eletroforese, em gel de agarose 2,0% por 1,5 hora a 100 volts em tampão TBE 0,5x (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados com 0,5 mg/mL de brometo de etídio e, em seguida, visualizados e fotografados pelo sistema de videodocumentação-VDS (PHARMACIA BIOTECH).

### 2.3.2.2. PCR multiplex Semi-quantitativa para o RNAm do gene KLK3

O produto da transcrição reversa (cDNA) foi co-amplificado por PCR em termociclador PTC-100 (MJ RESEARCH INC.) nas mesmas condições de reação utilizadas para a PCR multiplex semi-quantitativa do KLK2. As seqüências dos primers estão nas tabelas 1.1 e 1.2.

**Tabela 1.2.:** Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores da PCR para o gene KLK3 (*primer KLK3*).

<i>Primers</i>	<i>Seqüência 5' – 3'</i>	<i>Regiões de anelamento dos primers</i>	<i>Fragmento esperado</i>
<b>KLK3</b> * <sup>1</sup> :			
<i>Sense</i>	TCC AAT GAC GTG TGT GCG CA	Exon 4	226 pb
<i>Antisense</i>	CCT TGA TCC ACT TCC GGT AA	Exon 5	

\*<sup>1</sup>: seqüências dos *primers* descritas por Jaakkola *et al.* 1995.

Os mesmos procedimentos usados para a determinação da fase exponencial para o semi-quantitativo do KLK2 foram usados para o KLK3.

Após a co-amplificação, 10 µL de cada produto de PCR misturados com 2µL de *loading dye* (12,5 mg de azul de bromofenol, 4,0 g de sacarose e 5,0 mL de água) foram analisados, por eletroforese, em gel de agarose 1,5 % por 45 min a 100 volts em tampão TBE 0,5x (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados com 0,5 mg/mL

de brometo de etídio e, em seguida, visualizados e fotografados pelo sistema de vídeodocumentação-VDS (PHARMACIA BIOTECH).

### 2.3.3. Densitometria Ótica

Os amplicons gerados a partir das amostras de adenocarcinoma e de HPB, tanto para os genes KLK2 e KLK3 como para o gene  $\beta$ -2 microglobulina foram analisados e quantificados, quanto as suas densidades óticas, no programa *Image Master VDS Software* versão 2.0, e as leituras foram submetidas à razão de RNAm do gene em estudo (KLK2 ou KLK3) pelo RNAm da  $\beta$ -2 microglobulina para obter a abundância relativa do gene estudado (KLK2 ou KLK3) nas amostras.

## 2.4. RT-PCR *Semi-nested* em Sangue Periférico

### 2.4.1. Transcrição Reversa (RT-síntese do cDNA)

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra de sangue conforme descrito para a RT-PCR multiplex semi-quantitativa no tecido.

O uso de *primers* randômicos na transcrição reversa permite que a mesma reação usada para detectar o gene de interesse (KLK2) seja usada na amplificação do gene constitutivo ( $\beta$ -2 microglobulina). Desta forma é possível saber a qualidade do RNA utilizado, bem como se a reação de RT foi satisfatória.

Após a transcrição reversa, as amostras foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior amplificação.

#### 2.4.2. PCR-Out (primeira amplificação por PCR)

O produto da transcrição reversa (cDNA) foi amplificado por PCR utilizando-se *primers-out* (externos) para o gene KLK2 (Tabela 1.1). Para cada reação, 2  $\mu\text{L}$  de cDNA foram amplificados em um volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (AMERSHAM PHARMACIA); 0,4  $\mu\text{M}$  do par de *primer* externo, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (PROMEGA); 1,5 U de Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA); 1x do tampão da Taq (PHONEUTRIA) e o volume final foi completado com água ultra-pura. A mistura foi aquecida a 95°C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos a 95°C por 30 segundos, 66°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. A reação controle negativo foi realizada a partir de 2  $\mu\text{L}$  da reação controle da RT.

Todas as amostras foram amplificadas para o gene constitutivo  $\beta$ -2 microglobulina em um volume final de 25  $\mu\text{L}$  de reação, utilizando-se 2  $\mu\text{L}$  provenientes da RT, 0,4  $\mu\text{M}$  do par de *primer*  $\beta$ -2 M (Tabela 1.1), 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (AMERSHAM PHARMACIA); 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (PROMEGA); 1,5 U de Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA); 1X do tampão da Taq (PHONEUTRIA) e o volume final foi completado com água ultra-pura. A mistura foi aquecida a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação do gene constitutivo, 10  $\mu\text{L}$  de reação, misturados com 2  $\mu\text{L}$  de *loading dye* (12,5 mg de azul de bromofenol, 4,0 g de sacarose e 5,0 mL de água), foram analisados, por eletroforese, em gel de agarose 1,5 % por 45 min a 100 volts em tampão TBE 0,5x (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados com

0,5 mg/mL de brometo de etídio e, em seguida, visualizados e fotografados pelo sistema de videodocumentação-VDS (PHARMACIA BIOTECH).

### 2.4.3. PCR *Semi-nested* (segunda amplificação por PCR)

O produto resultante da primeira amplificação para o gene KLK2, foi reamplificado por PCR utilizando-se um *primer* interno (*Semi-nested*) aos fragmentos (Tabela 1.3). No *Semi-nested* utiliza-se, portanto, o *primer antisense* usado na PCR-*Out* e um *primer sense* que anela mais interno ao *primer out*.

**Tabela 1.3.:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores da PCR *Semi-nested* para o gene KLK2.

<i>Primers</i>	Sequência 5' – 3'	Regiões de anelamento dos <i>primers</i>	Fragmento esperado
<i>Semi-nested</i> * <sup>1</sup> :			324 e 361 pb
<i>Sense</i>	AGT TCT TGC GCC CCA GGA GT	Exon 3 e Exon 4	* <sup>2</sup>
<i>Antisense</i>	ACT AGA GGT AGG GGT GGG AC		

\*<sup>1</sup>: sequência dos *primers* descritas por Gan *et al.* 2000.

\*<sup>2</sup>: o fragmento de 361 pb é resultado do *splicing* alternativo descrito por Riegman *et al.* 1991.

Para cada reação, 2 µL de produto foram amplificados em um volume final de 25 µL contendo: 200 µM cada de dNTP (AMERSHAM PHARMACIA); 0,4 µM para o par de *primers Semi-nested*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (PROMEGA); 1,5 U de Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA); 1x do tampão da Taq (PHONEUTRIA) e o volume final completado com água ultra-pura. A mistura foi aquecida a 95°C por 3 minutos, seguida de 20 ciclos a 95°C por 30 segundos, 62°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. A reação controle negativo foi realizada a partir de 2 µL da reação controle para a PCR-*Out*.

Para calibrar o número ideal de ciclos a serem utilizados na PCR *Semi-nested*, afim de que os indivíduos com doenças benignas na próstata dessem resultados negativos para a detecção do RNAm KLK2 circulante, foram feitas reações de PCR, de pacientes com CaP e com HPB escolhidos ao acaso, variando o número de ciclos de 20 a 35. A mistura foi amplificada conforme descrito acima, e os tubos de reações foram sendo retirados do termociclador nos respectivos ciclos: 20, 25, 30 e 35. Todos os tubos foram recolocados no termociclador para uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, 10 µL do produto de PCR foram misturados com 2 µL de *loadind dye* (12,5 mg de azul de bromofenol, 4,0 g de sacarose e 5,0 mL de água) e analisados por eletroforese em gel 2,0 % de agarose (AMERSHAM PHARMACIA) por 1,0 hora a 100 volts em tampão TBE 0,5x (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados com 0,5 mg/mL de brometo de etídio e, em seguida, visualizados e fotografados no sistema *Video Documentation System-VDS* (PHARMACIA BIOTECH).

## 2.5. Análise Estatística dos Dados

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para testar normalidade dos dados das amostras de tecido (CaP e HBP, n=42) para os genes KLK2 e KLK3.

Aplicou-se regressão logística para determinar se os valores de densidade ótica média, obtidas no tecido de cada paciente para o KLK2 e o KLK3, são capazes de prever o CaP, ou seja, qual dos marcadores é capaz de separar os grupos CaP e HPB, bem como estadiar o CaP em localizado ou metastático. Também foi usada para determinar se os dados obtidos no sangue, quanto a presença ou ausência, para o marcador KLK2, bem como os valores do PSA bioquímico, dado obtido do prontuário dos pacientes, são

capazes de separar os grupos CaP e HPB ou estadiar o CaP. Utilizou-se também a regressão logística para combinar os dados obtidos no sangue periférico e no tecido para determinar qual o valor final do diagnóstico molecular.

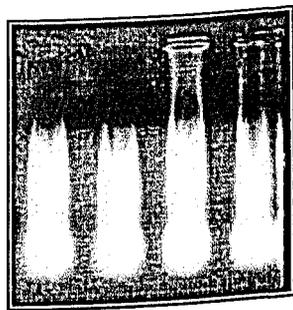
Após essas análises foi feito o teste de médias Kruskal-Wallis para verificar se as abundâncias relativas de expressão dos genes nas amostras prostáticas CaP e HPB diferem entre si. Os valores de  $p$  menores que 0.05 foram considerados significantes.

Baseando-se nos resultados da abundância relativa dos genes KLK2 e KLK3 em tecido prostático e das análises para a presença do gene KLK2 em sangue periférico dos pacientes foi calculado o risco relativo (*odds ratio*-OR) para verificar a chance dos indivíduos em desenvolverem o adenocarcinoma prostático.

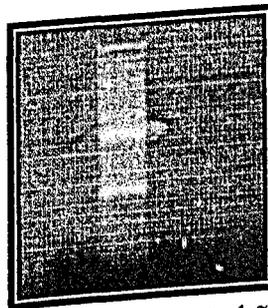
Considerando os resultados anátomo-patológicos (TNM) (Anexo 1), responsáveis pelo diagnóstico final (CaP ou HPB), foram realizados testes para determinar a precisão (P), sensibilidade (S), especificidade (E), o valor preditivo positivo (VP+) e negativo (VP-) das técnicas moleculares propostas neste trabalho frente ao aconselhamento clínico (Anexo 6).

### 3. RESULTADOS

O padrão do RNA obtido para as amostras foi de boa qualidade, apresentando baixa ou nenhuma contaminação por DNA (Figuras 1.1 e 1.2). Não foi necessário tratar o RNA com a enzima DNase, uma vez que os *primers* anelam em exons diferentes, intercalados com um íntron extenso, ou iniciam o anelamento de alguns nucleotídeos na porção final de um exon e início de outro. Desta forma há amplificação seletiva do RNAm, excluindo o DNA.

