

SEBASTIÃO ANTÔNIO BORBA

MON
615.65-0056
37264
TES/MEU

SISBI/UFU



1000244186

PSA MOLECULAR NO ESTADIAMENTO DO CÂNCER DA PRÓSTATA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Clínica Médica - Genética.

Orientadores: Prof. Luiz Ricardo Goulart Filho
Prof. Renato E. Sologuren Achá

UBERLÂNDIA - MG

2003

À minha família, especialmente à minha esposa Regina e aos meus filhos: Bruno, Priscila e Rafael, pelo carinho, paciência, estímulo e compreensão.

A todos que contribuíram para minha formação profissional.

Aos profissionais da saúde, pacientes e familiares que convivem com o câncer.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus pais pela minha existência.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Departamento de Clínica Médica pela oportunidade de realizar este curso.

Aos professores do curso de mestrado, em especial aos orientadores deste estudo, Prof. Luiz Ricardo Goulart Filho e Prof. Renato E. Sologuren Achá, pela dedicação e envolvimento.

Aos professores Miguel Tannús Jorge e José Renan Scalante Hurtado pelas contribuições importantes ao participarem do exame de qualificação.

Aos professores e médicos administrativos da disciplina de Urologia: Lindolfo Dumont Prado, Osvaldo de Freitas Filho, Omar Pacheco Simão, Leandro Alves de Oliveira e Eduardo Henrique Pereira Braga pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos médicos residentes: Célio Q. de Souza, Rafael S. F. de Aguiar, Ricardo G. de Freitas, Yuri Túlio D. Andrez Nobre, Itamar M. Gonçalves, Aldeci P. de Oliveira pela colaboração.

Aos geneticistas do Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU: Adriana Freitas Neves, Alexandra de Moraes Cardoso, Jaqueline D. Dias Oliveira, Juliana Meola, Andréia Cristina Capaneli e Waldesse Piragé de Oliveira Jr. pela dedicação e colaboração.

Ao Rodrigo Américo Cunha de Souza pela colaboração na área de informática médica.

À bibliotecária Maria Inês Bacchin pelos esclarecimentos sobre as normas para utilização de referências bibliográficas e citações em trabalhos científicos.

À Sêmia Jorge pela colaboração na revisão do texto e correção gramatical.

A todos os profissionais da saúde e funcionários do HC da UFU que, direta ou indiretamente, contribuíram na elaboração deste estudo.

Aos pacientes que participaram deste trabalho.

RESUMO

Introdução. Marcadores moleculares têm sido investigados na detecção e estadiamento do câncer da próstata. Portanto, a dosagem do PSA por RT-PCR "nested" no sangue periférico em pacientes submetidos à prostatectomia radical em associação com o estadiamento TNM 92 e com o controle pós-operatório pela dosagem do PSA total no sangue, foi realizada para estabelecer estadiamento molecular pré-operatório para o câncer da próstata e avaliar o seu prognóstico de cura com a cirurgia radical.

Pacientes e método. O grupo de estudo foi constituído por 32 pacientes com câncer da próstata, submetidos à prostatectomia radical, tendo como critérios de inclusão: Gleason da biópsia < 8; PSA bioquímico total no sangue, no pré-operatório $\leq 20,0$ ng/ml, pela metodologia IMMULITE®; Raio-X e/ou mapeamento ósseo com Tecnécio negativos, nos casos de PSA bioquímico total no sangue, no pré-operatório > 10,0 ng/ml; toque retal compatível com câncer localizado; idade ≤ 80 anos e expectativa de vida de 10 ou mais anos. No grupo de estudo foi realizada a dosagem do PSA por RT-PCR "nested" no sangue, no pré-operatório, associando-se os resultados com o estadiamento TNM 92 e com os diagnósticos de câncer localizado (cura laboratorial) e câncer com invasão local ou metastático, pela dosagem bioquímica do PSA total no sangue, no controle pós-operatório. O grupo controle foi constituído por 14 pacientes com hiperplasia nodular da próstata (HNP), submetidos à ressecção trans-uretral da próstata ou prostatectomias abertas (trans-vesical ou retro-púbica), tendo como critérios de inclusão: diagnóstico anátomopatológico da peça cirúrgica de HNP, PSA bioquímico total no sangue, no pré-operatório $\leq 20,0$ ng/ml e idade ≤ 80 anos, nos quais a RT-PCR "nested" PSA foi realizada no sangue, no pré-operatório.

Resultados. Com os critérios de inclusão no grupo de estudo, utilizados neste trabalho, encontraram-se pelo estadiamento TNM 92, câncer localizado (pT1 e pT2) em 18/32 (56,3 %)

e câncer com invasão local ou metastático (pT3 pT4 pN1) em 14/32 (43,8 %) dos casos. A RT-PCR "nested" PSA no sangue, no pré-operatório, foi positiva em 3/6 (50,0 %) dos pacientes com HNP, em 6/11 (54,5 %) dos pacientes com câncer localizado (pT1 pT2) e em 4/7 (57,1 %) dos pacientes com câncer com invasão local ou metastático (pT3 pT4 e pN1) apresentando, no diagnóstico do câncer com invasão local ou metastático (pT3 pT4 e pN1), em relação à HNP, diagnosticados pelos exames anatomopatológicos com estadiamento pela classificação TNM 92, sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VP+), valor preditivo negativo (VP -) e acurácia de 57%, 50%, 57%, 50% e 54%, respectivamente. No controle pós-operatório pela dosagem do PSA total, com ponto de corte $\leq 0,04$ ng/ml, diagnosticando-se com este valor câncer localizado (cura laboratorial), 7/18 (38,9 %) dos pacientes com câncer localizado pelo estadiamento TNM 92, apresentaram-se com diagnóstico laboratorial pós-operatório de câncer com invasão local ou metastático e 2/13 (15,4 %) dos pacientes estadiados com câncer com invasão local ou metastático pelo estadiamento TNM 92, apresentaram-se com diagnóstico laboratorial pós-operatório de câncer localizado (cura laboratorial), encontrando-se como resultado final pelos controles pós-operatório, câncer com invasão local ou metastático em 18/31 (58,1 %) dos pacientes. Nos controles pós-operatório, encontrou-se RT-PCR "nested" PSA positivo em 1/7 (14,3 %) dos pacientes com câncer localizado (cura laboratorial) e em 8/10 (80,0 %) dos pacientes com diagnóstico laboratorial pós-operatório de câncer com invasão local ou metastático, apresentando no diagnóstico de câncer com invasão local ou metastático em relação ao câncer localizado (cura laboratorial), diagnosticados segundo os critérios relacionados, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia de 80,0 %, 85,7 %, 88,9 %, 75,0% e 82,4 %, respectivamente.

Conclusões. A RT-PCR "nested" PSA positivo no sangue no pré-operatório apresentou excelente associação com o diagnóstico de câncer com invasão local ou metastático,

diagnosticado pela dosagem bioquímica no sangue do PSA total no controle pós-operatório. A alta sensibilidade, especificidade e acurácia deste marcador molecular no sangue, no pré-operatório, para o diagnóstico pós-operatório de câncer com invasão local ou metastático, melhorando o prognóstico de cura, sugere a utilização do uso da RT-PCR PSA como uma metodologia para estadiamento molecular.

Palavras chaves: PSA - Prostatectomia Radical - RT-PCR “nested” PSA - Molecular

ABSTRACT

Introduction. A search for serum markers for prostate cancer detection and staging is the ultimate goal in clinical diagnostic. Therefore, PSA mRNA levels were investigated through nested RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells of patients submitted to radical prostatectomy to evaluate its association to the TNM 92 histological staging and to the total PSA serum levels in the post-surgery follow-up, in order to establish a molecular staging for the prostate cancer and evaluate the clinical prognostic aiming the cure after surgery.

Patients and methods: A group of patients with prostate cancer (PCa) consisted of 32 individuals that were submitted to radical prostatectomy with the following criteria: Gleason score lower than 8; total PSA (tPSA) serum levels lower or equal to 20 ng/mL (IMMULITE[®]); negative bone mapping and X-rays image analysis for tPSA greater than 10 ng/mL; rectal examination compatible with organ confined cancer; age limit up to 80 years old with a life expectancy of 10 years or more. PSA mRNA was also detected through nested RT-PCR in pre-surgery blood samples, and positivity was associated to the TNM 92 histological staging, and to the diagnostic of organ confined and extracapsular invasion or metastatic disease, based on total tPSA serum levels measured after surgery. For the post-surgery follow-up, the tPSA cutoff limit of 0.04 ng/mL was used to separate the organ confined from extracapsular invasion or metastatic disease. The control group consisted of 14 patients with benign prostate hyperplasia (BPH) that were submitted to either transurethral resections or to open prostatectomies (trans-vesical or retro pubic) according to the following inclusion criteria: histopathological results of BPH; tPSA serum levels pre-biopsies lower or equal to 20 ng/mL and age limit up to 80 years. RT-PCR was also realized in pre-surgery blood samples.

Results: TNM 92 staging was accomplished based on the inclusion criteria, and 18 patients (56.3%) presented organ confined cancer (pT1 and pT2) and 14 (43.7%) had a possible local

invasion or a metastatic disease (pT3, pT4 and pN1). RT-PCR was positive in 3 of 6 BPH patients (50%), in 6 of 11 organ confined PCa patients (54.5%), and in 4 of 7 local invasion or metastatic PCa patients (57.1%). Considering only patients diagnosed with extracapsular cancer invasion or metastasis and BPH, the molecular detection had a sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of 57%, 50%, 57%, 50% and 54%, respectively. From those patients with organ confined disease, the post-surgery tPSA cutoff limit have detected extracapsular cancer invasion or metastasis in 38.9% (7 of 18) while for those patients with extracapsular cancer invasion or metastasis 15.4% (2 of 13) have presented laboratorial cure, with a final result of 58.1% of patients with extracapsular cancer invasion or metastasis. Within those patients with extracapsular cancer invasion or metastasis, 80% presented positive RT-PCR, and within the organ confined cancer patients it was found a positivity of 14.3% (1 of 7), with a sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy of 80%, 85.7%, 88.9%, 75% and 82.4%, respectively.

Conclusions: The positive results of RT-PCR-PSA in pre-surgery blood samples presented an excellent association with extracapsular cancer invasion or metastasis, based on the cutoff limit of the post-surgery tPSA serum levels. The high sensitivity, specificity and accuracy of this molecular marker to detect extracapsular cancer invasion or metastasis in pre-surgery blood have improved significantly the clinical prognostic, suggesting the use of RT-PCR-PSA as a methodology for molecular staging.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A - Adenina
- ACT - Antichimiotripsina
- ASA - “American Anesthesiology Association”
- °C - Graus Celsius
- C - Citosina
- cDNA - DNA complementar
- CEP - Conselho de Ética em Pesquisa
- CNS - Conselho Nacional de Saúde
- dATP -Trifosfato de desoxiadenosina
- dCTP -Trifosfato de desoxicitosina
- DEPC -Dietil pirocarbonato
- dGTP -Trifosfato de desoxiguanidina
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DNase - Enzima que degrada o DNA
- dNTPs -Desoxirribonucleotídeos
- dTTP -Trifosfato de desoxitimidina
- E - Especificidade
- EDTA - Etileno diamino tetracético
- EEUU - Estados Unidos da América
- FAMED - Faculdade de Medicina
- g - Grama
- G - Guanina
- GAPDH - Gliceraldeído fosfato desidrogenase

HC - Hospital de Clínicas

HNP - Hiperplasia nodular da próstata

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LR- - Razão de verossimilhança, “likelihood ratio”, “odds ratio” (OD), negativa

LR+ - Razão de verossimilhança, “likelihood ratio”, “odds ratio” (OD), positiva

MG - Macroglobulina

mg - Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MMLV-RT - Enzima que realiza a transcrição reversa

MS - Ministério da Saúde

ng -Nanograma

nm - Nanômetro

OCR - “Receiver Operating Curves”

P - Prevalência

pb - Pares de bases

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PIN - Neoplasia intra epitelial

pmoles - Picomoles

PSA - Antígeno Prostático Específico

PSM - Antígeno Prostático de Membrana

RNA - Ácido ribonucléico

RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro

RNase - Enzima que degrada o RNA

RT- Transcriptase Reversa

RTUP - Ressecção trans-uretral da próstata

Rx - Raios x

S - Sensibilidade

T - Timina

Taq - Termus aquáticus

TBE -Tris, Ácido Bórico, EDTA

TNM - T-Tumor, N-Linfonodos, M-Metástases

U - Unidade

UCLA - Universidade da Califórnia

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

VP- - Valor preditivo negativo

VP+ - Valor preditivo positivo

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	29
3 PACIENTES E MÉTODO.....	30
3.1 Pacientes.....	30
3.2 Modelo do estudo.....	30
3.3 Levantamento de dados.....	31
3.4 Rastreamento do câncer da próstata.....	31
3.5 Diagnóstico e estadiamento do câncer da próstata.....	32
3.6 Exames pré-operatório, risco cirúrgico e expectativa de vida.....	32
3.7 Procedimentos cirúrgicos.....	32
3.8 Critérios de inclusão nos grupos de estudo e controle.....	33
3.9 Exames anátomopatológicos.....	35
3.10 Dosagem qualitativa do PSA por RT-PCR “Nested”.....	35
3.10.1 Obtenção das amostras.....	35
3.10.2 Extração do RNAm.....	36
3.10.3 RT-PCR “Nested”.....	36
3.10.3.1 Transcrição reversa - Síntese do cDNA.....	36
3.10.3.2 Reação para qualificação do RNA.....	37
3.10.3.3 Primeira amplificação por PCR.....	37

3.10.3.4 Segunda amplificação por PCR.....	38
3.10.5 Eletroforese	38
3.11 Dosagem bioquímica quantitativa do PSA.....	39
3.12 Local de realização dos exames	39
3.13 Aprovação no Conselho de Ética em Pesquisa	40
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÕES.....	58
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9 ANEXOS.....	66
9.1 Dados individuais.....	67
9.2 Dados individuais.....	69
9.3 Índice Kappa.....	70
9.4 Sistema de Gleason	71
9.5 Estadiamento Whitmore Jewett - TNM 1992.....	72
9.6 Protocolo de Extração do RNAm com TRIZOL [®]	73
9.7 Termo de consentimento livre e esclarecido	74
9.8 Aprovação pelo CEP da UFU	75

1 INTRODUÇÃO

Para 2002, estimou-se a ocorrência no Brasil de 25.600 casos novos de câncer da próstata, precedidos apenas pelo câncer de pele não melanoma, e 7.870 óbitos, representando 12 % do total de mortes esperadas por câncer em homens. A taxa de mortalidade bruta do câncer da próstata vem apresentando acentuado ritmo de crescimento, passando de 3,73/100.000 homens em 1979 para 8,93/100.000 homens em 1999, o que representa uma variação percentual relativa de 139 %. Esta neoplasia é a quarta causa de morte por tumores no Brasil, correspondendo a 6 % do total de óbitos por este grupo nosológico (BRASIL, 2002).

Foi projetado para 1998, ocorrência de 184.500 casos novos de câncer da próstata nos Estados Unidos da América, segundo Landis et al. (1998), com ocorrência de cerca de 32.000 mortes por ano, de 1990 a 1995, em consequência deste tumor (KURTH; MICKISCH; SCHRÖDER, 1999).

Aproximadamente, 10 % dos homens, irão apresentar diagnóstico clínico de câncer da próstata e 3 % a 4 % destes pacientes irão a óbito pela doença, freqüentemente com considerável redução na sua qualidade de vida, por muitos anos antes da sua morte (BRAWER; KIRBY, 1998).

O câncer da próstata é, atualmente, o tumor mais diagnosticado nos homens, representando 21 % do total de casos, tendo ultrapassado, em freqüência, os tumores do pulmão e do cólon, na população masculina brasileira acima de 45 anos (BRUNINI et al., 1982).

Estudos em autópsias mostraram que 60 % dos homens acima dos 80 anos de idade apresentam neoplasia da próstata, quando a glândula é estudada através de cortes seriados segundo Scott et al. (1969), e segundo Franks (1973), 30 % dos homens acima de 50 anos de idade têm câncer prostático latente, indetectável durante muitos anos, com incidência

variando de 10 % aos 50 anos para 80 % aos 80 anos de idade, duplicando a cada dez anos a partir dos 50 anos, nesta faixa etária.

O risco do câncer da próstata aumenta de 3 a 6 vezes nos pacientes com história familiar deste câncer nos parentes de primeiro grau (pai e irmãos) e de segundo grau (avo e tios) (CUSSENOT; VALERI 2001).

O câncer da próstata tem uma incidência variável de acordo com as regiões geográficas. A mais baixa incidência deste tumor foi encontrada no Oriente: 0,8 e 3,4 novos casos por 100.000 habitantes por ano, na China e no Japão, respectivamente (KURTH; MICKISCH; SCHRÖDER, 1999).

Na Europa, segundo Spapen et al. (2000) de acordo com os dados obtidos pelo “Rotterdam Cancer Registry” a incidência do câncer prostático em 1995 foi de 125 casos novos por 100.000 habitantes por ano.

Nos Estados Unidos da América (EUA), a incidência de câncer da próstata é mais alta na população da raça negra do que na população da raça branca, 136 e 100 casos novos por 100.000 habitantes por ano, respectivamente (ZARIDGE; BOYLE, 1987; ROSS et al., 1988).

No Brasil, a incidência desta neoplasia está em torno de 22 casos novos por 100.000 habitantes por ano, apresentando também incidência maior na população de raça negra do que na raça branca (SROUGI; SIMON, 1990).

Em Minas Gerais ele ocupa o segundo lugar, em casos diagnosticados e como causa de óbitos (BRASIL, 2003).

Em Uberlândia, Minas Gerais, com estes números, estima-se que a incidência de câncer da próstata tenha sido de 110 casos novos em 2002.

No rastreamento do câncer da próstata, a “American Urology Association” e a “American Cancer Society”, recomendam a realização anual do toque retal e da dosagem bioquímica do PSA total no sangue periférico nos homens a partir de 50 anos de idade e a partir dos 40 anos

nos pacientes de risco desta neoplasia, ou seja, aqueles com história familiar deste câncer e nos pacientes da raça negra (CHAMBERLAIN et al., 1996; SELLY et al., 1996).

No Brasil, na implementação da Política Nacional de Prevenção e Controle do Câncer, o Instituto Nacional do Câncer, órgão do Ministério da Saúde responsável pela coordenação e execução desta política, instituiu o Programa Nacional de Controle do Câncer da Próstata, com consenso estabelecido pela oficina de trabalho realizada no Rio de Janeiro em Junho de 2002. Neste consenso ficou definido não indicar o rastreamento populacional do câncer da próstata, baseado na ausência de evidências da efetividade das modalidades terapêuticas proposta para o câncer em estádios iniciais e do risco de seus efeitos adversos; indicar o rastreamento oportunístico, ou seja, a sensibilização de homens com idade entre 50 e 70 anos que procuram os serviços de saúde por motivos outros que o câncer da próstata sobre a possibilidade de detecção precoce deste câncer, por meio da realização do toque retal e da dosagem bioquímica do PSA total, informando-os sobre as limitações, os benefícios e os riscos da detecção precoce do câncer da próstata. Esta posição será reavaliada após os resultados dos ensaios clínicos atualmente em andamento nos Estados Unidos da América (“Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial - PLCO”) e Europa (“European Randomized Screening for Prostate Cancer Trial - ERSPC”) (INCA, 2002).

O exame digital retal da próstata apresenta uma sensibilidade de 67 % a 69 % e especificidade de 89 % a 97 %, de acordo com Guinan et al. (1980) e Vihko et al. (1985) e valor preditivo positivo analisado isoladamente de 21 % segundo Catalona; Richie; Ahmann (1994b).

O antígeno prostático específico, (PSA), é uma glicoproteína, com função de protease neutra contendo 93 % de aminoácidos e 7 % de carboidratos, constituída por um monômero com 240 aminoácidos e carboidratos em 4 sítios de ligações, com peso molecular de 34 kilodalton. Ela é produzida pelas células acinares e ductais da glândula prostática. Os

conhecimentos atuais sobre esta proteína evidenciam em sua estrutura molecular, pelo menos 5 epitopos (regiões de um determinante antigênico que fazem contato com o sítio de ligação do antígeno na molécula do anticorpo ou no receptor da célula t). Estes epitopos servem de antígenos para anticorpos utilizados nas técnicas usuais de dosagens do PSA (BRAWER; KIRBY, 1998).

O PSA é produzido pelas células colunares do epitélio dos ácinos e ductos prostáticos normais, com alterações benignas (inflamações, infecções, infartos) e na maioria, porém, não em todos os tipos de câncer da próstata. As células colunares são circundadas pela camada de células basais presentes em todas as alterações benignas do epitélio, que por sua vez são circundadas pela membrana basal (BRAWER; KIRBY, 1998).

Na neoplasia intra-epitelial (PIN), considerada como lesão pré-maligna do câncer da próstata, a camada de células basais pode estar interrompida em algumas áreas. No câncer da próstata, a membrana basal encontra-se interrompida principalmente nas áreas relacionadas com a invasão tumoral. Circundando a membrana basal encontramos o estroma prostático composto por células musculares lisas, fibroblastos, nervos e vasos sanguíneos. Para que o PSA e as células metastáticas tenham acesso à circulação sanguínea, é preciso vencer esta barreira constituída pelas camadas de células basais, a membrana basal, estroma prostático e o endotélio capilar. Esta barreira parece ser efetiva na manutenção do gradiente de concentração do PSA entre os lumens dos ácinos e ductos prostáticos e a circulação sanguínea. Ruptura destas barreiras por diferentes processos patológicos tanto benignos (hiperplasia nodular da próstata, prostatites, infarto prostático, trauma) quanto malignos, especialmente o câncer da próstata, são fatores que influenciam os diferentes níveis de PSA dosados no sangue periférico (BRAWER; KIRBY, 1998).

O PSA é encontrado na circulação sanguínea em três formas: livre, ligado à α 1 antiqumotripsina, denominado PSA complexado e ligado à α 2 macroglobulina. A forma

livre do PSA é a encontrada em menor quantidade no plasma e no ejaculado. A maior quantidade de PSA se encontra no plasma sob a forma ligada à $\alpha 1$ antitripsina, uma proteína que inativa a atividade proteásica do PSA. A $\alpha 2$ macroglobulina envolve a molécula do PSA, não permitindo que seus epitopos sejam expostos aos anticorpos utilizados pelos métodos atuais de dosagem do PSA comercialmente disponíveis. Estes métodos conseguem dosar o PSA livre, o PSA total: a soma do PSA livre e ligado à $\alpha 1$ antitripsina e o PSA complexado (BRAWER; KIRBY, 1998).

O câncer da próstata, os processos inflamatórios agudos e o infarto da próstata, são eventos que quantitativamente mais alteram os níveis de PSA no sangue. Neoplasia intra-epitelial (PIN) e processos inflamatórios crônicos têm sido relatados como entidades que alteram seus níveis em menor intensidade (BRAWER; KIRBY, 1998).

Os níveis de PSA no sangue dependem diretamente do volume de tecido prostático benigno ou maligno (STAMEY; YANG; HAY, 1987; STAMEY; KABALIN, 1989).

Em hiperplasia nodular da próstata (HNP) cada grama de tecido eleva os níveis séricos de PSA em 0,31 ng/mL (dosado pela metodologia Yang[®]) o que faz com que entre 18 % e 47 % dos pacientes com esta patologia, tenham PSA > 4,0 ng/mL e entre 2 % e 10 % dos mesmos tenham PSA > 10 ng/mL (LANGE; ERCOLE; VESSELA, 1986; STAMEY; YANG; HAY, 1987; BUAMA; JOHNSON; SKILLEN, 1989).

Nos casos de adenocarcinoma da próstata, cada grama de tecido neoplásico aumenta os níveis séricos do PSA em 3,5 ng/mL (dosado pela metodologia Yang[®]), o que indica que quanto maiores os valores do PSA maior é o volume do tumor do paciente, (STAMEY; YANG; HAY, 1987).

No câncer da próstata, os níveis séricos do PSA aumentam progressivamente à medida que aumenta o estágio da doença (LANGE; ERCOLE; VESSELA, 1986).

Entre 81 % e 97 % dos pacientes com adenocarcinoma da próstata e cerca de 50 % dos pacientes com hiperplasia nodular da próstata apresentam níveis elevados de PSA (LANGE; ERCOLE; VESSELA, 1986; FERRO et al., 1987; BUAMA; JOHNSON; SKILLEN, 1989).

Atualmente, trabalhos têm demonstrado uma discreta elevação nos níveis sanguíneos de PSA após relacionamento sexual, com pico em torno de 1 hora após a ejaculação, retornando aos níveis basais em aproximadamente após 24 horas (TCHETGEN et al., 1996).

Os valores séricos do PSA podem duplicar após toque retal, quadruplicar após cistoscopia, aumentar até 50 vezes após ressecção trans-uretral da próstata (STAMEY; YANG; HAY, 1987; WILLIAMS, 1988).

Abstinência sexual diminui os níveis séricos do PSA. O ciclismo, massagem prostática, biópsia e o ultra-som trans-retal da próstata elevam seus níveis. Outros exercícios físicos não os alteram (STAMEY; YANG; HAY, 1987; WILLIAMS, 1988; BRAWER; KIRBY, 1998).

Como a meia vida das formas do PSA é em média, de 2,6 dias, as dosagens do PSA no sangue somente devem ser realizadas após 3 dias do toque retal, após 7 dias da cistoscopia, e após 20 dias da ressecção trans uretral da próstata (BRAWER; KIRBE, 1998; SROUGI; SIMONS, 1990).

A ressecção trans-uretral da próstata (RTUP) também interfere nos níveis sanguíneos de PSA uma vez que o epitélio prostático é quem o produz. Níveis de corte no PSA de 0 a 4,0 ng/mL pelo método Tandem R[®] não são adequados para pacientes submetidos a RTUP, na avaliação e indicação de biópsia da próstata, para diagnóstico precoce do câncer prostático (BRAWER; KIRBY, 1998).

O uso de inibidores da 5 alfa redutase no tratamento da hiperplasia nodular da próstata está associado à importante diminuição no nível de dehidrotosterona intraprostático e, conseqüentemente, alguns trabalhos referem uma diminuição em 50% nos níveis sanguíneos de PSA nestes pacientes (WILLIFORD; LEPOR; DIXON, 1996).

Como os níveis séricos do PSA elevam-se já em fases iniciais da neoplasia imaginou-se que pudesse auxiliar na detecção precoce do câncer da próstata. Contudo, a baixa especificidade (E) das dosagens de PSA (de 9 % a 55 % dos pacientes com hiperplasia prostática benigna, prostatite ou infarto da próstata tem PSA elevado), tornam este exame pouco relevante como método de diagnóstico precoce da neoplasia (EDITORIAL LANCET, 1988).

Um estudo multi-institucional em 6630 pacientes, combinando toque retal com dosagens do PSA pela metodologia Tandem[®], no rastreamento do câncer da próstata, mostrou que 26 % dos pacientes com essa neoplasia apresentaram PSA acima de 4,0 ng/mL ou anormalidade no toque retal e 4 % apresentaram toque retal alterado e níveis de PSA acima de 4,0 ng/mL, achados indicativos de biópsia da próstata. O PSA sozinho, dosado pela metodologia Tandem[®] apresentou um desempenho inexpressivo no diagnóstico do câncer da próstata, com valor preditivo positivo (VP +) de 26 % para PSA entre 4,0 ng/mL e 9,9 ng/mL e de 53 % para PSA > 10,0 ng/mL. Neste estudo o efeito dos achados no toque retal e nas dosagens do PSA, nos valores preditivos positivo para o câncer da próstata, mostrou que o valor preditivo positivo mais alto, de 55 %, foi encontrado quando o paciente apresentava alterações no toque retal e no PSA dosado pela metodologia Tandem[®]. O PSA sozinho apresentou um valor preditivo positivo de 32 %, mais alto do que o valor preditivo positivo da alteração do toque retal isoladamente, que foi de 21 %. (CATALONA; RICHIE; AHMANN, 1994b).

Pela metodologia Tandem[®], aproximadamente 25 % dos pacientes com câncer da próstata recentemente diagnosticados, apresentaram níveis normais de PSA no sangue (< 4,0 ng/mL), e 66 % dos homens com PSA > 4,0 ng/mL pela metodologia Tandem[®] apresentaram histologia benigna na biópsia guiada por ultra-som, procedimento que tem morbidade significativa (BRAWER; KIRBY, 1998).

Após prostatectomia radical, os níveis de PSA tornam-se indetectáveis ($PSA \leq 0,04$ ng/mL pelo método Tandem R[®]) em 85 a 91 % dos pacientes. Isto ocorre entre 2 e 3 semanas após o procedimento cirúrgico. Este comportamento tem grande valor prognóstico, sendo utilizado nos controles pós-operatórios da cirurgia (OESTERLING et al., 1988; STAMEY; KABALIN, 1989).

A persistência do PSA acima de 0,04 ng/mL pela metodologia Tandem R[®], após prostatectomia radical, acompanha-se de persistência da doença na maioria dos pacientes (LANGE et al., 1989).

As medidas para melhorarem o desempenho do PSA Bioquímico como marcador tumoral, tais como: aumento na sensibilidade, avaliações do PSA em diferentes níveis de corte, densidade do PSA (relação entre PSA bioquímico total no sangue e volume prostático mensurado pelo ultra-som), velocidade anual de crescimento, relação PSA livre / PSA total, foram questionadas por vários trabalhos da literatura (BRAWER; KIRBY, 1998).

O consenso de que o ponto de corte no valor do PSA sangüíneo pela metodologia Tandem[®], para indicação de biópsia da próstata, fosse mantido em 4,0 ng/mL segundo Brawer e Kirby (1998), atualmente tem sido questionado, havendo estudo sugerindo que o ponto de corte para indicação de biópsia deva ser de 2,5 ng/mL, com esta metodologia, para pacientes com idade entre 50 e 60 anos (CANTO; SHARIAT; FLAWIN, 2003).

No estudo de Brawer et al. (1993a), a dosagem do PSA isolado é tão eficiente quanto a densidade do PSA em prever câncer da próstata.

Em relação à densidade do PSA, como está padronizado biópsia aleatória sextante, com retirada de 3 fragmentos em cada lobo na zona periférica da glândula, é mais provável que o tumor localizado seja biopsiado no paciente com próstata menor e, conseqüentemente, densidade do PSA elevada, do que naqueles com próstatas maiores e baixa densidade do PSA (BRAWER; KIRBY, 1998).

A velocidade de crescimento do PSA aumenta tanto nos pacientes com câncer da próstata quanto naqueles sem a neoplasia, porém, em escalas diferentes. No câncer da próstata, evidentemente, com o tempo, o tumor vai ficando maior e mais avançado no seu estadiamento e, conseqüentemente, a velocidade de crescimento do PSA aumenta exponencialmente (BRAWER; KIRBY, 1998).

Estudos têm mostrado que variações biológicas podem ser responsáveis por uma diferença de 25 % a 30 % entre duas dosagens anuais de PSA. O PSA deve aumentar mais que 25 % antes de se indicar procedimentos para excluir o câncer da próstata (NIXON et al., 1997).

A relação PSA livre/total tem seu valor na decisão de não se fazer biópsia naqueles pacientes com PSA pouco elevado. O câncer da próstata mais agressivo parece estar associado com resultado mais baixo na relação PSA livre/total (BRAWER; KIRBY, 1998).

O estudo multicêntrico realizado por Catalona; Richie; Ahmann (1997a) analisando a relação PSA livre/total em 622 homens com PSA total entre 4,0 e 10,0 ng/mL pela metodologia Tandem[®], e toque retal normal, mostrou que com o ponto de corte entre PSA livre/total em 25 %, indicando-se biópsia da próstata quando a relação for menor que 25 %, o câncer da próstata foi detectado em 95 % dos casos.