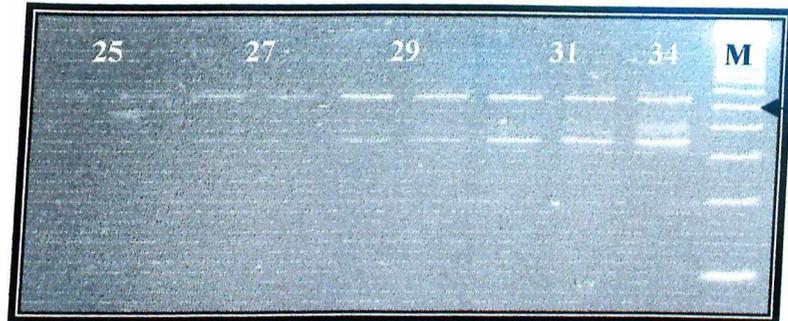


**Figura 1.1.:** Padrão eletroforético do RNA total extraído de tecidos prostáticos.

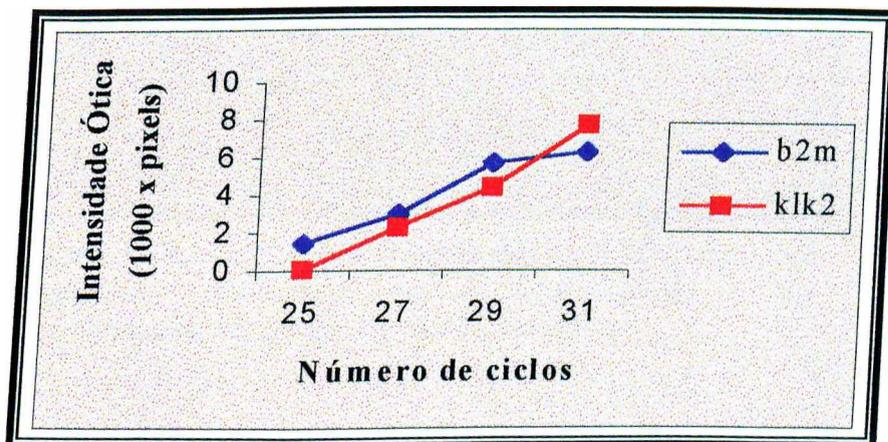


**Figura 1.2.:** Padrão eletroforético do RNA total extraído de sangue periférico.

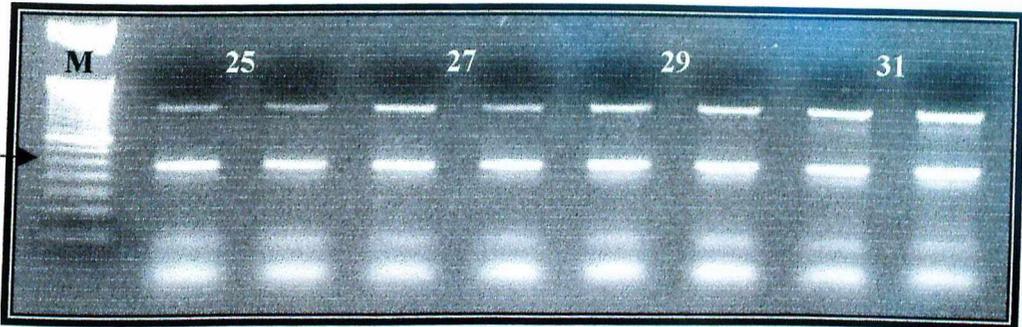
O número de ciclos escolhido, para a realização da RT-PCR multiplex Semi-quantitativa, para ambos os genes *KLK2* e *KLK3* no tecido prostático foi 29. Como observado nas figuras 1.3 A e B para o gene *KLK2* e nas figuras 1.4 A e B para o *KLK3*, até 31 ciclos a amplificação encontra-se em fase exponencial.



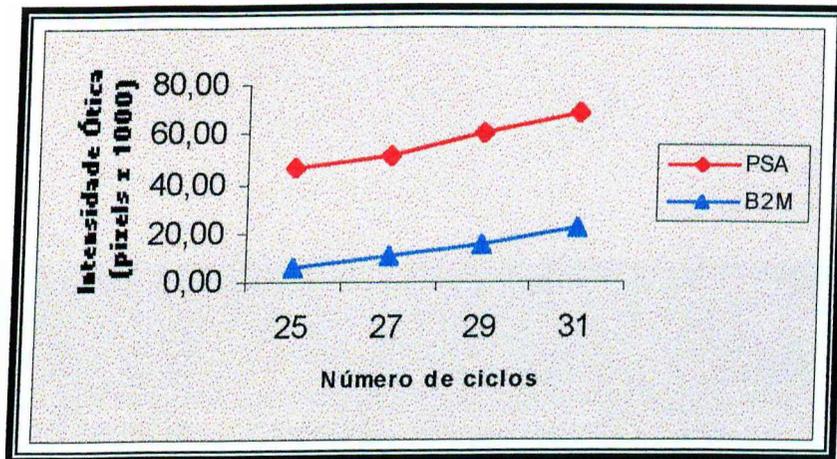
**Figura 1.3A.:** Otimização do número de ciclos da PCR para a realização da RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK2 em tecido prostático. Reações em duplicatas aumentando o número de ciclos: 25, 27, 29, 31 e apenas uma reação de 34 ciclos. M: representa o marcador molecular de 100pb, e a seta está posicionada no fragmento de 500pb do marcador. O fragmento da  $\beta$ -2 microglobulina é de 534pb e do KLK2 de 341 e 378pb.



**Figura 1.3B.:** Gráfico com a média das densidades óticas dos fragmentos amplificados para os genes KLK2 e  $\beta$ -2 microglobulina versus número de ciclos de PCR.

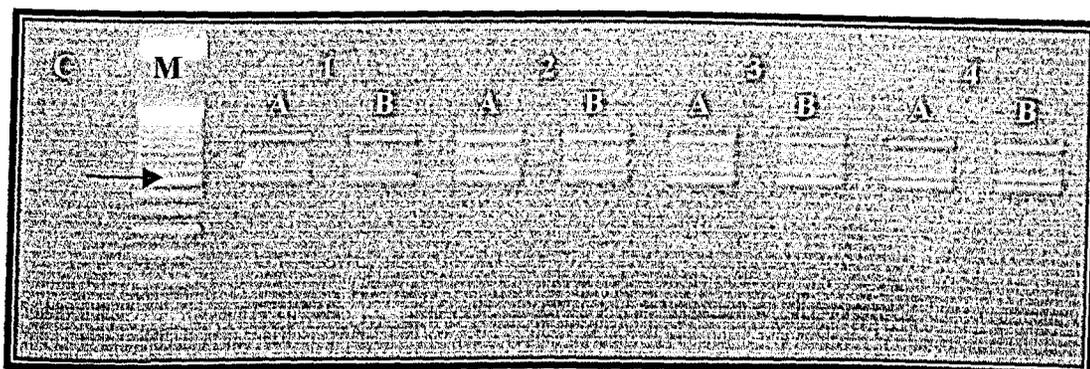


**Figura 1.4A.:** Otimização do número de ciclos da PCR para a realização da RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK3 em tecido prostático. Reações em duplicatas aumentando o número de ciclos: 25, 27, 29, 31. M: representa o marcador molecular de 50pb e a seta está posicionada no fragmento de 250pb do marcador. O fragmento da  $\beta$ -2 microglobulina é de 534pb e do KLK3 de 226pb.

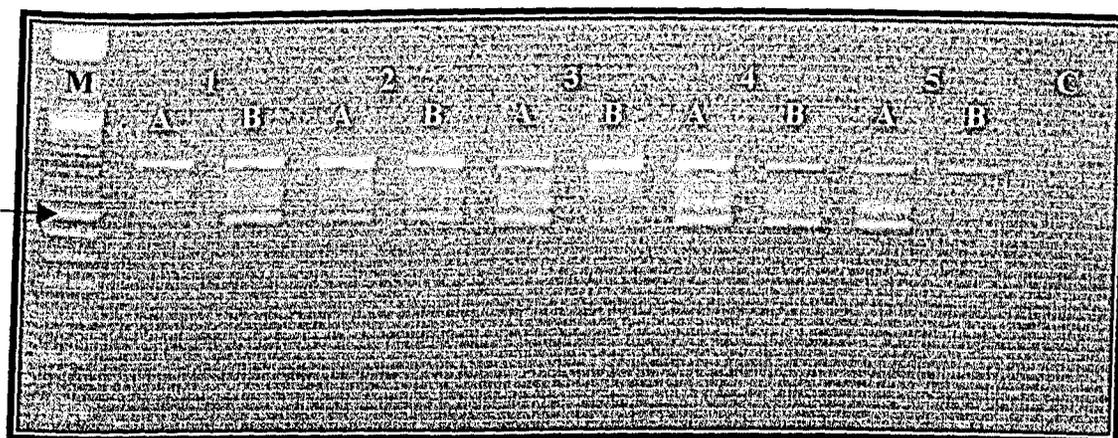


**Figura 1.4B.:** Gráfico com a média das densidades óticas dos fragmentos amplificados para os genes KLK3 e  $\beta$ -2 microglobulina versus número de ciclos de PCR.

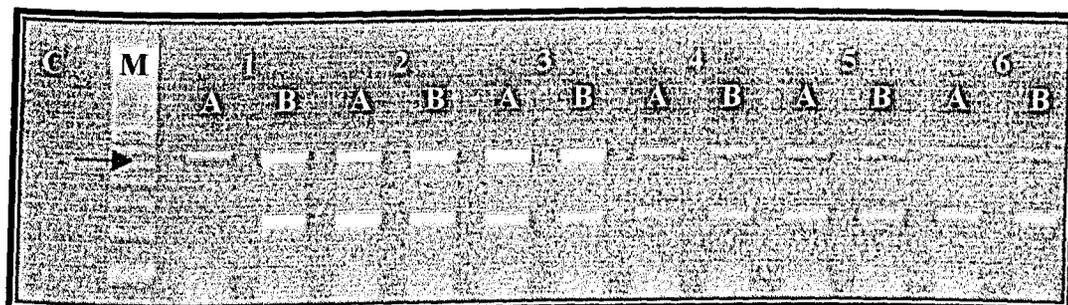
As figuras 1.5 A e B mostram, respectivamente, a RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK2 para duas regiões de tecido prostático de pacientes com CaP e HPB. Já nas figuras 1.6 A e B estão representados, da mesma forma que para o KLK2, os resultados para o gene KLK3.