A relação PSA livre/total é útil para indicação de biópsia da próstata, nos pacientes com PSA entre 4,0 e 10,0 ng/mL pela metodologia Tandem[®], nos quais um número significativo de pacientes, mais de 60 %, têm biópsias negativas (BRAWER; KIRBY, 1998).

Outro grupo onde a relação PSA livre/total possa somar no rastreamento, seria nos pacientes com biópsias negativas, na indicação de re-biópsias. Aproximadamente 2/3 das biópsias da próstata são negativas e um significativo número destes paciente são portadores de câncer da próstata (ELLIS; BRAWER, 1995).

A dosagem do PSA total, o denominador da relação PSA livre/total, pode induzir significativa variabilidade, de acordo com o método de dosagem, principalmente, quando se

utiliza um método de dosagem não equimolar, que reconhece a parte livre e a total em proporções diferentes. Cada método de dosagem deve definir o seu ponto de corte para a relação PSA livre/total, que servirá de orientação para indicar a biópsia da próstata. Muitos autores reconhecem que estes testes devem ser feitos utilizando-se pontos de cortes que permitam uma sensibilidade em torno de 90 % (BRAWER; KIRBY, 1998).

Algumas combinações dos testes positivos: toque retal positivo, PSA total bioquímico > 4,0 ng/mL dosado pela metodologia Tandem[®], presença de lesões hipocóicas no ultra-som trans-retal da próstata, aumentam o valor preditivo para o câncer da próstata (BRAWER; KIRBY, 1998).

O ultra-som trans-retal é considerado importante no diagnóstico de nódulos intra-prostáticos de outra natureza, que não o câncer da próstata, tais como infartos, prostatite, cistos e áreas de fibrose, que fazem com que os resultados falsos negativos para o câncer seja elevado (SROUGI; SIMON, 1990).

Atualmente, existe consenso de que o ultra-som da próstata trans-retal é útil para direcionar a biópsia automática da próstata, orientando-a também para eventuais nódulos hipocóicos, pode fornecer informações que possam ser úteis no estadiamento inicial do câncer da próstata e é útil também para a avaliação da resposta terapêutica, através de variações do volume da glândula após radioterapia ou terapia endócrina (BRAWER; KIRBY, 1998; SROUGI; SIMON, 1990).

O câncer da próstata é diagnosticado pelo exame anátomopatológico do material obtido pela biópsia da próstata, sendo de rotina, na primeira biópsia da próstata trans-retal guiada por ultra-som, retirados 4 fragmentos de cada lobo da próstata, incluindo também fragmentos de áreas ultrasonográficas suspeitas. O grau da neoplasia é definido pela escala da Gleason (1977), e o estadiamento clínico realizado de acordo com a classificação de Whitmore (1965) e Jewett (1975).

O câncer da próstata é, sabidamente, uma doença multifocal, o que leva à possibilidade de subestadiamento dos escores das biópsias em relação aos das peças cirúrgicas (GLEASON, 1992).

O risco de conduta cirúrgica inadequada parece ser mais alto, ao analisar o Gleason das biópsias, nos tumores aparentemente mais diferenciado, Gleason 6, do que nos aparentemente mais indiferenciados, Gleason 7, onde a concordância dos escores das biópsias com os das peças cirúrgicas é maior (STEINBERG et al., 1997).

Segundo Steinberg et al. (1997) o subestadiamento dos escores de Gleason das biópsias em relação aos escores das peças cirúrgicas poderia ser justificado pelo fato do tumor ser multifocal, pela subjetividade da leitura da lâmina, pelos achados no tumor de áreas limítrofes entre um escore e outro e pela amostragem, uma vez que, a quantidade de tecido disponível para exame na biópsia é menor em relação à quantidade disponível nas peças cirúrgicas.

O uso de nomogramas, "Partin Tables", utilizando como parâmetros alterações do toque retal, Gleason da biópsia e o resultado do PSA bioquímico pré-operatório nos fornece as probabilidades do estadiamento patológico em termos de probabilidades de doença confinada à próstata, extensão extraprostática, invasão de vesículas seminais e metástases em gânglios linfáticos (PARTIN et al., 2001).

No passado, os pacientes com câncer da próstata apresentavam-se com neoplasia disseminada em 80 % dos casos e somente em 20 % dos casos a doença era diagnosticada numa fase inicial, como câncer localizado. Com os programas de prevenção amplamente divulgados pela mídia e a conseqüente conscientização da população masculina de realizar o rastreamento para detecção precoce do câncer da próstata, associado com métodos modernos de dosagem do PSA bioquímico, avanços tecnológicos no ultra-som, desenvolvimento de pistolas automáticas para biópsia da próstata, as incidências dos estadiamentos das neoplasias se modificaram. De acordo com os dados da "American Cancer Society", nos

EEUU em 1989, 64 % dos novos casos de câncer da próstata evidenciaram neoplasia localizada, 13 % apresentaram doença regional e 20 % tumor metastático (SILVERBERG; LUBERTA, 1989).

Dentre as opções para o tratamento da doença localizada incluem-se a cirurgia radical, a radioterapia e a observação vigilante. A observação vigilante pode ser empregada em pacientes com idade acima de 75 anos, com expectativa de vida limitada e tumores de baixo grau. A radioterapia pode ser dividida em externa e intersticial (braquiterapia), sendo esta última, indicada isoladamente aos pacientes com bom prognóstico (T1-T2a, PSA bioquímico total < 10,0 ng/mL e Gleason < 7). A prostatectomia radical é o procedimento padrão ouro para o tratamento do câncer localizado da próstata (BRASIL, 2002).

No estadiamento patológico do câncer da próstata utiliza-se a classificação TNM 92 (T-Tumor, N -Linfonodos, M - Metástases), de acordo com consenso da União Internacional Contra o Câncer em 1992, sendo o grau da neoplasia definido pela escala de Gleason (GLEASON, 1977; SCHRÖDER et al., 1992).

As sensibilidades das técnicas atuais de estadiamento clínico, são inadequadas, segundo Schellhammer; Schlossberg; Wright (1989) e Voges et al. (1992), no sentido de selecionar os pacientes com maior probabilidade prognóstica de cura do câncer da próstata com a cirurgia radical.

Segundo Stamey e McNeil (1992), as modalidades de estadiamento do câncer da próstata não são adequadas.

Com a cirurgia radical cerca de 85 % dos pacientes não apresentam evidência da doença após 5 anos e 67 % após 10 anos. Estes resultados foram observados nos pacientes que apresentaram no estadiamento patológico pela classificação TNM 92, ausência de margens cirúrgicas comprometidas e ausência de invasão de vesículas seminais e PSA total bioquímico no controle pós-operatório, $\leq 0,04$ ng/mL. Este tratamento pode apresentar complicações, tais

como: incontinência urinária, disfunção erétil, estenose de uretra ou do colo vesical, lesões do reto e as complicações inerentes às cirurgias de grande porte (BRASIL, 2002).

Tumores sólidos em animais de experimentação sugerem que basta apenas 0,01 % de células tumorais circulantes para gerar um depósito metastático. Duas células tumorais por mL de sangue seriam suficientes para promover disseminação tumoral (FIDLER; HART, 1982).

Com o advento da reação em cadeia da polimerase, (PCR), desenvolvida por Mullis e colaboradores em 1984, que lhe valeu o prêmio Nobel de Química em 1993, e o constante desenvolvimento tecnológico relacionado tanto com a técnica de realização da PCR quanto com a síntese de “primers” de biomarcadores específicos, a identificação de células metastáticas no sangue periférico tornou-se possível, permitindo a identificação de micrometástases circulantes (SAIKI et al., 1985; SMITH et al., 1991; MATTANO; MOSS; EMERSON, 1992; MORENO et al., 1992).

Muitos genes (biomarcadores) estão sendo isolados e estudos das suas expressões em amostra de sangue periférico e/ou de tecidos, em várias linhas de pesquisa, têm fornecido importantes informações sobre o desenvolvimento e estadiamento molecular do câncer da próstata. Estes estudos fornecem também subsídios no sentido de aumentar a segurança na decisão da conduta terapêutica, no controle pós-tratamento e no acompanhamento clínico dos pacientes, com o intuito de incorporá-los na prática clínica (BUSSEMAKERS et al., 1999).

A Transcriptase Reversa Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), utilizando “primers” para o Antígeno Prostático Específico (PSA) e Antígeno Prostático de Membrana (PSM), tem sido considerada de interesse pela sua alta sensibilidade e baixos índices de falso negativo, havendo expectativas de se obter com estes ensaios, prognóstico molecular tanto nos pacientes com câncer localizado que requerem tratamento adjuvante, quanto nos pacientes com doença metastática hormônio resistente (OLSON et al., 1997).

A RT-PCR "Nested" é um método utilizado para melhorar a sensibilidade da RT-PCR, fazendo uso de "primers nested". Nesta metodologia, após a realização de uma reação de PCR, uma alíquota do produto obtido é re-amplificado usando um conjunto de "primers" diferentes que são complementares às seqüências internas no primeiro produto da PCR. Esta técnica tem por finalidade detectar genes de baixa expressão, presentes principalmente em sangue periférico, uma vez que aumenta a concentração do produto amplificado (GHOSSEIN et al., 1995).

A técnica da RT-PCR "Nested" ao utilizar 2 ampliações, tem uma grande sensibilidade, amplificando milhões de vezes as moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA), aumentando a sensibilidade para uma célula metastática em 250.000 células (um mL de sangue) (BRASILEIRO FILHO; BARBOSA; MIRANDA, 2000).

No estudo de Jaakkola et al. (1995), os pacientes do grupo controle constituído por 4 pacientes com HNP submetidos à cirurgia, 2 com cálculos renais, e 3 com outros tumores (rim, testículo e bexiga) não apresentaram RT-PCR PSA positivo. No grupo de estudo a RT-PCR PSA foi negativa nos 7 pacientes sem metástases e positiva em 9/18 pacientes (50,0 %) dos pacientes com metástases. Nos pacientes com doença metastática, a RT-PCR PSA foi negativa naqueles que estavam em tratamento hormonal e com baixos níveis de PSA bioquímico total.

No trabalho publicado por Loric et al. (1995), a RT-PCR PSA no sangue foi negativo nos 53 pacientes do grupo controle constituído por: 15 mulheres com idade entre 18 e 35 anos, 20 homens com idade entre 22 e 37 anos e 18 pacientes com HNP com idade entre 48 e 69 anos submetidos a tratamento cirúrgico. Ela foi positiva em 3/27 (11%) dos pacientes com câncer localizado da próstata e em 17/33 (51 %) dos pacientes com câncer metastático pelo estadiamento patológico TNM 92.

Os resultados obtidos com a cirurgia radical no tratamento do câncer da próstata, motivou a realização deste estudo, onde foi avaliada a associação da positividade do PSA por método molecular (através da RT-PCR "Nested") no sangue, no pré-operatório, com o estadiamento patológico pela classificação TNM 92 e com os diagnósticos nos controles pós-operatórios, procurando criar um estadiamento molecular e avaliar o prognóstico de cura desta neoplasia com o tratamento cirúrgico.

2 OBJETIVOS

Estabelecer estadiamento molecular para o câncer da próstata e avaliar o seu prognóstico de cura, com a cirurgia radical.

3 PACIENTES E MÉTODO

3.1 Pacientes

O grupo de estudo foi constituído de 32 pacientes. A mediana de idade destes pacientes foi de 66 anos com variação de 46 a 80 anos, sendo 19/32 (59,4%) leucodermos, 9/32 (37,5%) faiodermos e 1/32 (3,1%) melanodermo, com diagnóstico de câncer da próstata com indicação cirúrgica, 15/32 (46,8%) com estadiamento clínico compatíveis com B₁ e 17/32 (53,2 %) com B₂, pela classificação de Whitmore (1965) e Jewett (1975), que se submeteram à cirurgia radical da próstata (prostatovesiculectomia radical e linfadenectomia obturatória bilateral (ANEXO 9.1 e 9.2).

O grupo controle foi constituído de 14 pacientes. A mediana da idade foi de 73,5 anos com variação de 49 a 80 anos, sendo 9/14 (64,3%) leucodermos 4/14 (28,6%) faiodermos e 1/14 (7,1%) melanodermo, com diagnóstico de hiperplasia nodular da próstata com indicação cirúrgica, dos quais 11/14 (79%) se submeteram à ressecção trans-uretral da próstata e 3/14 (21%) à prostatectomia trans-vesical (ANEXO 9.1).

3.2 Modelo do estudo

Estudo prospectivo, analítico, em diagnóstico, realizado no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas (HC), da Faculdade de Medicina (FAMED) e Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no período de 2001 a 2003.

No grupo de estudo foi feita a dosagem qualitativa do PSA por RT-PCR "Nested", em amostra de sangue periférico, coletada no pré-operatório, no dia da cirurgia radical da próstata. No controle pós-operatório, no mínimo 30 dias após o tratamento cirúrgico, foi

coletada uma amostra de 10 mL de sangue periférico, para dosagem bioquímica quantitativa do PSA total.

No grupo controle foi feita dosagem do PSA qualitativo por RT-PCR “Nested”, em amostra de sangue periférico, coletada no pré-operatório, no dia da cirurgia para tratamento da hiperplasia nodular da próstata.

As dosagens do PSA por RT-PCR “Nested” foram associadas com o câncer da próstata localizado, com o câncer com invasão local ou metastático e com a hiperplasia nodular da próstata, diagnosticadas pelos exames anatomopatológicos das peças cirúrgicas com estadiamento do tumor pela classificação TNM 92, considerados “gold standard” no diagnóstico das patologias prostáticas e com os diagnósticos laboratoriais de câncer localizado (cura laboratorial) e câncer com invasão local ou metastático pelas dosagens do PSA bioquímico total, no sangue, no controle pós-operatório da prostatectomia radical.

3.3 Levantamento dos dados

Os pacientes foram identificados pelos seus números de prontuários do HC da UFU . Os dados deste estudo foram armazenados no banco de dados “Access” da Microsoft[®], do qual se extraíram relatórios que permitiram analisar os dados relevantes desta pesquisa.

3.4 Rastreamento do câncer da próstata

No Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, o rastreamento anual do câncer da próstata é realizado nos pacientes sem história familiar de câncer da próstata, a partir de 50 anos de idade, e a partir de 40 anos, naqueles com história familiar desta neoplasia, e/ou nos pacientes da raça negra.

No rastreamento do câncer da próstata, os pacientes foram submetidos ao exame clínico, ao exame digital retal da próstata, e, no mínimo, 5 dias após o toque retal, dosagem bioquímica do PSA total em amostra de sangue periférico.

3.5 Diagnóstico e estadiamento do câncer da próstata

Os pacientes com suspeita de câncer da próstata, seja pelo toque retal, dosagem bioquímica quantitativa do PSA total, em amostra de sangue periférico, (assim considerado quando maior que 4,0 ng/mL), ou ambos, foram submetidos à biópsia da próstata por via trans-retal e exame anátomopatológico.

O Rx da bacia, coluna lombar, sacral, dos fêmures e do crânio ou o mapeamento ósseo com radioisótopos (Tecnécio), foram solicitados, nos pacientes com níveis de PSA total bioquímico $\geq 10\text{ng/mL}$, no sangue, no pré-operatório e naqueles com sintomas relacionados com acometimento ósseo, independentemente dos níveis do PSA.

3.6 Exames pré-operatório, risco cirúrgico e expectativa de vida

Os pacientes com diagnóstico de câncer da próstata para indicação de prostatectomia radical e os com hiperplasia nodular da próstata para indicação de tratamento cirúrgico, fizeram avaliações clínicas, foram submetidos aos exames pré-operatórios de rotina do HC da UFU e outros exames quando necessário, não relevantes neste estudo, segundo metodologias e técnicas habituais, estabelecendo-se o risco cirúrgico de acordo com os critérios da "American Anesthesiology Association" (ORTENZE, 2001). Os pacientes com câncer da próstata foram avaliados também quanto à expectativa de vida de 10 ou mais anos.

3.7 Procedimentos cirúrgicos

A biópsia da próstata por via trans-retal, foi realizada com uso de antibioticoprofilaxia, com anestesia local, guiada ou não por ultra-sonografia trans-retal, utilizando-se o conjunto de agulha com pistola automática, (BARD® - 18 g x 20 cm - Referência MC 1820), procurando-se de rotina, retirar 8 fragmentos, 4 do lobo direito e 4 do lobo esquerdo. A biópsia, quando guiada pelo ultra-som, incluiu fragmento(s) de área(s) ultrasonográfica(s) suspeita(s) de neoplasia. Os fragmentos biopsiados foram acondicionados em 2 frascos de vidro com formol a 10 %, rotulados como fragmentos do lobo direito e do lobo esquerdo, e enviados para exame anátomopatológico.

A técnica cirúrgica utilizada no tratamento do câncer localizado da próstata, prostatovesiculectomia radical e linfadenectomia dos gânglios linfáticos obturatórios bilaterais, foi a inicialmente descrita por Young (1905), modificada por Walsh et al. (1983) com intuito de reduzir a morbidade da intervenção, especialmente incontinência urinária e impotência sexual.

As técnicas cirúrgicas para tratamento da hiperplasia nodular da próstata foram utilizadas de acordo com suas descrições clássicas: a ressecção trans-uretral da próstata (RTUP) de acordo com a técnica inicialmente descrita por McCarthy em 1932, atualmente padronizada (MEBUST, 1994); a prostatectomia retro-púbica conforme a técnica descrita por Millin (1947) e a prostatectomia trans-vesical de acordo com a técnica proposta por Eugene Fuller em 1894 (Walsh et al., 2002).

Os procedimentos cirúrgicos foram realizadas no Centro Cirúrgico, pelos médicos do Serviço de Urologia do HC da UFU.

3.8 Critérios de inclusão nos grupos de estudo e controle

Na composição do grupo de estudo, os critérios utilizados na seleção dos pacientes para cirurgia radical foram: biópsia prostática com diagnóstico histológico de adenocarcinoma

usual; Gleason total < 8; PSA total no sangue, no pré-operatório ≤ 20 ng/mL; estadiamentos clínicos B1 e B2 de acordo com a classificação de Whitmore (1965) e Jewett (1975); ausência de metástases ósseas pela avaliação radiológica e/ou pelo mapeamento ósseo com Tecnécio, quando realizados; idade menor ou igual a 80 anos e expectativa de vida de 10 ou mais anos; apresentar risco cirúrgico aceitável para o porte da cirurgia; consentir com a prostatovesiculectomia radical e linfadenectomia obturatória bilateral, como opção terapêutica; não ter realizado exame digital retal da próstata há menos de 5 dias e biópsia prostática há menos de 15 dias da data da realização da cirurgia; permitir coleta de sangue periférico para os exames necessários para a realização deste trabalho e concordar em participar e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido deste estudo, aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da UFU (ANEXO 9.1, 9.4, 9.5, 9.7 e 9.8).

Os critérios de inclusão dos pacientes no grupo controle foram: diagnóstico de hiperplasia nodular da próstata com indicação cirúrgica; exame digital retal negativo para câncer da próstata; dosagem quantitativa do PSA bioquímico total no sangue, no pré-operatório ≤ 20 ng/mL; biópsias prostáticas negativas nos pacientes com PSA total no sangue maior que 4,0 ng/mL; idade menor ou igual a 80 anos; apresentar risco cirúrgico aceitável para o porte da cirurgia; consentir com as opções cirúrgicas de tratamento da HNP (RTUP ou prostatectomias trans-vesical ou retro-púbica); não ter realizado exame digital retal da próstata há menos de 5 dias e biópsia prostática há menos de 15 dias da data da realização da cirurgia; permitir coleta de sangue periférico para os exames necessários para a realização deste trabalho; apresentar confirmação do diagnóstico de hiperplasia nodular da próstata pelo exame anatomopatológico da peça cirúrgica; concordar em participar e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido deste estudo, aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da UFU (ANEXO 9,1, 9.7 e 9.8).

3.9 Exames anátomopatológicos

Os exames anátomopatológicos das biópsias da próstata e das peças das cirurgias, obtidas com as cirurgias para tratamento da hiperplasia nodular da próstata (próstata ou fragmentos da próstata) e com a cirurgia radical (próstata, vesículas seminais e linfonodos obturatórios bilaterais), foram considerados “gold standard” no diagnóstico das patologias prostáticas. Nos casos de câncer da próstata definiu o tipo histológico da neoplasia, com o grau do tumor sendo definido de acordo com a escala de Gleason (1997) (ANEXO 9.4) e a extensão da neoplasia estadiada de acordo com a classificação TNM 92, consensuada pela União Internacional Contra o Câncer em 1992 (UICC, 1992; SCHRÖDER et al., 1992) (ANEXO 9.5).

As lâminas dos exames anátomopatológicos das biópsias e das peças cirúrgicas foram analisadas pelos médicos do Departamento de Patologia do HC da UFU, de maneira cega.

3.10 Dosagem qualitativa do PSA por RT-PCR “Nested”.

3.10.1 Obtenção das amostras

As amostras, cada uma com 10 mL de sangue com anticoagulante, foram coletadas em tubos tratados com etileno di-amino tetra-acético (EDTA), (BD[®] Vacutainer - Referência 367861), no HC da UFU pela equipe médica do Serviço de Urologia, dentro da rotina do centro cirúrgico, ambulatório e laboratório desta instituição, sem nenhum desconforto adicional aos pacientes.

Após coleta, o sangue foi mantido a 4° C e enviado ao Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, para processamento.

3.10.2 Extração do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm)

O ácido ribonucléico (RNA) total do sangue periférico foi extraído com Trizol "Reagent" (GIBCO BRL) conforme os procedimentos descritos em protocolo (ANEXO 9.6), otimizado no Laboratório de Genética Molecular da UFU e seguindo-se as recomendações do fabricante.

A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,2 %, por 1 hora a 100 volts, utilizando-se como tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e visualizado por luz ultravioleta (sistema de videodocumentação "ImageSystem" – VDS, Pharmacia Biosciences). O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (SPEKOL UV VISDEZEISS Ultrospech 1000 - Pharmacia Biosciences) a 260 nm. Após avaliação, o ácido ribonucléico foi armazenado a - 80°C.

3.10.3 RT-PCR "Nested"

3.10.3.1 Transcrição reversa - Síntese do cDNA

As amostras extraídas foram submetidas à transcrição reversa nas seguintes condições: 1 µg de RNA total, 40 U de MMLV-RT (Pharmacia Biosciences), 1 X tampão da enzima de transcrição reversa (Pharmacia Biosciences), 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros randômicos (hexanucleotídeos randômicos). A reação foi completada com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) para um volume final de 20 µL, incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) a 37 °C por 1 hora e aquecida a 95 °C por 5 minutos.

3.10.3.2 Reação para qualificação do RNA

O produto de transcrição reversa, ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA), foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). O gene constitutivo β -2-microglobulina foi utilizado para caracterizar a qualidade do RNA. A reação foi preparada para um volume final de 20 μ L contendo os seguintes reagentes: 5 μ L de cDNA; 1,0 U de Taq DNA Polimerase, 1 X Tampão da Taq DNA Polimerase (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3); 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP); 5 pmoles de cada oligonucleotídeo ("primer") para amplificação do gene β -2-microglobulina, seqüência descrita por Bussemakers et al. (1999) (TABELA 1). O volume final foi completado com água ultrapura.

O programa de ciclagem constitui-se de um ciclo inicial a 94 °C por quatro minutos, 35 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 58 °C por 40 segundos, 72°C por 50 segundos e extensão final de 72 °C por 5 minutos.

3.10.3.3 Primeira amplificação por PCR

Após qualificação das amostras, foi realizada a primeira amplificação "out" para o gene alvo (PSA). A reação foi preparada para um volume final de 20 μ l contendo os seguintes reagentes: 3 μ L de cDNA; 1,0 U de Taq DNA Polimerase, 1 X Tampão da Taq DNA Polimerase (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3); 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP; 10 pmoles de cada "primer" direto e 7 pmoles de cada "primer" reverso para a amplificação dos genes PSA (TABELA 1). O volume final foi completado com água ultrapura.

O programa de ciclagem constitui-se de um ciclo inicial a 95 °C por quatro minutos, 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 59 °C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e uma extensão final de 72.°C por 2 minutos.

3.10.3.4 Segunda amplificação por PCR

Cinco microlitros do produto obtido da primeira reação foram adicionados à mistura contendo os seguintes reagentes: 1,0 U de Taq DNA Polimerase, 1 X Tampão da Taq DNA Polimerase (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3); 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP; 7 pmoles de cada “primer” direto e 7 pmoles de cada “primer” reverso para a amplificação dos genes PSA (TABELA 1). A reação foi completada para um volume final de 20 μL com água ultrapura.

Para o gene PSA foi realizado um “nested” completo, ou seja, 2 “primers” externos, ”out” e 2 internos “nested”.

TABELA 1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores da PCR para os genes PSA, e β-2-microglobulina.

“Primers”	Sequência 5' – 3'
β-2-microglobulina direto	AGC AGA GAA TGG AAA GTC AAA
β-2-microglobulina reverso	TGT TGA TGT TGG ATA AGA GAA
PSA direto “out”	AAC CAG AGG AGT TCT TGA CC
PSA reverso “out”	AAT AGG GGG TTG ATA GGG GTG CT
PSA direto “nested”	GTG TGT GGA CCT CCA TGT TA
PSA reverso “nested”	GTG ATA CCT TGA AGC ACA CC

O programa de ciclagem constitui-se de um ciclo inicial a 95 °C por quatro minutos, 28 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 59 °C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e uma extensão final de 72 °C por 2 minutos.

Todos os “primers” utilizados para a amplificação dos genes PSA foram desenhados utilizando-se o “software” Primer Designer, versão 2.0 e o “software” Oligotech, versão 1.0.

3.10.5 Eletroforese

Após a amplificação, 10 μ L de cada produto de PCR foram misturados com "Loading 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 1,5 % 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 VÍDEO DOCUMENTATION SYSTEM - VDS (PHARMACIA BIOTECH).

As dosagens qualitativas do PSA por RT-PCR "Nested", positivo e negativo, realizadas em amostras de sangue periférico, indicam, respectivamente, presença e ausência de células neoplásicas, micrometástases circulantes, conforme a técnica descrita, padronizada pelo Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU.

3.11 Dosagem bioquímica quantitativa do PSA

Na dosagem quantitativa do PSA total por método bioquímico, em amostra de sangue periférico, utilizou-se o Kit de dosagem quantitativa do PSA IMMULITE[®], de acordo com as instruções do fabricante, com valor normal oscilando entre 0 e 4,0 ng/mL para o PSA total.

No controle pós-operatório, no mínimo 30 dias após a cirurgia radical, foi considerado 0,04 ng/mL o ponto de corte na dosagem quantitativa do PSA total por método bioquímico, em amostra de sangue periférico, sendo considerado câncer com invasão local ou metastático, nestas condições, com este kit, se o PSA total bioquímico de controle pós-operatório for > 0,04 ng/mL (OESTERLING et al., 1988; LANGE et al., 1989; STAMEY; KABALIN, 1989).

3.12 Local de realização dos exames

Os exames laboratoriais, radiológicos, anátomopatológicos e moleculares por RT-PCR "Nested", foram realizados, respectivamente, pelo Laboratório de Análises Clínicas,

Departamento de Radiologia, Departamento de Patologia do HC e Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica, da UFU, segundo respectivas metodologias e técnicas habituais, de maneira cega.

Os exames de Medicina Nuclear, mapeamento ósseo com Tecnécio, quando realizados, foram feitos por instituições privadas segundo técnica habitual, de maneira cega.

3.13 Aprovação no CEP

Os procedimentos médicos e todas as técnicas de manipulação do material biológico seguiram as normas do Código Brasileiro de Ética Médica, conforme resolução do Ministério da Saúde (MS), Conselho Nacional de Saúde (CNS), nº. 196/96.

Este projeto faz parte de linha de pesquisa do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, com marcadores moleculares, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade (ANEXO 9.8).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação da concordância entre os patologistas, no estadiamento pela classificação TNM 92, foi utilizado o índice Kappa (LANDIS; KOCH, 1977).

Foram avaliados sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VP +), valor preditivo negativo (VP -), acurácia, prevalência, "odds ratio" das dosagens do PSA por RT-PCR "nested", no pré-operatório da prostatectomia radical e das cirurgias para tratamento da hiperplasia nodular da próstata, no diagnóstico da HNP e do câncer prostático com estadiamento pela classificação TNM 92 e nos diagnósticos de câncer localizado (cura laboratorial) e câncer com invasão local ou metastático pelas dosagens no sangue, do PSA total por método bioquímico, no controle pós-operatório.

05 RESULTADOS

Todos os dados individuais dos pacientes estudados, especialmente os relacionados com a baixa morbidade da prostatectomia radical e os dados dos controles pós-operatórios mostrando, num seguimento de 1 a 17 meses, a ocorrência de continência urinária em 100,0 % e de disfunção sexual em 29,0 % dos pacientes, estão descritos nos ANEXOS 9.1 e 9.2.

Nos exames anátomopatológicos, não houve discordância entre os examinadores, nos diagnósticos de hiperplasia nodular da próstata e de câncer da próstata tanto nas biópsias quanto nas peças cirúrgicas. A imunohistoquímica foi realizada em 3/32 (9,3 %) das biópsias confirmando o diagnóstico (ANEXO 9.1).

No estadiamento patológico TNM 92 dos pacientes submetidos à prostatectomia radical, a concordância entre os examinadores pelo índice Kappa foi de 87,0 % (ANEXO 9.3).

Em todos os pacientes com câncer da próstata, os exames anátomopatológico das biópsias prostáticas e das peças cirúrgicas apresentaram-se com diagnóstico histológico de adenocarcinoma acinar usual, encontrando-se neoplasia intra-epitelial (NIP) em 2/32 (6,3 %) das biópsias e em 10/32 (31,3 %) das peças cirúrgicas. Os escores de Gleason das biópsias foram subestadiados em relação aos escores das peças cirúrgicas em 14/32 (43,8 %) dos pacientes (ANEXO 9.1).

No estadiamento patológico pela classificação TNM 92 dos pacientes do grupo de estudo, encontraram-se câncer localizado em 18/32 (56,2 %) e câncer com invasão local ou metastático em 14/32 (43,8 %) dos casos. O estadiamento pT1 (tumor impalpável e invisível por técnicas de obtenção de imagem) ocorreu em 8/32 (25 %) dos pacientes e o estadiamento pT2 (tumor limitado à glândula prostática) em 10/32 (31,3 %) dos casos. O estadiamento pT3 (tumor estende além da cápsula prostática) ocorreu em 12/32 (37,5 %) dos pacientes, encontrando-se estadiamento pT3a e pT3b (extensão extra capsular) em 8/32 (25,0 %) e pT3c

(invasão de vesículas seminais) em 4/32 (12,5 %) dos casos. Estadiamento pT4a (tumor invadindo o colo vesical e/ou o esfíncter externo e /ou o reto) ocorreu em 1/32 (3,1 %) e pN1 (um linfonodo envolvido ≤ 2 cm) em 1/32 (3,1 %) dos pacientes (TABELA 1).

TABELA 1 - Pacientes com câncer da próstata estadiados pela classificação TNM-92.

Estadiamento TNM 92	Nº. de Pacientes	%
pT1	8	25,0%
pT1cpN0pM0	8	25,0%
pT2	10	31,3%
pT2apN0pM0	1	3,1%
pT2bpN0pM0	1	3,1%
pT2cpN0pM0	8	25,0%
Sub Total	18	56,3%
pT3	12	37,5%
pT3apN0pM0	4	12,5%
pT3bpN0pM0	4	12,5%
pT3cpN0pM0	4	12,5%
pT4	1	3,1%
pT4apN0pM0	1	3,1%
pN1	1	3,1%
pT3cpN1pM0	1	3,1%
Sub Total	14	43,8%
Total	32	100,0%

TNM, T - Tumor, N - Linfonodos, M - Metastases.