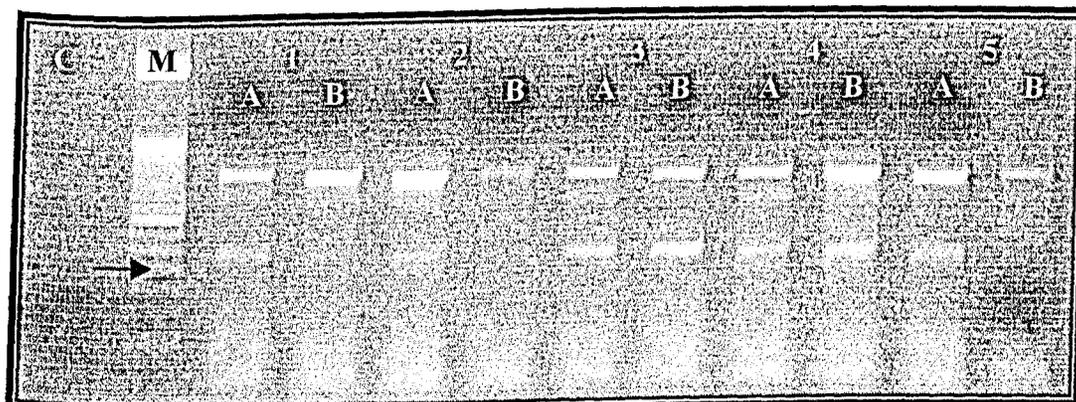
**Figura 1.5A.:** RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene *KLK2* para duas regiões analisadas de tecido prostático de pacientes com CaP. Cada número, 1 a 4, representa um paciente com suas duas regiões prostáticas analisadas, representadas por A e B. M: representa o marcador molecular de 50pb e a seta está posicionada no fragmento de 350pb do marcador. C: representa o controle negativo de reação. O gene *KLK2* corresponde aos fragmentos de 341 e 378pb e a  $\beta$ -2 microglobulina de 534pb.



**Figura 1.5B.:** RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene *KLK2* para duas regiões analisadas de tecido prostático de pacientes com HPB. Cada número, 1 a 5, representa um paciente com suas duas regiões prostáticas analisadas, representadas por A e B. M: representa o marcador molecular de 50pb e a seta está posicionada no fragmento de 350pb do marcador. C: representa o controle negativo de reação. O gene *KLK2* corresponde aos fragmentos de 341 e 378pb e a  $\beta$ -2 microglobulina de 534pb.



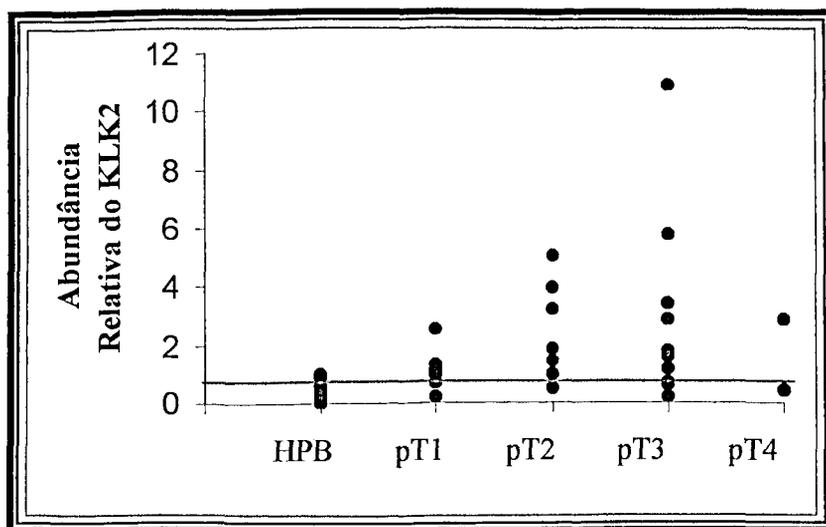
**Figura 1.6A.:** RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK3 para duas regiões analisadas de tecido prostático de pacientes com CaP. Cada número, 1 a 6, representa um paciente com suas duas regiões prostáticas analisadas, representadas por A e B. M: representa o marcador molecular de 100pb e a seta está posicionada no fragmento de 500pb do marcador. C: representa o controle negativo de reação. O gene KLK3 corresponde ao fragmento de 226pb e a  $\beta$ -2 microglobulina de 534pb.



**Figura 1.6B.:** RT-PCR multiplex Semi-quantitativa do gene KLK3 para duas regiões analisadas de tecido prostático de pacientes com HPB. Cada número, 1 a 5, representa um paciente com suas duas regiões prostáticas analisadas, representadas por A e B. M: representa o marcador molecular de 50pb e a seta está posicionada no fragmento de 200pb do marcador. C: representa o controle negativo de reação. O gene KLK3 corresponde ao fragmento de 226pb e a  $\beta$ -2 microglobulina de 534pb.

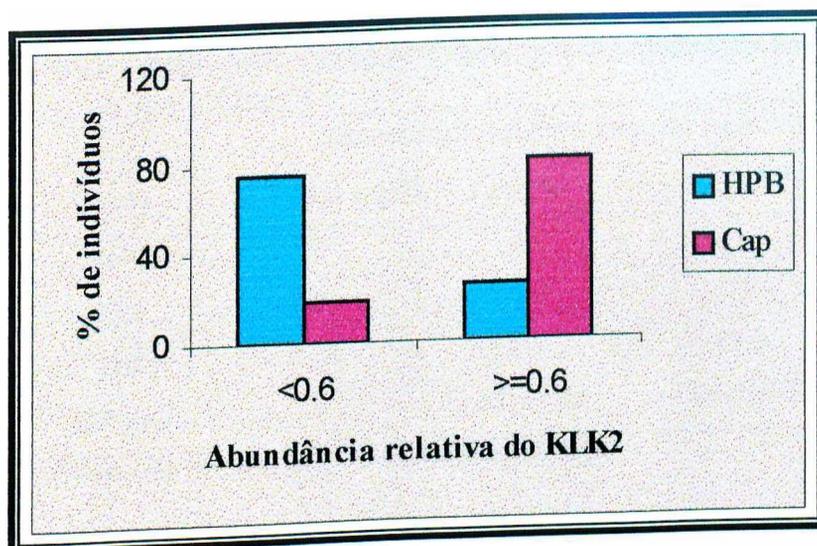
Os valores obtidos para abundância relativa de expressão dos genes KLK2 e KLK3 não apresentam distribuição normal (KLK2,  $p < 0.0001$ ; KLK3,  $p = 0.0019$ ).

Ao analisar, por regressão logística, os valores de densidade ótica média de cada paciente, obtidas no tecido, para o KLK2 e o KLK3, obteve-se que apenas o KLK2 foi um bom marcador para predizer o CaP nos pacientes (KLK2  $p = 0.00001$ ; KLK3  $p = 0.07981$ ). Entretanto, este marcador não foi hábil para estadiar o tumor em localizado ou metastático (KLK2  $p = 0.45$ ). As figuras 1.7A e B representam a distribuição dos pacientes, quanto a abundância relativa média dos genes KLK2 e KLK3, nos estadiamentos do tumor (pT1, pT2, pT3 e pT4) e no HPB.



**Figura 1.7A.:** O gráfico representa a distribuição dos indivíduos com CaP, nos estadiamentos do tumor (pT1, pT2, pT3 e pT4), e com HPB quanto a abundância relativa média do KLK2. A linha em vermelho representa o ponto de corte de 0.6.





**Figura 1.8.:** Gráfico da abundância relativa média do gene KLK2 versus a frequência de indivíduos classificados para o valor de corte 0.6.

**Tabela 1.4.:** Risco relativo ao desenvolvimento do câncer de próstata relacionado a abundância média relativa do gene KLK2.

Classe	Abundância relativa do gene KLK2	
	< 0.6	≥ 0.6
HPB (n)	10	4
CaP (n)	4	24
OR	1.00	15.0
95 % IC		(3.12-72.10)

OR-odds ratio (risco relativo), IC-intervalo de confiança.

**Tabela 1.5.:** Risco relativo ao desenvolvimento do câncer de próstata envolvendo regiões prostáticas que apresentam abundância relativa do KLK2  $\geq 0.6$ .

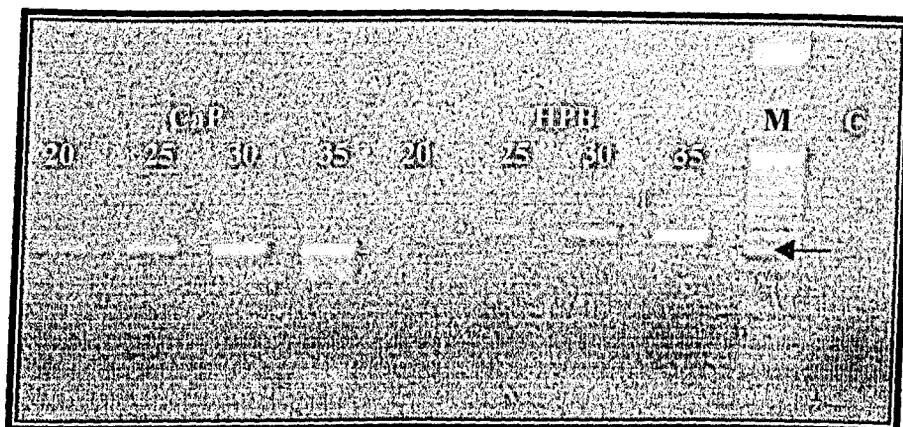
Classe	Abundância relativa do gene KLK2 $\geq 0.6$		
	nenhuma região	1 região	2 regiões
HPB	9	4	1
CaP	3	10	15
OR	1.00	7.5	45.0
95% IC		(1.30-43.02)	(4.04-500.71)

OR-*odds ratio* (risco relativo), IC-intervalo de confiança.

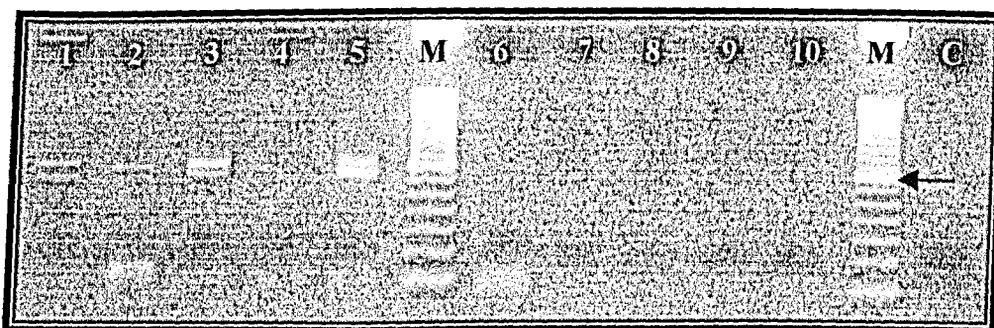
Com a utilização do ponto de corte 0.6, obteve-se para a técnica 81% de precisão, 86% de sensibilidade, 71.4% de especificidade, 86% de valor preditivo (+) e 71% de valor preditivo (-). Para os cálculos, os pacientes foram classificados de acordo com os valores médios obtidos para a abundância relativa do KLK2 (Tabela 1.4 e Anexo 6).

O número de ciclos escolhido para a PCR *Semi-nested*, quanto a presença ou ausência do gene KLK2 em sangue periférico de pacientes com CaP ou HPB, foi 20 (Figura 1.9). Como mostrado, em número de ciclos maiores do que este detectava-se a presença do gene em todos os indivíduos com qualquer alteração prostática não sendo possível a separação dos indivíduos com tumor dos com HPB.

As figuras 1.10 e 1.11 representam, respectivamente, os resultados obtidos em sangue periférico quanto a expressão diferencial do KLK2 em pacientes com CaP ou com HPB, e a amplificação do gene constitutivo para os mesmos indivíduos validando a reação. De 33 sangues analisados, 15 deram resultados positivos, sendo 2 hiperplasias, 7 CaP localizados e 6 CaP metastáticos. Obteve-se 50% de falsos negativos no estadiamento pT1 (4 indivíduos), 40% no pT2 (2), 37.5% no pT3 (3) e nenhum em pT4.



**Figura 1.9.:** Otimização do número ideal de ciclos a serem utilizados na PCR *Semi-nested* do gene KLK2 em sangue periférico. O aumento do número de ciclos (20, 25, 30 e 35) estão representados para um paciente com CaP e outro com HPB. M: representa o marcador molecular de 50pb e a seta está posicionada no fragmento de 350pb do marcador. C: representa o controle negativo de reação. Os fragmentos do KLK2 são de 324 e 361pb.

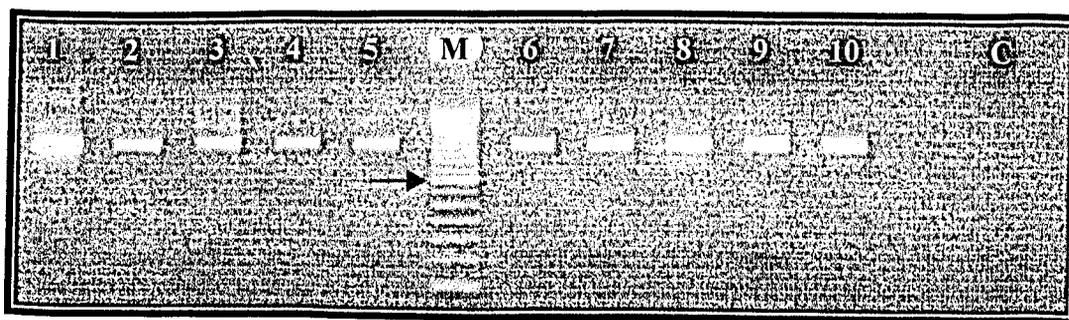


**Figura 1.10.:** PCR *Semi-nested* de sangue periférico do gene KLK2 para indivíduos com CaP ou HPB. Os números de 1 a 5 representam os pacientes com CaP e os de 6 a 10 com HPB. M: representa o marcador molecular de 50pb e a seta está posicionada no fragmento de 350pb do marcador. C: representa o controle negativo de reação. Os fragmentos do KLK2 são de 324 e 361pb.

Após análises dos resultados no sangue, por regressão logística, o KLK2 mostrou-se um bom marcador capaz de separar indivíduos com tumor daqueles com hiperplasia prostática benigna ( $p=0.03627$ ), o que não foi observado na análise para os valores do PSA bioquímico ( $p=0.14$ ). Entretanto, o KLK2 no sangue não é hábil para estadiar o câncer em localizado ou metastático ( $p=0.5491$ ).

Além disso, resultados positivos para a presença do gene KLK2 em circulação indicam um risco aumentado em 6 vezes ao desenvolvimento de tumor prostático (Tabela 1.6).

Para análises clínicas a expressão qualitativa do KLK2 em sangue periférico, por meio da técnica PCR *Semi-nested*, é de 67% de precisão, 59% de sensibilidade, 82% de especificidade, 87% de valor preditivo (+) e 50% de valor preditivo (-). Os cálculos foram baseados nos dados da tabela 1.7 e anexo 6.



**Figura 1.11.:** PCR de sangue periférico do gene constitutivo  $\beta$ -2 microglobulina para indivíduos com CaP ou HPB. Os números de 1 a 5 representam os pacientes com CaP e de 6 a 10 com HPB. M: representa o marcador molecular de 50pb e a seta está posicionada no fragmento de 350pb do marcador. C: representa o controle negativo de reação. O fragmento do gene constitutivo é de 534pb.

**Tabela 1.6.:** Risco relativo ao desenvolvimento do câncer de próstata relacionado a presença do gene KLK2 em sangue periférico.

Classe	Análise do KLK2 em sangue periférico	
	Ausência	Presença
HPB (n)	9	2
CaP (n)	9	13
OR	1.00	6.5
95 % IC		(1.12-37.48)

OR-odds ratio (risco relativo), IC-intervalo de confiança.

A tabela 1.7. apresenta os dados obtidos no tecido para os genes KLK2 e KLK3, no sangue para o KLK2 e o PSA bioquímico, e o estadiamento clínico para cada paciente.

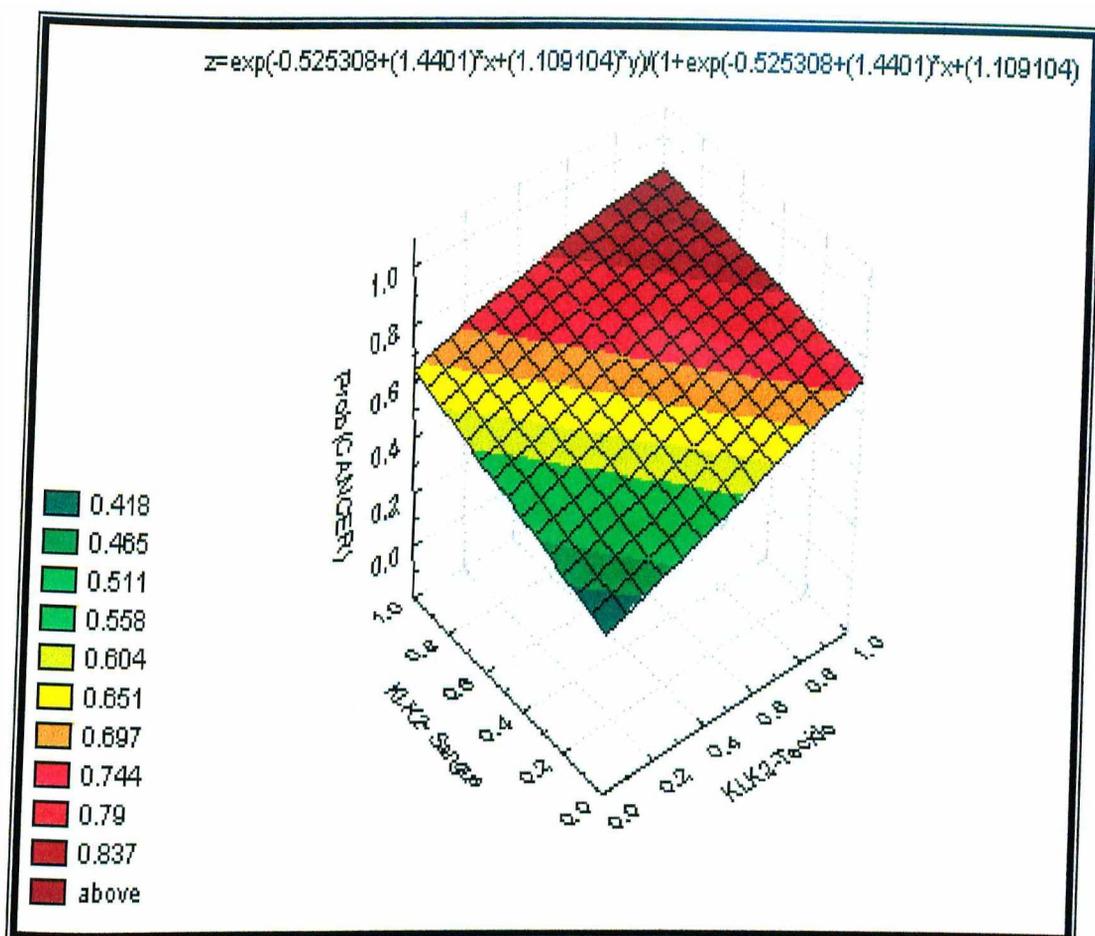
A figura 1.12. representa a regressão logística com os resultados combinados obtidos do sangue e tecido para o KLK2 em pacientes com CaP ou HPB. O diagnóstico molecular final para esses pacientes corresponde a um acerto de 92% do CaP, resultado de 59% de acerto no rastreamento sanguíneo mais 33% de acerto no rastreamento na biópsia (41% de falsos negativos do sangue foram analisados com 81% de precisão no tecido). O pico do gráfico, obtido por regressão logística, representa os 92% de acerto do CaP e a faixa amarela representa 13% de erro da técnica ao detectar falsos positivos (valor preditivo positivo de 87% no sangue).

**Tabela 1.7.:** Dados das análises dos genes KLK2 e KLK3 em tecido, do gene KLK2 e PSA bioquímico no sangue, e o estadiamento clínico para cada paciente.