Os diagnósticos de RT-PCR "nested" PSA positivo e negativo, em amostras de sangue coletadas no pré-operatório, foram visualizados e documentados por fotografia no sistema VÍDEO DOCUMENTATION SYSTEM - VDS (PHARMACIA BIOTECH), conforme demonstrado na FIGURA 1.

A RT-PCR "nested" PSA no sangue, no pré-operatório, foi positiva em 3/3 (50 %) dos pacientes com hiperplasia nodular da próstata e em 10/18 (55,6 %), 6/11 (61,1 %) e em 4/7 (57,1 %) dos pacientes com câncer da próstata, câncer localizado e câncer com invasão local ou metastático, respectivamente (TABELA 2). A performance deste exame apresentou S de



As amplificações que vão de 1 a 7 e de 8 a 13 correspondem, respectivamente, às amostras positivas e negativas para os transcritos gênicos do PSA.

1 - HNP

2 - HNP

3 - CaP

4 - CaP

5 - CaP

6 - CaP

7 - CaP

8 - HNP

9 - HNP

10- HNP

11- HNP

12- CaP

13- CaP

M- marcador de peso molecular de 100 pb

O fragmento de 164 pb é o esperado pela reação "nested" completa. O fragmento de 200 pb corresponde a uma reação "semi-nested" para o PSA.

FIGURA 1 - Resultado do RT-PCR "nested" PSA positivo e negativo, documentado por fotografia pelo sistema Video Documentation System - VDS (PHARMACIA BIOTECH).

FONTE: Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU.

50 %, E de 44 %, VP + de 23 % e VP - de 73 % no diagnóstico da HNP em relação ao câncer da próstata e S de 56 %, 55 % e 57 %, E de 50 %, VP + de 77 %, 67 % e 57 %, VP - de 27 %, 38 % e 50 %, no diagnóstico do câncer da próstata, câncer localizado e câncer com invasão local ou metastático, respectivamente, em relação a HNP, diagnosticados pelos exames anátomopatológicos com estadiamento TNM 92 (TABELA 3).

TABELA 2 - RT-PCR PSA no sangue no pré-operatório, nos grupos controle e de pacientes com câncer da próstata estadiados pela classificação TNM 92.

GRUPOS	Nº	%	RT-PCR PSA no sangue				
			Positivo		Negativo		
			Nº	%	Nº	%	
Controle							
HNP Sub. à Cirurgia	14		3	50,0%	3	50,0%	
	Total 14		3	50,0%	3	50,0%	
Câncer da Próstata							
Estadiamento TNM 92							
pT1	8	25,0%	5	71,4%	2	28,6%	
	pT1cpN0pM0	8	25,0%	5	71,4%	2	28,6%
pT2	10	31,3%	1	25,0%	3	75,0%	
	pT2apN0pM0	1	3,1%	1	100,0%		
	pT2bpN0pM0	1	3,1%				
	pT2cpN0pM0	8	25,0%			3	100,0%
	Sub Total	18	56,3%	6	54,5%	5	45,5%
pT3	12	37,5%	4	57,1%	3	42,9%	
	pT3apN0pM0	4	12,5%	3	100,0%		
	pT3bpN0pM0	4	12,5%	1	100,0%		
	pT3cpN0pM0	4	12,5%			3	100,0%
pT4	1	3,1%					
	pT4apN0pM0	1	3,1%				
pN1	1	3,1%					
	pT3cpN1pM0	1	3,1%				
	Sub Total	14	43,8%	4	57,1%	3	42,9%
	Total	32	100,0%	10	55,6%	8	44,4%

RT-PCR, transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase.

PSA, antígeno prostático específico.

TNM, T - Tumor, N - Linfonodos, M - Metastases.

HNP, hiperplasia nodular da próstata.

Sub., submetido.

TABELA 3 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos, razões de verossimilhança, acurácia, prevalência das patologias, através da análise da positividade no sangue, no pré-operatório, da RT-PCR "nested" PSA, na hiperplasia nodular da próstata e no câncer prostático estadiado pela classificação TNM 92.

	RT-PCR "nested" PSA positivo no sangue, no pré-op.					
	HNP / Câncer	Câncer / HNP	pT1 pT2 / HNP	pT3 pT4 pN1 / HNP		
Verdadeiros Positivos	3	10	6	4		
Verdeiros Negativos	8	3	3	3		
Falso Positivos	10	3	3	3		
Falso Negativos	3	8	5	3		
Taxa Falso Pos. = Falso Pos. / Falso Pos. + Verd. Neg. ou (1-E)	56%	50%	50%	50%		
Taxa Falso Neg. = Falso Neg. / Falso Neg. + Verd. Pos. ou (1-S)	50%	44%	45%	43%		
S = Verd. Pos. / Verd. Pos. + Falso Neg.	50%	56%	55%	57%		
E = Verd. Neg. / Verd. Neg. + Falso Pos.	44%	50%	50%	50%		
VP + = Verd. Pos. / Verd. Pos. + Falso Pos.	23%	77%	67%	57%		
VP - = Verd. Neg. / Verd. Neg. + Falso Neg.	73%	27%	38%	50%		
LR + = S / Taxa Falso Pos.	17,0	19,0	18,0	19,0		
LR - = Taxa Falso Neg. / E	0,00	0,00	0,00	0,00		
Acurácia = Verd. Pos. + Verd. Neg. / Total	46%	54%	53%	54%		
Prevalência = Verd. Pos. + Falso Neg. / Total	25%	75%	65%	54%		

PSA, Antígeno prostático específico.

RT-PCR, Transcriptase reversa, reação em cadeia da polimerase.

TNM, T - Tumor, N - Linfonodos, M - Metástases.

HNP, hiperplasia nodular da próstata.

Pos., Positivos.

Verd., Verdadeiros.

Neg., Negativos.

S, Sensibilidade.

E, Especificidade.

VP +, Valor preditivo positivo.

VP -, Valor preditivo negativo.

LR +, Likelihood ratio, ou razão de verossimilhança ou OR odds ratio positiva.

LR -, Likelihood ratio, ou razão de verossimilhança ou OR odds ratio negativo.

Nas dosagens do PSA bioquímico total no sangue, no pós-operatório, considerando-se o valor 0,04 ng/mL como ponto de corte no diagnóstico de câncer localizado da próstata (cura laboratorial) e câncer com invasão local ou metastático, encontrou-se num seguimento de 1 a 17 meses, diagnóstico de câncer localizado (cura laboratorial - PSA total \leq 0,04 ng/mL) em 13/32 (41,9 %) e diagnóstico de câncer com invasão local ou metastático (PSA total $>$ 0,04 ng/mL) em 18/32 (58,1 %) dos pacientes. Comparando-se o estadiamento TNM 92 com os diagnósticos pós-operatório pelas dosagens do PSA bioquímico total, 7/18 (38,9 %) dos pacientes com câncer localizado pelo estadiamento TNM 92 apresentaram diagnóstico de câncer com invasão local ou metastático e 2/14 (15,4 %) dos pacientes com câncer com invasão local ou metastático pelo estadiamento TNM 92 apresentaram diagnóstico de câncer localizado (cura laboratorial), havendo um acréscimo de 14,4 % no diagnóstico pós-operatório de câncer com invasão local ou metastático (TABELA 4 - GRÁFICO 1 e 2).

No controle pós-operatório da prostatectomia radical, considerando-se o PSA bioquímico total \leq 0,04 ng/mL como diagnóstico de câncer localizado (cura laboratorial), a RT-PCR "nested" PSA no sangue, no pré-operatório foi positivo em 1/7 (14,3%) destes pacientes e considerando-se o PSA bioquímico total de controle $>$ 0,04 ng/mL como câncer com invasão local ou metastático, a RT-PCR "nested" PSA no sangue, no pré-operatório foi positiva em 8/10 (80,0 %) deste grupo de pacientes (TABELA 5 - GRÁFICO 3). A performance deste exame apresentou S de 80 %, E de 86 %, VP + de 89 %, VP - de 75% no diagnóstico de câncer da próstata com invasão local ou metastático (PSA total $>$ 0,04 ng/mL) em relação ao localizado (cura laboratorial - PSA total \leq 0,04 ng/mL). O resultado positivo para o PSA molecular no sangue indica um risco relativo 26,7 vezes maior para o desenvolvimento de câncer com invasão local ou metastático. (TABELA 6).

A aplicação neste estudo, da dosagem do PSA por RT-PCR "nested" positivo no sangue pré-operatório, como critério para exclusão dos pacientes da prostatectomia radical, a

probabilidade de não se operar um tumor localizado (cura laboratorial) seria de 1/17 (5,9 %), (paciente 8) e a probabilidade de se operar pacientes com câncer com invasão local ou metastático seria de 2/17 (11,8 %), (pacientes 5 e 15), com probabilidade de acerto de 14/17 (82, 4%), no sentido de operar os casos com diagnóstico pós-operatório de câncer localizado (cura laboratorial) e não se operar os casos de câncer com invasão local ou metastático (TABELA 5 - GRÁFICO 3).

TABELA 4 - PSA bioquímico total de controle pós-operatório, no sangue, no grupo de pacientes com câncer da próstata estadiado pela classificação TNM 92.

GRUPO **			PSA Total Bioq. Contr. ng/mL *			
Câncer da Próstata			< = 0,04		> 0,04	
Estadiamento TNM 92	Nº	%	Nº	%	Nº	%
pT1	8	25,0%	2	25,0%	6	75,0%
pT1cpN0pM0	8	25,0%	2	25,0%	6	75,0%
pT2	10	31,3%	9	90,0%	1	10,0%
pT2apN0pM0	1	3,1%	1	100,0%		
pT2bpN0pM0	1	3,1%	1	100,0%		
pT2cpN0pM0	8	25,0%	7	87,5%	1	12,5%
Sub Total	18	56,3%	11	61,1%	7	38,9%
pT3	12	37,5%	2	16,7%	9	75,0%
pT3apN0pM0	4	12,5%			3	75,0%
pT3bpN0pM0	4	12,5%	1	25,0%	3	75,0%
pT3cpN0pM0	4	12,5%	1	25,0%	3	75,0%
pT4	1	3,1%			1	100,0%
pT4apN0pM0	1	3,1%			1	100,0%
pN1	1	3,1%			1	100,0%
pT3cpN1pM0	1	3,1%			1	100,0%
Sub Total	14	43,8%	2	15,4%	11	84,6%
Total	32	100,0%	13	41,9%	18	58,1%

PSA, antígeno prostático específico.

TNM, T - Tumor, N - Linfonodos, M - Metastases.

* IMMULITE®, metodologia de dosagem do PSA bioquímico.

** Seguimento dos pacientes de 1 a 17 meses.

Bioq., bioquímico.

Contr., controle pós-operatório.

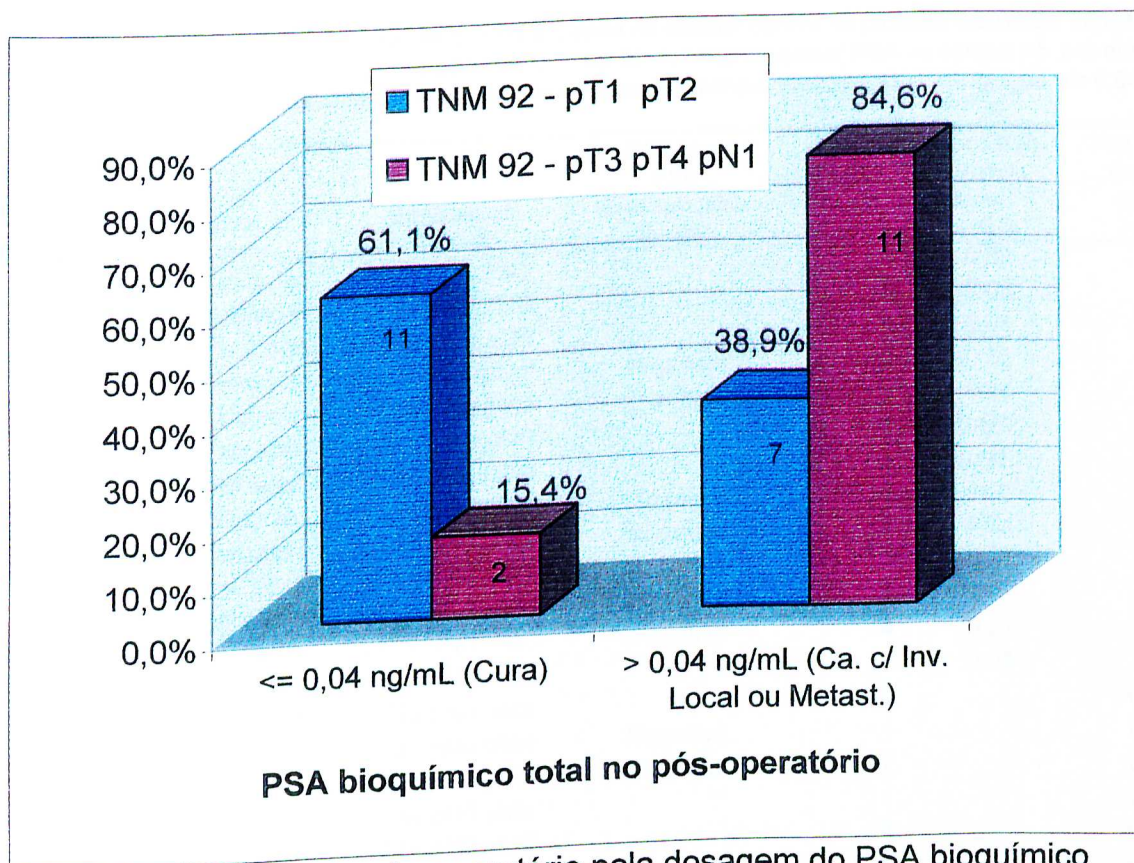


GRÁFICO 1 - Controle pós-operatório pela dosagem do PSA bioquímico total no sangue pela metodologia IMMULITE[®] dos pacientes estadiados pela classificação TNM 92.

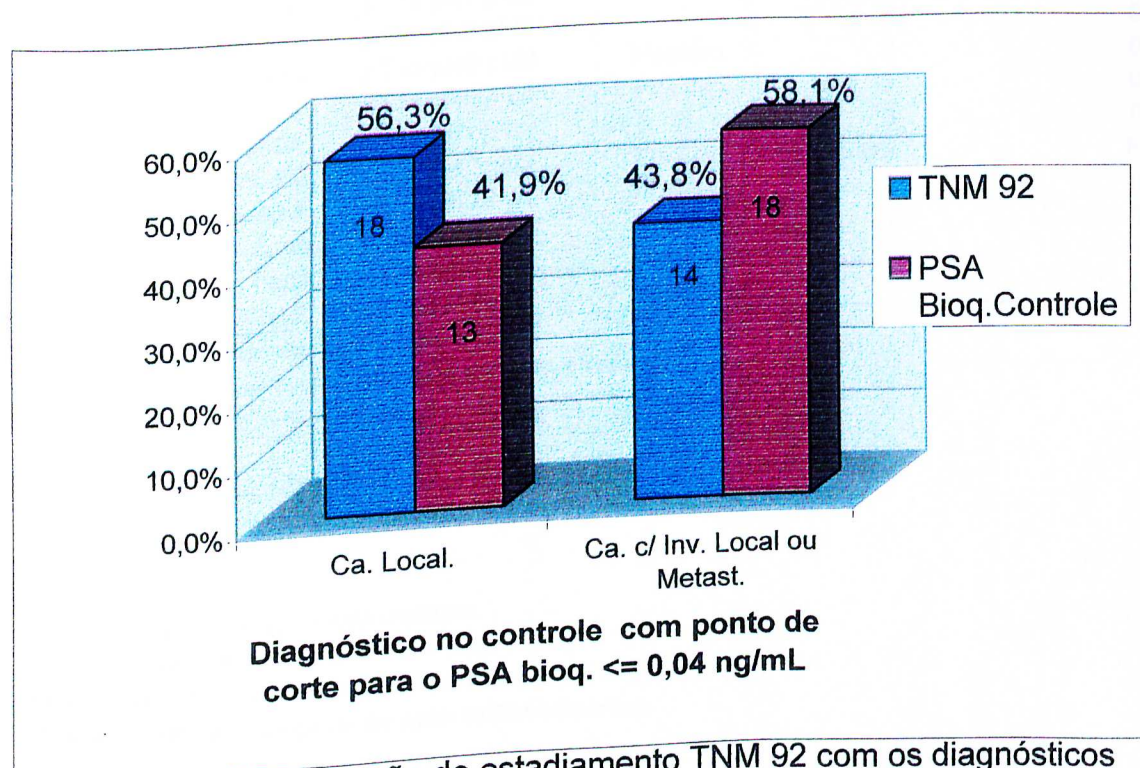


GRÁFICO 2 - Comparação do estadiamento TNM 92 com os diagnósticos nos controle pós-operatório, pela dosagem do PSA bioquímico total no sangue, pela metodologia IMMULITE[®].