Paciente	Abundância Relativa do gene KLK2 em tecido prostático	Abundância Relativa do gene KLK3 em tecido prostático	PSA sorológico (ng/mL) *	KLK2 em sangue periférico	Estadiamento Clínico
1	0.9	4.48	12.0	(-)	HPB
2	0.0	0.85	4.0	(-)	HPB
3	0.24	0.55	3.0	(-)	HPB
4	0.46	0.85	2.5	(-)	HPB
5	0.62	2.62	10.7	(-)	HPB
6	0.0	0.0	1.1	(-)	HPB
7	0.1	0.59	18.5	(-)	HPB
8	0.97	3.35	2.5	(+)	HPB
9	0.0	0.02	2.2	(-)	HPB
10	0.14	4.48	2.1	(+)	HPB
11	0.08	2.68	5.4	(-)	HPB
12	0.45	0.59	10.0	DN	HPB
13	0.95	3.87	3.10	DN	HPB
14	0.41	0.99	3.5	DN	HPB
15	1.45	3.47	14.3	(-)	CaP L (pT1)
16	2.49	1.07	5.9	(+)	CaP L (pT1)
17	0.97	4.57	9.6	(+)	CaP L (pT2)
18	0.4	0.85	5.9	(-)	CaP L (pT2)
19	2.5	0.83	6.5	(+)	CaP L (pT1)
20	0.19	1.13	8.8	(-)	CaP L (pT1)
21	0.94	5.2	11.4	(+)	CaP L (pT2)
22	1.32	1.53	5.4	(-)	CaP L (pT1)
23	0.5	3.68	5.3	(-)	CaP L (pT1)
24	0.71	0.5	8.71	(-)	CaP L (pT2)
25	3.19	3.74	22.2	(+)	CaP L (pT1)
26	3.98	5.65	5.0	(+)	CaP L (pT2)
27	1.08	3.14	1.2	(+)	CaP L (pT1)
28	1.83	1.7	5.5	DN	CaP L (pT2)
29	5.02	1.36	6.0	DN	CaP L (pT2)
30	0.2	5.54	5.5	(-)	CaP M (pT3)
31	5.81	1.36	5.7	(+)	CaP M (pT3)
32	1.76	1.55	7.5	(+)	CaP M (pT3)
33	0.38	0.69	7.1	(+)	CaP M (pT4)
34	2.89	2.49	7.18	(+)	CaP M (pT3)
35	3.42	1.15	9.18	(+)	CaP M (pT3)
36	0.63	0.77	18.0	(-)	CaP M (pT3)
37	1.13	1.9	16.5	(+)	CaP M (pT3)
38	1.56	4.61	8.5	(-)	CaP M (pT3)
39	10.9	2.45	7.6	DN	CaP M (pT3)
40	2.88	1.84	13.0	DN	CaP M (pT3)
41	0.66	2.46	47.0	DN	CaP M (pT3)
42	0.7	1.49	8.2	DN	CaP M (pT3)

\* Dado obtido do prontuário dos pacientes

(-) = ausência do gene (+) = presença do gene DN = dado não obtido



**Figura 1.12.:** Representação gráfica da regressão logística com os resultados combinados obtidos no sangue e tecido para o KLK2 em pacientes com CaP ou com HPB.

#### 4. DISCUSSÃO

Para a escolha de uma técnica, visando estimar determinado componente *in vivo*, deve ser primeiro estabelecido se é mais importante avaliar a existência de alterações pós transcricionais ou pós traducionais (Favre *et al.* 1997). Como os tumores causam alterações das mais diversas formas nas células, estudos analisando a expressão transcricional podem informar sinais precoces dessas anomalias. Ambas as técnicas, RT-PCR multiplex Semi-quantitativa e RT-PCR *Semi-nested*, mostraram-se adequadas, neste trabalho, para detectar alterações transcricionais. Pois a RT-PCR multiplex Semi-quantitativa é uma técnica sensível capaz de detectar diferentes alvos transcritos numa mesma reação (Chen *et al.* 1999, Pernas-Alonso *et al.* 1999), mesmo que estes apresentem ínfimos números de cópias (Santagati *et al.* 1997), devido ao uso inicial de *primers* randômicos. O uso de *primers* hexâmeros, neste trabalho, admitiu a normalização das amostras, permitindo o multiplex, garantindo a qualidade do material usado e corrigindo variações entre as reações. Já a técnica RT-PCR *Semi-nested* é uma técnica qualitativa e que permite a detecção de ínfimos números de cópias de um único transcrito desejado.

As análises semi-quantitativas e qualitativas, realizadas nesta pesquisa, demonstraram que o KLK2 é um bom marcador molecular tecidual e sanguíneo para separar os grupos CaP e HPB, mesmo sendo esta uma amostragem pequena. Isto foi mais evidenciado quando o PSA sorológico, um dos principais parâmetros sanguíneo utilizados atualmente no rastreamento clínico, não foi capaz neste estudo de realizar tal função.

Apesar de não ter sido possível o estadiamento do tumor pelo marcador KLK2 no tecido, a figura I.7A. mostra uma tendência ao aumento da abundância relativa do gene com o avanço do CaP, o que não foi

observado para o KLK3 (Figura 1.7B). É provável que um número maior de indivíduos nas classes tumorais permitam a determinação deste estadiamento molecular.

Além disso, neste trabalho observou-se uma maior expressão dos RNAm do KLK2 em tecidos com CaP quando comparados com HPB, e nenhuma diferença de expressão para o KLK3 entre esses tecidos. Tais dados são apoiados pela literatura e quando comparados apontam a expressão tecidual dos genes KLK2 e KLK3 como ambíguas. Como já havia sido visto, o gene KLK3 parece ser mais expresso em tecidos benignos quando comparados com malignos (Pretlow *et al.* 1991, Darson *et al.* 1997, Herrala *et al.* 2001, Magklara *et al.* 2000a, Qiu *et al.* 1990), além disso acredita-se que as baixas expressões do KLK3 em tecido tumoral estão associadas com o desenvolvimento de tumores potencialmente mais agressivos (Stege *et al.* 2000). Entretanto, outros trabalhos mostram que não existe diferença de expressão do gene KLK3 em tecidos com as patologias CaP e HPB (Gallee *et al.* 1990, Henttu *et al.* 1990, Hakalahti *et al.* 1993). Contudo, Darson e colaboradores (1999) detectaram por imunohistoquímica, usando anticorpos mono e policlonais, maiores concentrações de PSA em tecido tumoral que em benigno, e sugeriram que os resultados ambíguos de expressão se devem às reações cruzadas entre o PSA e a hK2 produzidas por anticorpos policlonais.

Assim como o KLK3, a expressão do KLK2 tem resultados controversos, estudos imunohistoquímicos apontam a superexpressão do gene com o avanço patológico do câncer de próstata (Darson *et al.* 1997, 1999, Herrala *et al.* 2001). Entretanto, foi encontrada maior expressão para o gene em tecido benigno comparado com o maligno (Magklara *et al.* 2000a). Já Henttu e colaboradores (1990) apontam nenhuma diferença de expressão para o gene em tecido benigno comparado com o maligno.

Para explicar estes resultados dúbios, algumas especulações são feitas. Primeira, as diferenças discrepantes entre os níveis de RNAm e protéico, obtidos por diferentes técnicas, talvez possam ser explicadas devido a eventos, que ocorrem em tecidos tumorais, que possam mascarar epítomos importantes para o reconhecimento de anticorpos (Herrala *et al.* 2001). Tais eventos incluem processamentos heterogêneos na região N-terminal gerando isoformas (Herrala *et al.* 1998 *apud* Herrala *et al.* 2001) e glicosilações protéicas irregulares (Huber *et al.* 1995 *apud* Herrala *et al.* 2001). Segundo, como a hK2 ativa a pró-forma do PSA (Kumar *et al.* 1997, Lövgren *et al.* 1997, Takayama *et al.* 1997) e este tem função de supressor de tumor (Diamandis *et al.* 2000, Diamandis 2000), talvez altas concentrações da hK2 induzam a ação do PSA para impedir a progressão do tumor (Herrala *et al.* 2001). Entretanto, ao mesmo tempo as baixas expressões do KLK3 com o avanço do câncer de próstata podem estar associadas com a perda da sua função de supressor de tumor (Magkalaria *et al.* 2000).

Ao tentar explicar os mecanismos de regulação dos genes KLK2 e KLK3 como uma forma de interação linear fica claro que o que se conhece sobre a regulação destes genes é muito pouco. Além disso, os mecanismos são muito mais complexos, pois se a regulação desses genes fosse linear, no momento da diminuição na expressão do gene KLK3, esperava-se a queda da expressão do KLK2, o que não é observado.

Como o maior interesse desta pesquisa visa aplicações clínicas, as análises teciduais para o KLK2 passam a ter importância quando o valor de corte de 0.6 é usado. Pois, baseando-se neste valor, nota-se que indivíduos com valor médio igual ou excedente a este possuem um risco aumentado em 15 vezes de desenvolver o tumor, e um risco aumentado em 7 e 45 vezes quando uma ou as duas regiões analisadas de tecido, respectivamente, são

positivas para esse valor. Portanto, quanto maior a quantidade de tecidos analisados pelo marcador maior a chance de um diagnóstico clínico seguro.

Entretanto, sem margens de dúvida, é necessário que um número bem maior de homens sejam analisados e que esses estudos sejam feitos em biópsias e não apenas em tecidos oriundos de prostatectomia radical. Também é possível que a expressão dos genes foram subestimadas, pois a pesquisa não foi realizada em tecidos oriundos da microdissecção, ou seja, regiões apenas tumorais ou normais, havendo um mosaicismo de células. Contudo, isto não invalida as aplicações clínicas do KLK2, pois a análise de células apenas tumorais não é uma realidade clínica.

No primeiro momento de um rastreamento clínico, estudos em tecido são desnecessários quando comparados com análises em sangue periférico, que causam menos desconforto e podem trazer informações relevantes. Isto é, a liberação de células epiteliais prostáticas para a corrente sangüínea é um evento raro e propiciado por alterações no arranjo glandular prostático. O fato dos RNAm dos genes KLK2 e KLK3 serem achados quase que exclusivamente em células epiteliais prostáticas associado à técnicas de biologia molecular muito sensíveis, como a PCR (reação em cadeia da polimerase) e suas variações (RT-PCR *Semi-nested*), permitem a detecção de uma célula prostática em um milhão de células sangüíneas (Rittenhouse *et al.* 1998). Estudos *in vitro* indicam que duas células tumorais circulantes por mL de sangue parecem ser o suficiente para difundir um tumor por disseminação hematogena (Liotta *et al.* 1974 *apud* Loric *et al.* 1995), e que de 20 a 30% dos cânceres prostáticos localizados sofrem recorrência devido a células não detectáveis em circulação (Corey *et al.* 1997).

Como mencionado acima, quanto maior o trauma prostático, maior o número de células liberadas na corrente sangüínea. Portanto, a calibragem do número de ciclos para a realização da RT-PCR *Semi-nested* foi de suma

importância, pois é possível que os resultados positivos para indivíduos diagnosticados pela patologia como HPB podem tratar-se de pacientes com estágios iniciais de tumor, principalmente quando esse resultado é confirmado pelo marcador KLK2 no tecido.

Mesmo não sendo possível estadiar o tumor em localizado ou metastático, pela presença do KLK2 em sangue periférico, observa-se que a porcentagem de falsos negativos, baseando-se nos resultados anátomo-patológicos, diminui com o avanço da patologia. Assim sendo, as possíveis explicações para esses falsos negativos são: quando em tumores iniciais (pT1 a pT2) as células tumorais podem ser mascaradas pelo maior número de células normais liberadas, pois nestas a quantidade de expressão do KLK2 é menor e possivelmente não foram detectadas pela técnica. E quando isso acontece em tumores mais avançados, é possível que estes indivíduos estejam em fases de transição de hormônio dependente para independente, pois se sabe que o KLK2 e o KLK3 são superexpressos em linhagens celulares tumorais prostáticas andrógenos dependentes quando comparadas com andrógenos independentes (Riegman *et al.* 1991, Vaarala *et al.* 2000). Contudo, deve ficar claro que os estágios hormônios independentes nem sempre estão relacionados a tumores em estágios mais avançados.

Outro dado a ser considerado é que os valores de PSA sorológico abaixo de 4ng/mL não asseguram a ausência do tumor, pois 22% dos pacientes com tumor localizado apresentam valores mais baixos do que este (Catalona *et al.* 1997). Além disso, o teste do PSA com o valor de corte acima de 4 ng/mL, para indicação de biópsia da próstata, mostra para um grande número de pacientes um valor preditivo positivo na faixa de 31% a 54% (Brawer & Kirby 1998). Já neste trabalho, os estudos sanguíneos para o gene KLK2 mostraram 86% de valor preditivo positivo. Ou seja, a técnica proposta

permite uma queda de 46% para 13% no número de biópsias desnecessárias, que ocorrem quando os falsos positivos são detectados.

A maior especificidade da técnica obtida no sangue do que no tecido é um indício que a presença do marcador KLK2 no sangue é reflexo de maiores alterações na arquitetura prostática, ao passo que a sensibilidade no tecido é maior que a do sangue, pois as chances de detectar alterações em estágios bem iniciais é maior no tecido, que é foco inicial do tumor.

Também é possível que os resultados não concordantes entre o anátomo-patológico e as técnicas propostas, quanto aos falsos negativos e falsos positivos no tecido, podem ser explicados pelo fato de que os adenocarcinomas prostáticos são multifocais, existe uma expressão diferencial do KLK2 nos diferentes fenótipos e estágios clínicos da doença, e a região analisada pela patologia não é a mesma estudada neste trabalho. Além disso, como os cálculos para a precisão, sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo são baseados no anátomo-patológico é bem provável que esses valores foram subestimados, pois as técnicas moleculares são muito mais sensíveis em detectar alterações.

Considerando o preconceito em relação ao exame físico da próstata, este trabalho propõe um novo rastreamento clínico, que faz uso do diagnóstico molecular como complemento ao PSA sorológico, ao anátomo-patológico e ultra-sonografia da próstata transretal. O diagnóstico molecular em sangue periférico e em biópsias tem um índice de acerto de 92% para o câncer de próstata. Ao combinar esta proposta com as demais ferramentas do diagnóstico clínico esta precisão tende a aumentar e tornar-se mais segura.

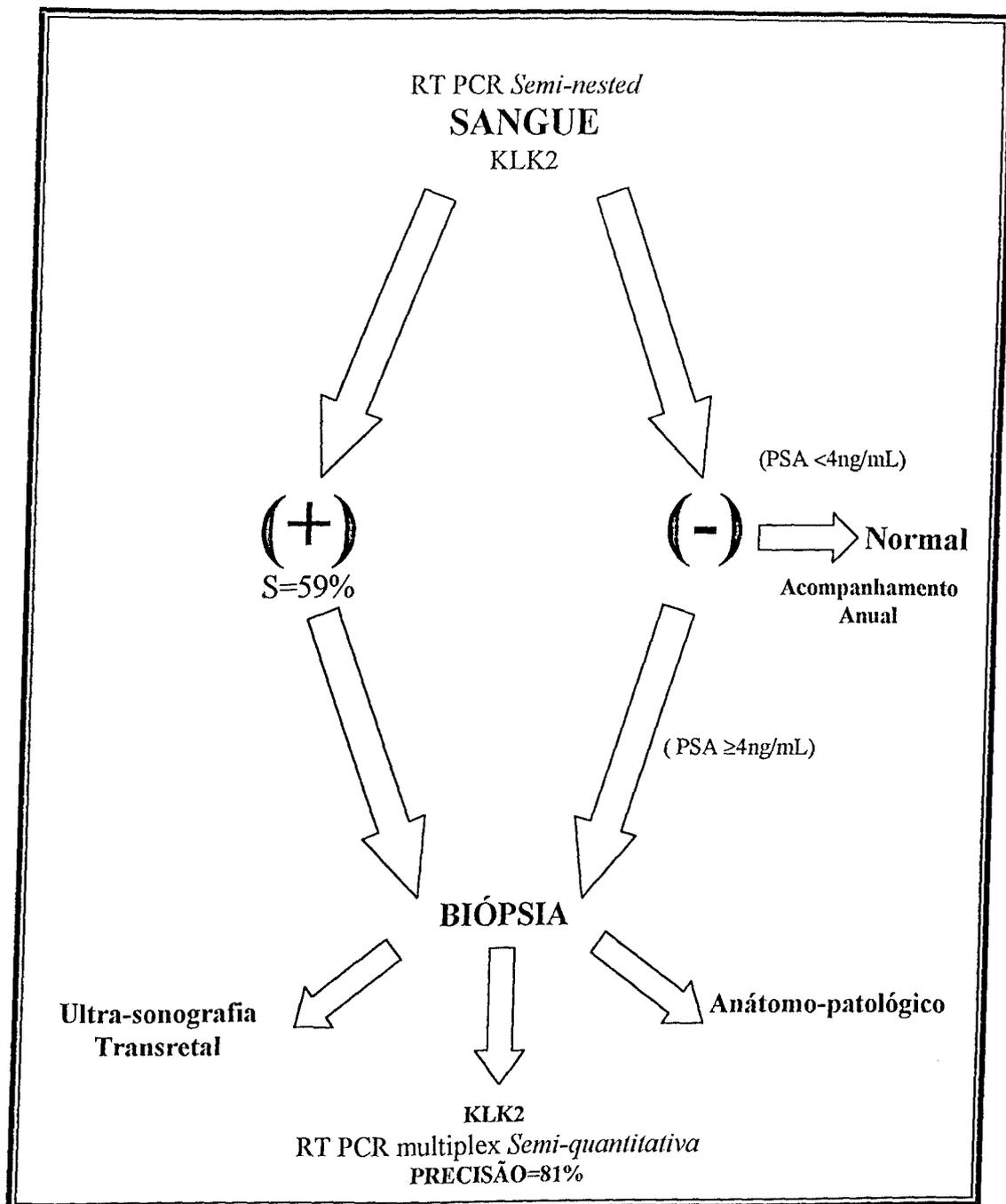


Figura 1.13.: Proposta para o rastreamento clínico e molecular do tumor prostático.

## 5. REFERÊNCIAS

Achbarou A, Kaiser S, Tremblay G, Ste – Marle LG, Brodt P, Goltzman D, Rabbani AS 1994 Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells *in vivo* *Cancer Res.* 54 (9) 2372-2377.

Albright LC & Eeles R 1995 Progress in prostate cancer. *Nature Genetics* 9 336-338.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K 1992 Bioregulation of kinins: kallikrein, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 44 1-80.

Black MA, Magklara A, Obiezu C, Levesque MA, Sutherland DJA, Tindall DJ, Young CYF, Sauter ER, Diamandis EP 2000 Expression of a prostate – associated protein human glandular kallikrein (hK2), in breast tumors and in normal breast secretions. *Br J Cancer.* 82 361-367.

Brawer MK & Kirby R 1998 In: *Prostate specific antigen*. Abingdon: Health Press Limited.

Bussemakers MJ, Bokhoven A, van Verhaegh GW, Smith FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N & Isaacs WB 1999 DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research* 59 5975-5979.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, Petros JA, Andriole GL 1991 Measurement of prostate – specific antigen serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med.* 324 1156-1161.

Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK 1997 Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA.* 277 (18) 1452-1455.

Chen L, Segal DM, Mash DC 1999 Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction: na approach for the measurement of target gene expression in human brain. *Brain Research Protocols.* 4 132-139.

Coffey DS 1993 Prostate Cancer: an overview of an increasing dilemma. *Cancer Supplement* 71 880-886.

Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Giudice LC, Rosenfeld RG 1992 Prostate – specific antigen (PSA) is an insulin – like growth factor binding protein – 3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 75 (4) 1046-1053.

Corey E, Arfman EW, Oswin MM, Melchior SW, Tindall DJ, Young CYF, Ellis WJ, Vessella RL 1997 Detection of circulating prostate cells by reverse transcriptase – polymerase chain reaction of human glandular kallikrein (hK2) and prostate – specific antigen (PSA) messages. *Urol.* 50 (2) 184-188.

Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Young CYF, Klee GG, Tindall DJ, Bostwick DG 1997 Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. *Urol.* 49 (6) 857-862.

Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Saeid MS, Young CYF, Klee GG, Tindall DJ, Bostwick DG 1999 Human glandular kallikrein 2 expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urol.* 53 (5) 939-944.

Deperthes D, Frenette G, Brillard – Bourdet M 1996 Potential involvement of kallikrein hK2 in the hydrolysis of the human seminal vesicle proteins after ejaculation. *J Androl.* 17 659-665.