TABELA 5 - Distribuição dos pacientes quanto à grupos de estudo: câncer da próstata localizado, câncer com invasão local, câncer metastático; estadiamento TNM 92; RT-PCR "nested" PSA no sangue no pré-operatório; tempo do controle pós-operatório e PSA bioquímico total no controle pós-operatório, no sangue, $\leq 0,04$ e $> 0,04$ ng/mL.

Pac.	Grupos de Estudo*	Estadiamento TNM 92	RT-PCR "nested" PSA Pré-Operatório Sangue	Tempo Pós-Op. Mês(es)	PSA T Bioq. Controle ng/mL** $\leq 0,04$	PSA T Bioq. Controle ng/mL** $> 0,04$
1	Ca. Localizado	pT2c pN0 pM0		14	0,02	
2	Ca. Localizado	pT2c pN0 pM0		15	0,03	
3	Ca. c/ Inv. Local	pT3b pN0 pM0		9	0,01	
8	Ca. Localizado	pT1c pN0 pM0	Negativo	10	0,02	
12	Ca. Localizado	pT2a pN0 pM0	Positivo	6	0,04	
14	Ca. Localizado	pT2b pN0 pM0		11	0,002	
17	Ca. Localizado	pT2c pN0 pM0		11	0,006	
20	Ca. Localizado	pT1c pN0 pM0	Negativo	1	0,01	
22	Ca. Localizado	pT2c pN0 pM0	Negativo	1	0,04	
24	Ca. c/ Inv. Local	pT3c pN0 pM0	Negativo	2	0,01	
36	Ca. Localizado	pT2c pN0 pMx	Negativo	1	0,02	
42	Ca. Localizado	pT2c pN0 pM0	Negativo	4	0,01	
49	Ca. Localizado	pT2c pN0 pM0		17	0,04	
4	Ca. c/ Inv. Local	pT3a pN0 pMx		3		0,27
5	Ca. c/ Inv. Local	pT3c pN0 pMx	Negativo	1		2,60
6	Ca. Localizado	pT1c pN0 pMx	Positivo	2		0,50
7	Ca. c/ Inv. Local	pT3b pN0 pMx		1		0,84
9	Ca. c/ Inv. Local	pT4a pN0 pM0		1		0,09
10	Ca. Localizado	pT1c pN0 pM0	Positivo	3		0,27
11	Ca. c/ Inv. Local	pT3c pN0 pM0		4		2,60
13	Ca. c/ Inv. Local	pT3b pN0 pM0		7		0,07
15	Ca. c/ Inv. Local	pT3c pN0 pM0	Negativo	1		0,36
16	Ca Metastático	pT3c pN1 pM0		1		1,20
18	Ca. Localizado	pT2c pN0 pM0		4		0,15
19	Ca. c/ Inv. Local	pT3b pN0 pM0	Positivo	2		0,06
21	Ca. Localizado	pT1c pN0 pM0	Positivo	3		0,42
32	Ca. Localizado	pT1c pNx pMx		3		0,08
34	Ca. c/ Inv. Local	pT3a pN0 pMx	Positivo	Falta		Falta
39	Ca. Localizado	pT1c pN0 pM0	Positivo	6		0,06
41	Ca. c/ Inv. Local	pT3a pN0 pM0	Positivo	1		0,08
47	Ca. c/ Inv. Local	pT3a pN0 pMx	Positivo	5		1,00
48	Ca. Localizado	pT1c pN0 pM0	Positivo	1		0,30

TNM, T - Tumor, N - Linfonodos, M - Metástases.

RT-PCR, Transcriptase reversa, reação em cadeia da polimerase.

PSA, Antígeno prostático específico.

Pac., Paciente.

*, Adenocarcinoma usual da próstata.

T, Total.

Bioq., Bioquímico.

Op., Operatório.

Ca Localizado, Câncer da próstata localizado.

Ca. c/ Inv. Local, Câncer da próstata com invasão local.

Ca Metastático, Câncer da próstata metastático.

** IMMULITE® - Metodologia de dosagem do PSA bioquímico.

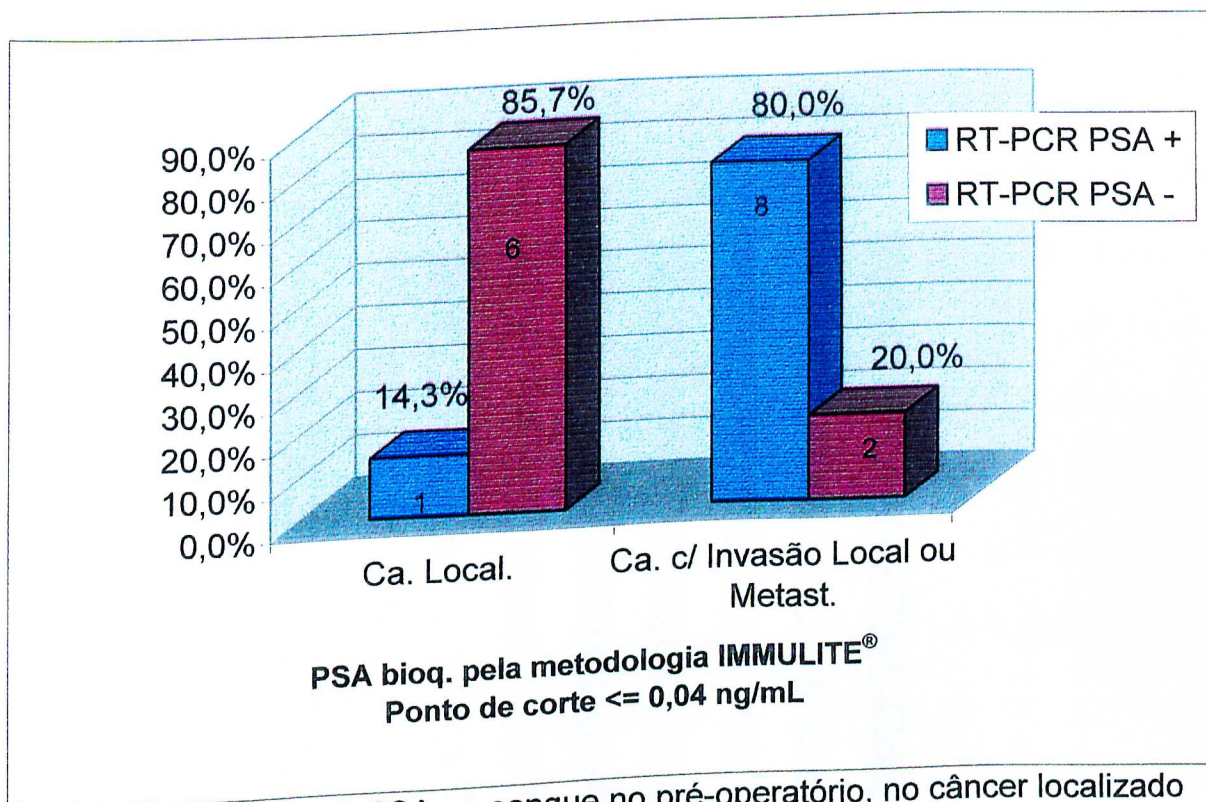


GRÁFICO 3 - RT-PCR PSA no sangue no pré-operatório, no câncer localizado (cura laboratorial) e no câncer com invasão local ou metastático diagnosticados nos controles pós-operatórios pelas dosagens no sangue do PSA bioquímico total pela metodologia IMMULITE®.

TABELA 6 - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos, razões de verossimilhança, acurácia, prevalência da patologia, através da análise da positividade da RT-PCR "nested" PSA pré-operatório, no sangue, no câncer da próstata localizado (cura laboratorial) e no câncer com invasão local ou metastático, diagnosticados pelo PSA bioquímico total de controle pós-operatório, no sangue, pela metodologia IMMULITE®, com ponto de corte < 0,04 ng/mL.

	RT-PCR "nested" PSA Pré-Op. Pos. Sangue	
	Ca. Local. (cura laboratorial) / Câncer com invasão local ou Metast. laboratorial)	Câncer com invasão local ou Metast. Ca. Local. (cura laboratorial)
Verd. Pos.	1	8
Verd. Neg.	2	6
Falso Pos.	8	1
Falso Neg.	6	2
Taxa Falso Pos. = Falso Pos. / Falso Pos. + Verd. Neg. ou (1-E)	80,0%	14,3%
Taxa Falso Neg. = Falso Neg. / Falso Neg. + Verd. Pos. ou (1-S)	85,7%	20,0%
S = Verd. Pos. / Verd. Pos. + Falso Neg.	14,3%	80,0%
E = Verd. Neg. / Verd. Neg. + Falso Pos.	20,0%	85,7%
VP + = Verd. Pos. / Verd. Pos. + Falso Pos.	11,1%	88,9%
VP - = Verd. Neg. / Verd. Neg. + Falso Neg.	25,0%	75,0%
LR + = S / Taxa Falso Pos.	4,8	26,7
LR - = Taxa Falso Neg. / E	0,0	0,0
Acurácia = Verd. Pos. + Verd. Neg. / Total	17,6%	82,4%
Prevalência = Verd. Pos. + Falso Neg. / Total	41,2%	58,8%

RT-PCR, transcriptase reversa, reação em cadeia da polimerase.

IMMULITE®, Kit de dosagem bioquímica do PSA total.

PSA, Antígeno prostático específico.

Verd., Verdadeiros.

Pos., Positivos.

Neg., Negativos.

S, Sensibilidade.

E, Especificidade.

VP +, Valor preditivo positivo.

VP -, Valor preditivo negativo.

LR +, Likelihood ratio, ou razão de verossimilhança ou OR odds ratio positiva.

LR -, Likelihood ratio, ou razão de verossimilhança ou OR odds ratio negativo.

6 DISCUSSÃO

Os dados dos pacientes, especialmente os resultados obtidos com a prostatectomia radical proposta por Young (1905) e modificada por Walsh em 1983, utilizada neste estudo para tratamento do câncer da próstata e os dados dos controles pós-operatórios, em especial os que se referem à continência urinária e disfunção sexual (ANEXO 9.1, 9.2), são concordantes com trabalhos já publicados, onde há referência de ocorrência de incontinência urinária em 3 % a 10 % e de disfunção sexual em 13 % a 50 % dos pacientes submetidos a cirurgia radical (MASS Jr.; BARRET, 1980; WALSH; LEPOR; EGGLESTON, 1983; LU-YAO et al., 1993; SROUGI; SIMON, 1990; KURTH et al., 1999).

A concordância entre os examinadores no estadiamento patológico TNM 92 pelo índice Kappa (ANEXO 9.3), nos permitiu utilizar os resultados deste estadiamento como “gold standard”, relacionando-o com os exames laboratoriais realizados neste estudo.

O diagnóstico histológico de adenocarcinoma usual da próstata em todos os pacientes, juntamente com o achado de neoplasia intra-epitelial mais freqüente nas biópsias do que nas peças cirúrgicas, diferença esta justificada pelo fato de que a quantidade de material examinado da biópsia ser pequena em relação à quantidade de material das peças cirúrgicas e o subestadiamento dos escores de Gleason das biópsias em relação aos escores das peças cirúrgicas (ANEXO 9.1), estão de acordo com os dados da literatura. Segundo Byar e Mostofi (1972), mais de 95 % das neoplasias da próstata são representadas pelos adenocarcinomas, o restante compreende casos de sarcomas, carcinoma epidermóide e carcinoma de células transicionais. De acordo com Algaba (1997), Billis (1997) e Epstein (1995), a neoplasia intra epitelial é mais freqüentemente encontrada nas peças cirúrgicas pela quantidade de material examinada ser maior em relação à quantidade de material da biópsia prostática. Os dados de Gleason (1992, 1974, 1977) e de Steinberg et al. (1997) mostram que

achados de Gleason favorável nas biópsias não nos dão segurança de que o tumor não possa ser mais agressivo na peça cirúrgica. Mesmo Gleason estudando seu próprio material notou subestadiamento em até 50 % das biópsias analisadas (GLEASON, 1992).

Os resultados do estadiamento TNM 92 no que se refere à ocorrência de câncer localizado e câncer com invasão local ou metastático (TABELA 1), evidenciam que os critérios de inclusão dos pacientes no grupo de estudo: PSA bioquímico total no sangue, no pré-operatório, $\leq 20,0$ ng/mL; Gleason total da biópsia < 8 ; Rx e/ou mapeamento ósseo negativos para metástases ósseas, realizados nos pacientes com PSA bioquímico total pré-operatório $\geq 10,0$ ng/mL; toque retal compatível com tumor localizado; idade menor ou igual a 80 anos; não foram adequados, permitindo questionamentos sobre quais pacientes poderiam realmente terem sido beneficiados em termos de cura com a cirurgia radical. Estes resultados são compatíveis com os dados da literatura. Em pacientes com neoplasia aparentemente localizada, no estadiamento clínico pré-operatório, existe acometimento das vesículas seminais em 16 % a 49 % dos casos segundo Jewett (1975) e metástases para linfonodos pélvicos em 5 % a 51 % dos casos (KLEIN, 1979). Em relação ao estadiamento patológico pela classificação TNM 92, 50 % dos pacientes são sub-estadiados no estadiamento clínico (CATALONA; DRESNER, 1985; VOGES et al., 1992). Atualmente não dispomos de ensaios laboratoriais ou exames de imagem, que nos permita identificar com segurança, no pré-operatório, quais pacientes com câncer da próstata terão melhores prognósticos de cura com a cirurgia radical (WHIRTH, 1993; MONDA; BARRY; OESTERLING, 1994).

Na avaliação do resultado positivo da RT-PCR "nested" PSA no sangue, no pré-operatório, na HNP (TABELA 2), deve-se considerar que além do número de casos ser pequeno, os casos positivos devem ser seguidos, uma vez que, na literatura, este exame tem sido referido como negativo na HNP e a maioria dos casos positivos apresentaram câncer da próstata no seguimento clínico. A publicação de Jaakkola et al. (1995) mostrou RT-PCR PSA

negativa em 4 pacientes com HNP. Segundo Loric et al. (1995) a RT-PCR foi negativa em 18/18 (100,0 %) dos pacientes com este diagnóstico. De acordo com Sokoloff et al. (1996) a RT-PCR foi positiva em 2/19 (11 %) dos pacientes com HNP, dos quais um apresentou na evolução câncer da próstata e nos dados de Israeli et al. (1994a) os dois casos de HNP com RT-PCR PSA positivas apresentaram câncer da próstata no seguimento clínico.