Diamandis EP & Yu H 1995 New biological function of prostate-specific antigen? *J Clin Endocrinol Metab.* 80 1515-1517.

Diamandis EP & Yu H 1997 Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *Urol Clinics of North Am.* 2 275-282.

Diamandis EP 1998 Prostate-specific antigen or human kallikrein 3? Recent developments. *Tumor Biol.* 19 65-68.

Diamandis EP 2000 Prostate – specific antigen: a cancer fighter and a valuable messenger? *Clin Chem.* 46 (7) 896-900.

Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu CV 2000 The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 11 54-60.

Dube JY & Tremblay RR 1997 Biochemistry and potential roles of prostatic kallikrein hK2. *Mol Urol.* 1 279-285.

- Evans BA, Yun ZX, Close JA, Tregear GW, Kitamura N, Nakanishi S, Callen DF, Baker E, Hyland VJ, Sutherland GR, Richards RI 1988 Structure and chromosomal localization of the human renal kallikrein gene. *Biochemistry*. 27 3124-3129.
- Favre N, Bordmann G, Rudin W 1997 Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and RT-PCR. *J Immunol. Methods*. 204 57-66.
- Fiedler F 1979 Enzymology of glandular kallikreins. In *Bradykinin, Kallidin and kallikrein*, Eds Erdos EG, pp 103-161, Berlin: New York.
- Frenette G, Tremblay RR, Lazure C, Dube JY 1997 Prostatic kallikrein hK2, but not prostate – specific antigen (hK3), activates single – chain urokinase – type plasminogen activator. *Int J Cancer*. 71 (5) 897-899.
- Gallee MP, Visser – de Jong E, van der Korput JA, van der Kwast TH, Kate FJ, Schroeder FH, Trapman J 1990 Variation of prostate – specific antigen expression in different tumour growth patterns present in prostatectomy specimens. *Urol Res*. 18 181-187.
- Gan L, Lee I, Smith R, Argonza-Barrett R, Lei H, McCuaig J, Moss P, Paepers B, Wang K 2000 Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q 13 region. *Gene*. 257 119-130.
- Griffiths K & Morton MS 1999 Aspects of the cell biology of prostate cancer. In *Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment*, pp 16-33. Eds AV Kaisary, GP Murphy, Denis L & Griffiths. London: Martin Dunitz Ltd.
- Hakalahti L, Vihko P, Henttu P, Autio – Harmainen H, Soini Y, Vihko R 1993 Evaluation of PAP and PSA gene expression in prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma using Northern – blot analyses, in situ hybridization and immunohistochemical stainings with monoclonal and bispecific antibodies. *Int J Cancer*. 55 590-597.
- Henttu P, Lukkarinen O, Vihko P 1990 Expression of the gene coding for human prostate – specific antigen and related hGK – 1 in benign and malignant tumors of the human prostate. *Int J Cancer*. 45 654-660.
- Herrala A, Kurkela R, Vihinen M, Kalkkinen N, Vihko P, 1998 Androgen – sensitive human prostate cancer cells, LNCaP, prodecu both N – terminally

mature and truncated prostate – specific antigen isoforms. *Eur J Biochem.* 255 329-235.

Herrala AM, Porvari KS, Kyllönen AP, Vihko PT 2001 Comparison of human prostate specific glandular kallikrein 2 and Prostate – specific antigen gene expression in prostate with gene amplification and overexpression of prostate specific glandular kallikrein 2 in tumor tissue. *Cancer.* 92 (12) 2975-2984.

Huber P, Schmid HP, Mattarelli G, Strittmatter B, van Steenbrugge G, Maurer A 1995 Serum free prostate specific antigen: isoenzymes in benign hyperplasia and cancer of the prostate. *Prostate.* 27 212-219.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Câncer de próstata. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 20 fevereiro de 2002. Disponível em: <http://www.inca.org.br/câncer/tipos/próstata>.

Jaakkola S, Vornanen T, Leinonen J, Rannikko S, Stenman UH 1995 Detection of Prostatic cells in Peripheral blood: correlation with serum concentrations of prostate – specific antigen. *Clin Chem.* 41 (2) 182-186.

Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS 1997 Expression of pro form of prostate – specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Res.* 57 3111-3114.

Lilja H. 1987 Seminal vesicle – secreted proteins and theirs reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest.* 80 281-285.

Lilja H, Abrahamsson PA, Lundwall A 1989 Semenogelin, the predominant protein in human semen. *J Biol Chem.* 264 1894-1900.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM 1974 Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* 34 997-1003.

Loric S, Dumas F, Eschwege P, Blanchet P, Benoit G, Jardin A, Lacour B 1995 Enhanced detection of hematogenous circulating prostatic cells in patients with prostate adenocarcinoma by using nested reverse transcription polymerase chain reaction assay based on prostate – specific antigen. *Clin Chem.* 41 (12) 1698-1704.

Lövgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall A, Lilja H 1997 Activation of the zymogen form of prostate – specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 238 549-555.

Lövgren J, Valtonen – Andre C, Marsal K, Lilja H, Lundwall A 1999 Measurement of prostate – specific antigen and glandular kallikrein 2 in different body fluids. *J Androl.* 20 348-355.

Lyon PB, See WA, Xu Y, Cohen MB 1995 Diversity and modulation of plasminogen activator activity in human prostate carcinoma cell lines. *Prostate.* 27 (4) 179-186.

Magklara A, Scorilas A, López – Otin C, Vizoso F, Ruibal A, Diamandis EP 1999 Human glandular kallikrein in breast milk, amniotic fluid, and breast cyst fluid. *Clin Chem.* 45 1774-1780.

Magklara A, Scorilas A, Stepha C, Kristiansen GO, Hauptmann S, Jung K, Diamandis EP 2000 Decreased concentrations of prostate – specific antigen and human glandular kallikrein 2 in malignant versus nonmalignant prostatic tissue. *Urol.* 56 (3) 527-532.

Movat HZ 1979 The plasma kallikrein- kinin system and its interrelationship with other components of blood. In *Bradykinin, kallidin and kallikrein*, Eds Erdos EG, pp 1-89, Berlin: New York.

Pernas-Alonso R, Morelli F, Porzio U, Perrone-Capano C 1999 Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. *Brain Research Protocols.* 4 395-406.

Pretlow TG, Pretlow TP, Yang P, Kaetzel Cs, Delmoto CM, Kamts S, Bodner DR, Kursh E, Resnick MI, Bradley Jr EL 1991 Tissue concentrations of prostate – specific antigen in prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Inf J Cancer.* 49 645-649.

Qin H, Kemp J, Yip M, Lam-Po-Tang PRL, Morris BJ 1991 Localization of human glandular kallikrein 1 gene to chromosome 19q 13.3-13.4 by *in-situ* hybridization. *Hum.Hered.* 41 222-226.

Qiu SD, Young CY, Billhartz DL, Prescott JL, Farrow GM, He WW, Tindall DJ 1990 In situ hybridization prostate – specific antigen RNA in human prostate. *J Urol.* 144 1550-1556.

Richards RI, Holman K, Shen Y, Kozman H, Harley H, Brook D, Shaw D 1991 Human glandular kallikrein gene: genetics and physical mapping of the KLK1 locus using a highly polymorphic microsatellite PCR marker. *Genomics* 11 77-82.

Riegman PHJ, Vlietstra RJ, Klaassen P, Van der Korput JAGM, Guerts van Kessel A, Romijn JC, Trapman J 1989 The prostate-specific antigen gene and the human glandular kallikrein 1 gene are tandemly located on chromosome 19. *FEBS Lett.* 247 123-126.

Riegman PHJ, Vlietstra RJ, van der Korput HAGM, Romijn JC, Trapman J 1991 Identification and androgen – regulated expression of two major human glandular kallikrein – 1 (hGK – 1) mRNA species. *Mol Cell Endocr.* 76 181-190.

Riegman PHJ, Vlietstra RJ, Suurmeijer L, Cleutjens CBJM, Trapman J 1992 Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics.* 14 6-11.

Rittennhouse HG, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Partin AW 1998 Human kallikrein 2 (hK2) and Prostate – specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 35 (4) 275-368.

Santagati S, Garnier M, Carlo P, Violani E, Picatti GB, Maggi A 1997 Quantitation of low abundance mRNA in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR) – based methods. *Brain Research Protocols.* 1 217-223.

Stegle R, Grande M, Carlstrom K, Tribukait B, Poussette A 2000 Prognostic significance of tissue prostate – specific antigen in endocrine – treated prostate carcinomas. *Clin Cancer Res.* 6 160-165.

Takayama TK, Fujikawa K, Davie EW 1997 Characterization of the precursor of prostate – specific antigen: activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J Biol Chemistry.* 272 (34) 21582-21588.

Vaarala MH, Porvari K, Kyllönen AP, Vihko P 2000 Differentially expressed genes in two LNCaP prostate cancer cell lines reflecting changes during prostate cancer progression. *Lab Invest.* 8 1259-1268.

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM 1979 Purification of a Human Prostate-specific antigen. *Invest Urol.* 17 159-163.

Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM 1981 Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate*. 2(1) 89-96.

Yousef GM, Chang A, Scorilas A, Diamandis EP 2000 Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q 13.3 – q 13.4. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 16 125-133.

Yousef GM & Diamandis EP 2001 The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: structure, function, and association to disease. *Endocrine Reviews*, 22 (2) 184-204.

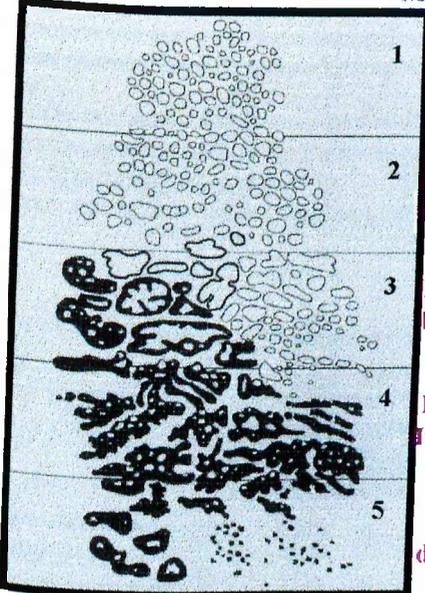
**ESTADIAMENTO DOS ADENOCARCINOMAS DA PRÓSTATA CLASSIFICAÇÃO  
DE WHITMORE-JEWETT E TNM 1992**

WHITMORE-JEWETT	TNM 1992 T- Tumor primário N- Linfonodos M- Metástases (proposto pela União Interacional contra o Câncer)
<p><b>A</b> Tumor não palpável no toque retal</p> <p><b>A1</b> Tumor não palpável ocupando <math>\leq 5\%</math> da próstata</p> <p><b>A2</b> Tumor não palpável ocupando <math>&gt; 5\%</math> da próstata</p>	<p><b>pTx</b> Tumor não avaliado</p> <p><b>pTo</b> Sem evidência de tumor</p> <p><b>pT1</b> Tumor incidental impalpável e invisível por técnicas de obtenção de imagens</p> <p><b>pT1a</b> Tumor incidental ocupando <math>\leq 5\%</math> do tecido ressecado</p> <p><b>pT1b</b> Tumor incidental ocupando <math>&gt; 5\%</math> do tecido ressecado</p> <p><b>pT1c</b> Tumor não palpável ou visível por imagem, diagnosticado por biópsia com agulha em um ou ambos os lobos, em pacientes com PSA sanguíneo elevado</p>
<p><b>B1</b> Nódulo <math>\leq 1,5</math> cm em um lobo prostático</p> <p><b>B2</b> Nódulo <math>&gt; 1,5</math> cm e/ou ocupando os dois lobos da próstata</p>	<p><b>pT2</b> Tumor limitado à glândula</p> <p><b>pT2a</b> Até metade de um lobo ou menos</p> <p><b>pT2b</b> Até mais da metade de um lobo porém não os dois lobos</p> <p><b>pT2c</b> Comprometimento dos dois lobos</p>
<p><b>C1</b> Extensão peri prostática mínima (sulcos)</p> <p><b>C2</b> Invasão da base das vesículas seminais com ou sem invasão dos sulcos</p> <p><b>C3</b> Invasão da base das vesículas seminais com ou sem a invasão de outros órgãos adjacentes</p>	<p><b>pT3</b> Tumor estende além da cápsula prostática</p> <p><b>pT3a</b> Extensão extra capsular unilateral</p> <p><b>pT3b</b> Extensão extra capsular bilateral</p> <p><b>pT3c</b> Tumor invade vesícula seminal</p> <p><b>pT4</b> Tumor fixo ou invadindo outras estruturas pélvicas adjacentes exceto as vesículas seminais</p> <p><b>pT4a</b> Tumor invadindo o colo vesical e/ou o esfíncter externo e/ou o reto</p> <p><b>pT4b</b> Tumor invadindo o músculo elevador do ânus e/ou fixo à parede pélvica</p>
<p><b>D1</b> Metástases em linfonodos pélvicos</p>	<p><b>pNx</b> Linfonodos regionais não avaliados</p> <p><b>pNo</b> Sem metástases ganglionares</p> <p><b>pN1</b> Um linfonodo envolvido <math>\leq 2</math> cm</p> <p><b>pN2</b> Um linfonodo <math>&gt;2 \leq 5</math> e/ou múltiplos <math>\leq 5</math>cm</p> <p><b>pN3</b> Linfonodos envolvidos <math>&gt; 5</math> cm</p>
<p><b>Do</b> Metástases não identificadas</p> <p><b>D2</b> Metástases à distância</p> <p><b>D3</b> Resistente ao tratamento hormonal</p>	<p><b>pMx</b> Metástases não avaliadas</p> <p><b>pMo</b> Sem metástases à distância</p> <p><b>pM1</b> Metástases presentes</p> <p><b>pM1a</b> Linfonodo(s) não regional(is)</p> <p><b>pM1b</b> Osso(s)</p> <p><b>pM1c</b> Outras localizações</p>

## ANEXO 2

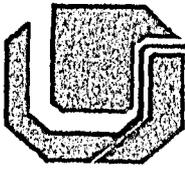
## SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓCA DE GLEASON

## GLÂNDULAS

MARGENS	Padrão Glandular	Distribuição
 <p>1 Bem definida</p> <p>2 Menos definida</p> <p>3 Irregular infiltrada</p> <p>4 Irregular infiltrada</p> <p>5 Mal definida</p>	<p>Simples Separadas Redondas</p> <p>Simples - Separadas Redondas Mais Variadas</p> <p>Simples, separadas, irregular. Massas epiteliais redondas criboformas ou papilar</p> <p>Massas glandulares fundidas do tipo hipernefróide</p> <p>Padrão quase ausente Poucas glândulas pequenas Poucos e pequenos lumens envolvidos por massa epitelial sólida às vezes com necrose central</p>	<p>Pacote fechado</p> <p>Espaçamento médio de um diâmetro glandular</p> <p>Espaçamento médio de mais de um diâmetro glandular. Raramente em pacotes. Massas arredondadas c/ contornos pouco definidos</p> <p>Massas epiteliais anaplásicas irregulares</p> <p>Massas irregulares ou cordões com contornos pouco definidos</p>

Padrões Anatomopatológicos  
Adenocarcinoma da Próstata

2 a 4 = Diferenciados 5 a 7 = Moderadamente Diferenciados 8 a 10 = Indiferenciados



Parecer nº: 005/2001

Título do Projeto

Biologia molecular do câncer de próstata: Análise da expressão gênica, estudo de polimorfismos, isolamento e caracterização de epítopos específicos.

Coordenador

Dr Luiz Ricardo Goulart Filho

Relator

Prof. Dr. Miguel Tommas Jorge

Área do Conhecimento

Ciências Biológicas - Genética

Código

2.02

Projeto

Local

Multicêntrico:

Nacional

Internacional

Grupo I

Grupo II

Grupo III

Nível

Prevenção

Diagnóstico

Terapêutico

Epidemiológico

Não se aplica

Área Temática

Objetivo(s)

criar um banco de dados de genes relacionados ao câncer de próstata. Desenvolver um "microarray" contendo os principais genes associados, específicos do câncer de próstata.

Metodologia

**Riscos e Benefícios**

Os riscos são pequenos pois  
só se aprofundará o material  
obtido do Suofon por métodos  
clínicos.

**Orçamento**

63.187,28

**Financiador**

**Termo de Consentimento**



Adequado



Inadequado

**Observações  
Relevantes  
(Restrições, etc...)**

**Parecer**



Favorável



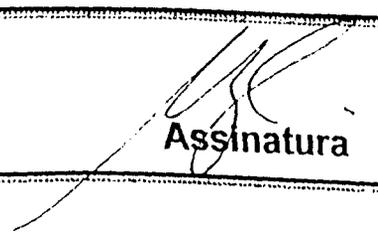
Favorável com Restrições



Desfavorável

**Local e Data:**

19.02.2001

  
**Assinatura**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

## ANEXO 4

---



---

TERMO DE CONSENTIMENTO

---



---

O Laboratório de Genética Molecular dirigido pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho juntamente com o Serviço de Urologia, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, estão realizando um estudo genético relacionado ao Câncer de Próstata.

O projeto consiste no estudo da Biologia Molecular do Câncer de Próstata.

Para realização dos exames laboratoriais será necessária a coleta de 10 mL de sangue periférico, e biópsias de tecidos normais e tumorais da próstata. Cabe ressaltar, que todo material utilizado será estéril e descartável, e no caso das biópsias, serão realizadas juntamente com os procedimentos rotineiros do centro cirúrgico do Hospital de Clínicas, sem qualquer desconforto adicional ao paciente.

O material coletado será enviado ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames de RNA e DNA.

É direito do paciente pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados.

Espera-se que, com este estudo seja possível detectar em que estágio de desenvolvimento se encontra a doença no paciente, bem como definir os possíveis biomarcadores a serem utilizados na detecção precoce, auxiliando o tratamento.

Almeja-se com isso, estabelecer um programa de tratamento precoce e integrado do paciente, a fim de prevenir o desenvolvimento da doença.

Os pacientes e contatos familiares que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, Eu,

\_\_\_\_\_ ,  
concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura \_\_\_\_\_

Testemunhas \_\_\_\_\_

**PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL POR TRIZOL****SANGUE**

1. Aliquotar o sangue total em microtubos de 2mL
2. Centrifugar a 1800 X g por 40 minutos a temperatura ambiente
3. Coletar a camada de leucócitos e transferir para um microtubo novo contendo 1mL de TRIZOL Reagent (INVITROGEN) e homogeneizar.

**TECIDO**

1. Homogeneizar 100mg de tecido em 1mL de TRIZOL Reagent (INVITROGEN)

**PRÓXIMOS PASSOS (SANGUE E TECIDO)**

2. Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente
3. Adicionar em 1mL de TRIZOL Reagent (Invitrogen) e homogeneizar em vórtex por 15 segundos
4. Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente
5. Adicionar 200 µl de Clorofórmio para cada 1mL de TRIZOL, homogeneizar e incubar por 5 min. a temperatura ambiente
6. Centrifugar a 12000 X g por 15 min a 4°C.
7. Transferir o sobrenadante para um tubo novo e adicionar 750 µl de isopropanol gelado (para cada 1mL de TRIZOL) e incubar por 10 minutos.
8. Centrifugar a 12000 X g por 10 min.
9. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em no mínimo 1mL de etanol 70%
10. Centrifugar a 7500 X g por 5 minutos.
11. Ressuspender o pellet em água tratada com DEPC ou TE.

Obs. Todo o material utilizado na extração deve ser novo, esterilizado e a luvas devem ser periodicamente trocadas

## ANEXO 6

**MÉTODO PARA CÁLCULO DA PRECISÃO, SENSIBILIDADE,  
ESPECIFICIDADE,  
VALOR PREDITIVO POSITIVO (+) E VALOR PREDITIVO (-) DE UM TESTE**

Exame Anátomo-Patológico da Peça Cirúrgica

Teste	*Presente	*Ausente	Total
	Número de indivíduos		
X +	A (V+)	B (F+)	
X -	C (F-)	D (V-)	
Total			

\*Para esse estudo foram considerados como presente o câncer de próstata e ausente a hiperplasia prostática benigna.

$$P = \frac{A+D}{A+B+C+D} \quad S = \frac{A}{A+C} \quad E = \frac{D}{B+D} \quad VP(+) = \frac{A}{A+B}$$

$$VP(-) = \frac{D}{C+D}$$

**P = precisão, S = sensibilidade, E = especificidade,  
VP(+) = valor preditivo positivo, VP(-) = valor  
preditivo negativo, F(-) = falsos negativos, F(+) = falsos  
positivos, V(+) = verdadeiramente positivos e V(-) =  
verdadeiramente negativos**