Neste estudo, a positividade RT-PCR "nested" PSA no sangue coletado no pré-operatório da cirurgia radical, nos pacientes estadiados pela classificação TNM 92 (TABELA 2), mostrou que micrometástases circulantes podem ocorrer, mesmo em tumores localizados, por este estadiamento. Estes dados estão de acordo com os dados da literatura, onde há referência de RT-PCR positiva em 3/27 (11%) e em 30/51 (59 %) dos pacientes com câncer localizado, respectivamente, segundo Loric et al. (1995) e Sokoloff et al. (1996). O significado biológico de micrometástases circulantes ainda é incerto, sendo apenas um dos vários fatores que estão envolvidos no processo da doença metastática, onde milhões de células neoplásicas na circulação sanguínea leva em pequena proporção, ao desenvolvimento de lesões metastáticas clinicamente diagnosticadas (LIOTTA; KLEINERMAN; SAIDEL, 1974). Embora alguns estudos sugiram que micrometástases possam significar mal prognóstico, muitos pacientes apresentando células neoplásicas circulantes não apresentaram evidência clínica de doença metastática após vários anos de seguimento (SEIDEN et al., 1994).

De acordo com os dados da literatura, a RT-PCR "nested" PSA, é uma reação muito sensível encontrando-se positiva tanto no câncer localizado quanto no câncer com invasão local ou metastático, estadiados pela classificação TNM 92 (OLSON et al., 1997). Os dados da literatura mostram que a RT-PCR PSA foi positiva em 17/33 (51 %) dos pacientes com câncer metastático pelo estadiamento TNM 92 segundo Loric et al. (1995) e em 42/51 (82 %) dos pacientes com invasão local ou metastático pelo mesmo estadiamento de acordo com Sokoloff et al. (1996).

A performance da RT-PCR "nested" PSA positiva no sangue no pré-operatório no diagnóstico do câncer da próstata estadiado, de acordo com a classificação TNM 92, em relação a HNP (TABELA 3), sugere não ser possível selecionar no pré-operatório, quais pacientes seriam beneficiados com a cirurgia radical, no sentido de se operar somente câncer estadiado como localizado e obter prognóstico de cura mais favorável com este tratamento.

Pelas dosagens do PSA bioquímico total no sangue, no pós-operatório e comparação da ocorrência dos diagnósticos pós-operatório de câncer localizado e de câncer com invasão local ou metastático, com os dados do estadiamento TNM 92, mostrando acréscimo no diagnóstico de câncer com invasão local ou metastático (TABELA 4 - GRÁFICO 1 e 2), observou-se que muitos casos de doença estadiada como localizada pelo estadiamento TNM 92, tratavam-se de doença com invasão local ou metastática, e muitos casos de câncer com invasão local, pelo estadiamento TNM 92, ficaram curados com a cirurgia radical. Estes dados estão de acordo com os dados da literatura, havendo citações de que os casos de cura no controle pós-operatório podem ocorrer em referência ao estadiamento TNM 92, não somente nos casos de câncer localizado, mas, especialmente, também, nos casos de invasão capsular sem outras margens positivas e sem invasão de vesículas seminais. O estudo realizado por Sokoloff et al. (1996) em 600 pacientes submetidos a prostatectomias radicais realizadas na "UCLA School of Medicine", que apresentaram no estadiamento patológico pela classificação TNM 92, invasão capsular sem outras margens positivas e sem invasão de vesículas seminais, mostrou uma taxa de sobrevivência de 10 anos de mais de 70 %. Estudos realizados na "John Hopkins University" mostrou a não progressão da doença, em 5 anos, em cerca de 70 % dos pacientes com câncer localizado da próstata submetidos à cirurgia radical, que apresentaram margens focais positivas no estadiamento TNM 92 (EPSTEIN et al., 1993).

Na avaliação da positividade da RT-PCR "nested" PSA no sangue, no pré-operatório, nos diagnósticos laboratoriais pós-operatório, de câncer localizado (cura laboratorial) e de câncer

com invasão local ou metastático, pelas dosagens bioquímicas do PSA total (TABELA 5 - GRÁFICO 3), utilizando-se este último como "gold standard" nestes diagnósticos, a performance deste exame (TABELAS 6), mostrou ser possível selecionar os pacientes com diagnóstico pós-operatório de câncer localizado ou câncer com invasão local ou metastático, conclusão semelhante com a publicação de Moul et al. (2002) na patente número WO02081656 registrada em 17 de Outubro de 2002.

7 CONCLUSÕES

A RT-PCR “nested” PSA no sangue, no pré-operatório, associou-se à dosagem bioquímica do PSA total no controle pós-operatório, sugerindo que este diagnóstico molecular talvez seja metodologia mais adequada para estadiamento pré-operatório dos pacientes com câncer da próstata, na indicação da prostatectomia radical, do que os critérios convencionais utilizados para inclusão dos pacientes no grupo de estudo, considerando-se o prognóstico de cura com este tratamento. Sugere-se que este exame possa ser utilizado para estadiamento molecular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGABA, F. Neoplasia intra epitelial prostática. *Urol. Contemp.*, São Paulo, v. 3, p. 174-179, 1997.
- BILLIS, A. **Uropatologia: próstata**. Guia prático para o diagnóstico anatomopatológico. Goiania: UFG, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Programa nacional de controle do câncer da próstata: documento de consenso**. Rio de Janeiro. Manuais técnicos, 30. 2002. 24 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer/prostata>>. Acesso em: 20 abr. 2003.
- BRAWER, M. K.; ARAMBURU, E. A. G.; CHEN, G. L.; PRESTON, S. D.; ELLIS, W. J. The inability of PSA index to enhance the predictive value of PSA in the diagnosis of prostatic carcinoma. *J. Urol.*, Baltimore 369-73, 1993a.
- BRAWER, M. K.; KIRBY. **Prostate specific antigen**. Abingdon: Nuffield Press, 1998. 75 p.
- BRASILHEIRO FILHO, G.; BARBOSA, A. J. A.; MIRANDA, D. Métodos de Estudo em Patologia. In: BRASILHEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. Editado por Geraldo Brasileiro Filho e colaboradores. 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 2, p. 13-18.
- BRUNINI, R.; TORLONI, H.; HENSON, D. E.; GLOTIEB, S. L. D.; SOUZA, J. M. P. **Câncer no Brasil**. Dados histopatológicos 1976-1980. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1982. 198 p.
- BUAMA, P. K.; JOHNSON, P.; SKILLEN, A. W. Comparative study of clinical usefulness of prostate specific antigen and prostatic acid phosphatase in prostatic surgery. *Br. J. Urol.*, Oxford, p. 81, 1989.
- BUSSEMAKERS, M. J.; VON BOKHOVEN, A.; VERHAEGH, G. W.; SMIT, F. P.; KARTHAUS, H. F.; SCHALKEN, J. A.; DEBRUYNE, F. M.; RU, N.; ISAACS, W. B. DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.*, Baltimore, v. 3 p. 5975-5979, 1999.
- BYAR, D. P.; MOSTOFI, F. K.: Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies. Examined by step-section technique. *Cancer*, Philadelphia, p. 30-355, 1972.
- CANTO, E. I.; SHARIAT, S. F.; FLAWIN, K. M. Biochemical staging of prostate cancer. *Urol. Cl. North Am.*, Philadelphia, v. 30, n. 2, p. 263-277, may 2003.

- CATALONA, W. J.; DRESNER, S. M. Nerve-sparing radical prostatectomy: extraprostatic tumor extension and preservation of erectile function. *J. Urol.*, Baltimore, v. 134, p. 1149, 1985.
- CATALONA, W. J.; PARTIN, A. W.; SLAWIN, K. M. A multicenter clinical trial evaluation of free PSA in the differentiation of prostate cancer from benign disease. *J. Urol.*, Baltimore, v. 157, p. 111, 1997a.
- CATALONA, W. J.; RICHIE, J. P.; AHMANN, F. R. Comparison of DRE and serum PSA in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J. Urol.*, Baltimore, v. 151, p. 1283-90, 1994b.
- CHAMBERLAIN, J.; MELIA, J.; MOSS, S.; BROWM, J. **The diagnosis, manegement, treatment and cost of prostate cancer in England and Wales.** London: Sutton Cancer Screening Evaluation Unit, Institute of Cancer Research, Baltimore, 1996. 132 p.
- CUSSENOT, O.; VALERI, A. Heterogeneity in genetic susceptibility to prostate cancer. *Eur. J. Int. Med.*, Basel, v. 12, p 11-16, 2001.
- EDITORIAL. Prostate-specific antigen. *Lancet*, London, v. 2, p. 318, 1988.
- ELLIS, W. J.; BRAWER, M. K. Repeat prostate needle biopsy: Who needs it? *J. Urol.*, Baltimore, v. 153, n. 5, p. 1496-8, 1995.
- EPSTEIN, J. I.; CARMICHAEL, M. J.; PIZOV, G.; WALSH, P. C. Influence of capsular penetration and progression following radical prostatectomy: a study of 196 cases with long-term followup. *J. Urol.*, Baltimore, v. 150, p.135, 1993.
- EPSTEIN, J. I.; **Prostate biopsy interpretation.** 2nd ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1995. 54 p.
- FERRO, M. A.; BARNES, I.; ROBERTS, J. B. M.; SMITH, P. J. B. Tumor markers in prostatic carcinoma. A comparison of prostate-specific antigen with acid phosphatase. *Br. J. Urol.*, Oxford, v. 60, p. 69, 1987.
- FIDLER, I. J.; HART, I. R. Biological diversity in metastatic neoplasms-origins and implications. *Science*, Washington, v. 217, p. 998-1001, 1982.
- FRANKS; L. M. Etiology, epidemiology of prostate cancer. *Cancer*, Philadelphia, v. 32, p. 1092, 1973.
- GHINAN, P. P.; BUSH, I.; RAY, V.; VIETH, R.; RAO, R.; BHATTI, R. The accuracy of rectal examination in the diagnosis of prostate carcinoma. *New Engl. J. Med.*, Waltham, v. 303, p. 499, 1980.
- GHOSSEIN, R. A.; SCHER, H. I.; GERALD, W. L.; KELLY, W. K.; CURLEY, T.; AMSTERDAM, A.; ZHANG, Z. F.; ROSAI, J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic carcinoma: clinical implications. *J. Clin. Oncol.*, New York, v. 13, n. 5, p. 1195-1200, 1995.

- GLEASON, D. F.; MELLINGER, G. T. Veterans Administration Cooperative Urological Reserch Goup: Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. **J. Urol.**, Baltimore, v. 111, p. 58-64, 1974.
- GLEASON, D. F. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: TANNENBAUM, M (Ed). **Urologic pathology: the prostate**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977. 121 p.
- GLEASON, D. F. Histologic grading of prostate cancer: a prespective. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v3, p.273-279, 1992.
- HERMANEK, P.; SOBIN, L. H. **TNM Classification of malignant tumours**. 4. th ed. New York: Springer-Verlag, 1987. 124 p.
- International Union Against Cancer (UICC). In: - **Clinical TNM classification and staging american joint committee on cancer (AJCC)/ 1992**.
- ISRAELI, R. S.; MILLER JR., W. H.; SU, S. L.; POWELL, C. T.; FAIR, W. R.; SAMADI, D. S.; HURYK, R. F.; De BLASIO, A.; EDWARDS, E. T.; WISE, G. J. Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostate tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 54, p. 6306, 1994a.
- JAAKKOLA, S.; VORNANEN, T.; LEINONEN, J.; RANNIKO, S.; STENMAN, U. Detection of prostatic cells in peripheral blood: correlation with serum concentrations of prostate specific antigen. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 41, n. 2, p. 182-186, 1995.
- JEWETT, H. J. The present status of radical prostatectomy for stages A and B prostatic cancer. **Urol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 2, p. 105, 1975.
- KLEIN, L. A. Prostatic carcinoma. **New Engl. J. Med.**, Waltham, v. 300, p. 824, 1979.
- KURTH, K. H.; MICKISCH, G. H.; SCHRÖDER, F. H. **Renal, bladder and prostate cancer**. New York: Parthenon Publishing Group., 1999. 290 p.
- LANDIS, J. R.; KOCK, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics.**, Philadelphia, v. 33, p.159-174. 1977.
- LANDIS, S. H.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P. A. Cancer statistics. **Cancer**, Philadelphia, v. 48, p 6-29, 1998.
- LANGE, P. H.; ERCOLE, C. J.; LIGHTNER, D. J.; FRALEY, E. E.; VESSELLA, R. I. The value of serum prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy. **J. Urol.**, Baltimore, v. 141, p. 873, 1989.
- LANGE, P. H.; ERCOLE, C. J.; VESSELLA, R. I. Tumor markers in the follow-up of initial therapy of prostate cancer. Em LANGE, P.H.: **Tumor markers in prostate cancer**. Amsterdam: Excerpta Medica, 1986. 125p.

- LIOTTA, L. A.; KLEINERMAN, J.; SAIDEL, G. M. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 34, p. 997-1003, 1974.
- LORIC, S.; DUMAS, F.; ESCHWEGE, P.; BLANCHET, P.; BENOIT, G.; JARDIN, A.; LACOUR, B. 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 membrane antigen. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 41, p. 1698-1704, 1995.
- LU-YAO, G.; McLERRAN, D.; WASSON, J.; WENBERG, J. An assessment of radical prostatectomy. Time trends, geographic variation, and outcomes. The Prostate Patient Outcomes Research Team. **JAMA**, Chicago, v. 269, p. 2633, 1993.
- MASS JR., R. B.; BARRET, D. M. Radical retropubic prostatectomy after trans-urethral prostatic resection. **J. Urol.**, Baltimore, v. 124, p. 495, 1980.
- MATTANO JR., L. A.; MOSS, T. J.; EMERSON, S. G. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 52, p. 4701-5, 1992.
- MEBUST, W. K.: Transurethral prostatectomy. **AUA Update Séries**, v. 13, p. 142-147, 1994.
- MILLIN, T. **Retropubic urinary surgery**, London: E & S Livingstone, 1947. 187 p.
- MONDA, J. M.; BARRY, M. J.; OESTERLING, J. E. Prostate-specific antigen cannot distinguish stage T1a (A1) prostate cancer from benign prostatic hiperplasia. **J. Urol.**, Baltimore, v. 151, p. 1291, 1994.
- MORENO, J. G.; GRODE, C. M.; FISHER, R.; MONNE, M.; VIHKO, P.; MULHOLLAND, G.; GOMELLA, L. G. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 53, p. 6110-2, 1992.
- MOUL, J. W.; GAO, C. L.; SRIVASTAVA, S. **Patent number WO02081656. 2002.**
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Metods Enzymol.**, New York, v. 55, p. 335-350, 1984.
- NIXON, R. G.; WENER, M. H.; BRAWER, M. K.; PARSON, R. E.; BLASE, A. B.; STROBEL, S. A. Biological variation of prostate specific antigen levels in serum: an evaluation of day-to-day physiological flutuations in a well-defined cohort of 24 patients. **J. Urol.**, Baltimore, v. 157, p. 2183-90, 1997.
- OESTERLING, J. E.; CHAN, D. W.; EPSTEIN, J. I.; KIMBALL JR., A. W.; BRUZEL, D. J.; ROCK, R. C.; BRENDLER, C. B.; WALSH, P. C. Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. **J. Urol.**, Baltimore, v. 139, p. 766, 1988.
- OLSON, C. A.; DE VRIES, G. M.; BENSON, M. C.; RAFFO, A.; BUTTYAN, R.; CAMA, C. The use of RT-PCR for prostate-specific antigen assay to predict potential surgical failures

- before radical prostatectomy: molecular staging of prostate cancer. *Br. J. Urol.*, Oxford, v. 77, p. 411-7, 1997.
- ORTENZE, A. V. Avaliação e medicação pré-anestésicos. In - IAMASHYTA, A. M.; TAKAOKA, F.; AULER JR., J. O. C. *Anestesiologia*, 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p 467-497.
- PARTIN, W.A.; MANGOLD, D. L.; WALSH, P. C.; EPSTEIN, J. I.; PEARSON, J. D. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (PARTIN TABLES) for the new millennium. *Urology*, Secaucus, v. 59, p. 843-848, 2001.
- ROSS, R. K.; PAGANINI-HILL, A.; HENDERSON, B. E. Epidemiology of prostate cancer. Em SKINNER, D.G.; LIESKOWISKY, G.: **Diagnosis and management of urologic cancer**. Philadelphia: Saunders Co., 1988. 40 p.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALCOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, Washington, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- SCHELLHAMMER, P. F.; SCHLOSSBERG, S. M.; WRIGHT, G. L. Prostatic specific antigen (PSA) levels in patients free of disease after definitive irradiation therapy for localized prostate cancer. *J. Urol.*, Baltimore, v. 141, p. 199-A, 1989.
- SCHRÖDER, F. H.; HERMANEK, P.; FAIR, W.R.; GOSPODAROWICZ, M. K.; PAVONE-MACALUSO, M. The TNM classification of prostate cancer. *Prostate*, New York, v. 4, p. 129-138, 1992.
- SCOTT JR., R.; MUTCHNIK, D. L.; LASKOWSKI, T. Z.; SCHMALHORST, W. R. Carcinoma of the prostate en elderly men: incidência, growth characteristics and clinical significance. *J. Urol.*, Baltimore, v. 101, p. 602, 1969.
- SELLY, S.; DONOVAN, J.; FAULKNER, A.; COAST, J.; GILLAT, D. **Diagnosis, manegement and screening of earle localized prostate cancer: a systematic reveiw**. Bristol: Health Care Evaluation Unit, University of Bristol, 1996.
- SEIDEN, M. V.; KANTOFF, P. W.; KRITHIVAS, K.; PROPERT, K.; BRYANT, M.; HALTOM, E.; GAYMES, L.; KAPLAN, I.; BUBLEY, G.; DE WOLF, W. Detection of circulating tumor cells in men with localized prostatic cancer. *J. Clin. Oncol.*, New York, v. 12, p. 2634-2639, 1994.
- SILVERBERG, E.; LUBERA, J. A. Cancer statistics, 1989. Ca-A. *Cancer*, Philadelphia, v. 39, p. 3, 1989.
- SMITH, B.; SELBY, P.; SOUTHGATE, J.; PITTMAN, K.; BRADLEY, C.; BLAIR, G. E. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet*, London, v. 338, p. 1227-9, 1991.
- SOKOLOFF, M. H.; TSO, C.; KABOO, R.; NELSON, S.; KO, J.; DOREY, F.; FIGLIN, R. A.; PANG, S.; DEKERNION, J.; BELLDEGRUN, A. Quantitative polymerase chain reaction

- daes not improve preoperative prostate cancer staging: a clinicopathological molecular analysis of 121 patients. **J. Urol.**, Baltimore, v.156, p. 1560-1566, 1996.
- SPAPEN, S. J. J. C.; DAMHUIS, R. A. M.; KIRKELS, W. J. Trends in the curative treatment of localized prostate cancer after the introduction of prostate-specific antigen: data from Rotterdam Cancer Registry. **BJU Int.**, Oxford, v. 85, p. 474-480, 2000.
- SROUGI, M.; SIMON, S. **Câncer urológico**. São Paulo: Platina, 1990. 460p.
- STAMEY, T. A.; YANG, N.; HAY, A. R. Prostate specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v. 317, p. 909-16, 1987.
- STAMEY, T. A.; KABALIN, J. N. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate: I. Untreated patients. **J. Urol.**, Baltimore, v. 141, p. 1070-5, 1989.
- STAMEY, T. A.; McNEIL, J. E. Adenocarcinoma of the prostate. In: **Campbell's urology**. 6. ed. Edited by WALSH, P. C.; RETIK, A.B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN JR., E.D. Philadelphia: Saunders Co., 1992. v. 2, p. 1159-1221.
- STEINBERG, D. M.; SAUVAGEOT, J; PIANTADOSI,S.; EPSTEIN, J.I. Correlation between needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. **Am. J. Surg. Pathol.**, Philadelphia, v. 21, p. 566-576, 1997.
- TCHETGEN, M. B.; SONG, J. T.; STRAWDERMAN, M.; JACOBSEN, S. J.; OESTERLING, J. E. Ejaculation increases the serum prostate specific antigen concentration. **Urology**, Secaucus, v. 47, p. 511-16, 1996.
- VIHKO, P.; KONTTURI, M.; LUKKARINEN, O.; ERVASTI, J.; VIHKO, R. Screening for carcinoma of the prostate. Rectal examination, and enzymatic and radio-immunologic measurements of serum acid phosphatase compared. **Cancer**, Philadelphia, v. 56, p. 173, 1885.
- VOGES, G. E.; McNEIL, J. E.; REDWINE, E. A.; FREIHA, F. S.; STAMEY, T. A. Morphologic analysis of surgical margins with positive findings in prostatectomy for adenocarcinoma of the prostate. **Cancer**, Philadelphia, v. 69, p. 520, 1992.
- WALSH, P. C.; LEPOR, H.; EGGLESTON, J. C. Radical prostatectomy with preservation of sexual function: anatomical and pathological considerations. **Prostate**, New York, v. 4, p. 473, 1983.
- WALSH, P. C. **Campbell's urology**. 8. ed. Edited by WALSH, P. C.; RETIK, A.B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN JR., E.D. Philadelphia: Saunders Co., 2002. Cap. 41. p. 1424.
- WHIRTH, M. Value of prostate specific antigen as a tumor marker. **Eur. Urol.**, Basel, v. 24, p. 6, 1993. Supplement.
- WHITMORE, W. F. Hormone therapy in Prostate Cancer. **Am. J. Med.**, New York, v. 21, p. 697, 1965.

- WILLIAMS, R. D. Postate-specific antigen. **J. Urol.**, Baltimore, v. 140, p. 1030, 1988.
- WILLIFORD, W. O.; LEPOR, H.; DIXON, C. M. Serum PSA levels after 52 weeks of therapy with finasteride, terazosin, combination, and placebo: results of the VA Cooperative study 359. **J. Urol.**, Baltimore, 155, p. 235A, 1996. Supplement.
- YOUNG, H. H. The early diagnosis and radical cure of carcinoma of the prostate. Being a study of 40 cases and presentation of a radical operation wich was carried aut in 4 cases. **Johns Hopkins Hosp.**, Baltimore, v. 16, p. 315, 1905.
- ZARIDZE, D. G.; BOYLE, P. Cancer of prostate: epidemiologia and etiology. **Br. J. Urol.**, Oxford, v. 59, p. 493, 1987.

9 ANEXOS

9.1 Dados Individuais

9.2 Dados Individuais

9.3 Índice Kappa

9.4 Sistema de Gleason

9.5 Estadiamento de Whitmore-Jewett e TNM 1992

9.6 Protocolo de extração do RNAm total por Trizol[®]

9.7 Termo de consentimento livre e esclarecido

9.8 Aprovação pelo CEP da UFU

ANEXO 9.1 - Distribuição dos pacientes quanto à grupos de estudo, câncer da próstata localizado, câncer com invasão local, câncer metastático e hiperplasia nodular da próstata, idade, raça, estádio clínico pelo toque retal, PSA bioq. total pré e de controle pós-tratamento, Gleason e NIP nas biópsias e nas peças cirúrgicas, estadiamento patológico TNM 92, RT-PCR "nested" PSA no sangue pré-tratamento, tempo pós-tratamento, PSA Bioq., continência e potência sexual no controle.

Pac.	Grupos	Estudo	de Idade	Raça	Estad. Clínico	W-J	Estad. Clínico T-92	PSA T Pré Trat. ng/mL*	Gleason P-S Biópsia.	Gleason P-S Biópsia.	NIP Biópsia. Grau	Gleason P-S Peça Cir.	NIP Peça Cir. Grau	Estad. Patológico TNM 92	PSA Pré Trat. Sangue	Tempo Pós Trat. Mês(es)	PSA T Bioq. Controle ng/mL*	Continência no Controle	Potência Sexual no Controle
1	Ca Localizado	71	L	B2	T2c	9,60	3+3	6	4+3	7	pT2c pN0 pM0	Negativo	14	0,02	Continente	Potente			
2	Ca Localizado	66	L	B2	T2c	6,14	3+3	6	4+3	7	pT2c pN0 pM0	Positivo	15	0,03	Continente	Potente			
3	Ca c/ Inv. Local	76	F	B2	T2c	20,00	3+2	5	4+3	7	pT3b pN0 pM0	Negativo	9	0,01	Continente	Potente			
4	Ca c/ Inv. Local	63	F	B1	T2b	7,60	3+3	6	4+3	7	pT3a pN0 pMx	Negativo	3	0,27	Continente	Impotente			
5	Ca c/ Inv. Local	69	L	B2	T2c	18,00	3+3	6	5+4	9	pT3c pN0 pMx	Positivo	1	2,60	Parc. Cont.	Potente			
6	Ca Localizado	66	L	B2	T2c	11,10	2+2	4	3+3	6	pT1c pNo pMx	Positivo	2	0,50	Continente	P c/ Med.			
7	Ca c/ Inv. Local	66	F	B2	T2c	20,00	3+3	6	4+3	7	pT3b pN0 pMx	Negativo	1	0,84	Continente	Potente			
8	Ca Localizado	66	L	A	T1c	8,80	3+3	6	3+3	6	pT1c pN0 pM0	Negativo	10	0,02	Continente	Potente			
9	Ca c/ Inv. Local	57	F	B1	T2b	7,10	3+3	6	4+3	7	pT4a pN0 pM0	Positivo	1	0,09	Parc. Cont.	Potente			
10	Ca Localizado	71	L	B2	T2c	6,50	3+3	6	3+2	5	pT1c pN0 pM0	Positivo	3	0,27	Continente	Potente			
11	Ca c/ Inv. Local	80	L	B2	T2c	5,70	4+3	7	4+3	7	pT3c pN0 pM0	Positivo	4	2,60	Continente	Impotente			
12	Ca Localizado	72	L	B2	T2c	5,90	4+3	7	4+3	7	pT2a pN0 pM0	Positivo	6	0,04	Continente	P c/ Med.			
13	Ca c/ Inv. Local	67	M	B2	T2c	13,00	3+3	6	4+3	7	pT3b pN0 pM0	Negativo	7	0,07	Continente	Impotente			
14	Ca Localizado	68	L	B1	T2b	6,00	3+3	6	3+3	6	pT2b pN0 pM0	Negativo	11	0,002	Continente	Potente			
15	Ca c/ Inv. Local	62	F	B2	T2c	7,50	4+3	7	4+3	7	pT3c pN0 pM0	Negativo	1	0,36	Continente	P c/ Med.			
16	Ca Metastático	61	L	B2	T2c	8,20	4+3	7	4+3	7	pT3c pN1 pM0	Negativo	1	1,20	Continente	Potente			
17	Ca Localizado	70	F	B2	T2c	5,50	3+3	6	3+2	5	pT2c pN0 pM0	Positivo	11	0,006	Continente	Impotente			
18	Ca Localizado	66	L	B2	T2c	20,00	3+3	6	3+3	6	pT2c pN0 pM0	Positivo	4	0,15	Continente	Potente			
19	Ca c/ Inv. Local	75	L	B2	T2c	9,18	3+3	6	5+4	9	pT3b pN0 pM0	Negativo	2	0,06	Continente	Impotente			
20	Ca Localizado	74	L	A	T1c	5,90	3+3	6	3+3	6	pT1c pN0 pM0	Negativo	1	0,01	Continente	Impotente			
21	Ca Localizado	66	F	A	T1c	8,71	3+4	7	3+4	7	pT1c pN0 pM0	Positivo	3	0,42	Continente	Impotente			
22	Ca Localizado	66	F	B1	T2b	5,30	3+4	7	3+4	7	pT2c pN0 pM0	Negativo	1	0,04	Continente	Impotente			
23	HNP	80	L			2,50													
24	Ca c/ Inv. Local	72	F	B2	T2c	7,18	3+3	6	3+3	6	pT3c pN0 pM0	Negativo	2	0,01	Continente	Impotente			
25	HNP	49	L			12,00													
26	HNP	73	L			1,10													
27	HNP	80	L			3,82													
28	HNP	66	L			2,20													
29	HNP	79	F			3,00													
31	HNP	71	F			5,40													
32	Ca Localizado	59	F	B1	T2b	5,40	2+2	4	2+3	5	pT1c pNx pMx	Positivo	3	0,08	Continente	Potente			
33	HNP	68	F			2,10													
34	Ca c/ Inv. Local	46	L	B1	T2b	8,50	3+3	6	3+3	6	pT3a pN0 pMx	Positivo	Falta	Falta	Falta				
35	HNP	80	L			3,30													
36	Ca Localizado	56	F	B1	T2b	5,00	3+2	2	3+4	7	pT2c pN0 pMx	Negativo	1	0,02	Continente	S / Ref.			

ANEXO 9.1 - Distribuição dos pacientes quanto à grupos de estudo, câncer da próstata localizado, câncer com invasão local, câncer metastático e hiperplasia nodular da próstata, idade, raça, estadiamento clínico pelo toque retal, PSA bioq. total pré e de controle pós-tratamento, Gleason e NIP nas biópsias e nas peças cirúrgicas, estadiamento patológico TNM 92, RT-PCR "nested" PSA no sangue pré-tratamento, tempo pós-tratamento, PSA Bioq., continência e potência sexual no controle.

Pac.	Grupos de Idade	Anos	Raça	Estad. Clínico W-J	Estad. Clínico T - 92	PSA T Pré Trat. ng/mL*	Gleason P - S Biópsia.	Gleason P - S Biópsia.	NIP Biópsia. Grau	Gleason P - S Peça Cir.	NIP Peça Cir. Grau	Estad. Patológico TNM 92	PSA Pré Trat. Sangue	Tempo Pós Trat. Mês(es)	PSA T Bioq. Controle ng/mL*	Continência no Controle	Potência Sexual no Controle
37	HNP	76	M			3,10											
38	HNP	80	L			18,50											
39	Ca Localizado	68	L	A	T1c	14,30	2 + 3	5		2 + 3	5	pT1c pN0 pM0		6	0,06	Continente	P c/ Med.
40	HNP	74	L			10,00											
41	Ca c/ Inv. Local	63	L	B2	T1c	5,50	1 + 1	2	II	3 + 3	6	pT3a pN0 pM0	Positivo	1	0,08	Continente	P c/ Med.
42	Ca Localizado	67	L	B1	T2b	8,04	3 + 4	7		4 + 3	7	pT2c pN0 Pm0	Negativo	4	0,01	Continente	Potente
45	HNP	58	F			3,50											
46	HNP	61	L			10,70											
47	Ca c/ Inv. Local	61	F	B2	T2c	16,50	3 + 3	6		3 + 4	7	pT3a pN0 pMx	Positivo	5	1,00	Continente	Potente
48	Ca Localizado	47	L	A	T1c	1,20	2 + 2	4	I	2 + 2	4	pT1c pN0 pM0	Positivo	1	0,30	Continente	Potente
49	Ca Localizado	60	L	B1	T2b	8,50	3 + 3	6		3 + 3	6	pT2cpN0pM0		17	0,04	Continente	P c/ Med.

PSA, antígeno prostático específico.

Bioq., bioquímico.

NIP, neoplasia intra epitelial.

TNM, T - tumor N - linfonodos M - metástases.

RT-PCR, transcriptase reversa, reação em cadeia da polimerase.

Pac., paciente.

Estad., estadiamento.

T, total.

Trat, tratamento, prostatectomia radical no câncer da próstata e ressecção trans-uretral da próstata e prostatectomias abertas para tratamento da HNP.

* IMMULITE® - metodologia de dosagem do PSA bioquímico.

P - S, predominante, secundário.

Cir., cirúrgica.

Grupo de Estudo, HNP - hiperplasia nodular da próstata, Ca. - Câncer, Ca c/ Inv. Local - câncer da próstata com invasão local (Adenocarcinoma acinar usual).

Raça, L - leucodermo, F - faiodermo, M - melanodermo.

Estad. Clínico W-J, Whitmore, Jewett: A - Tumor não palpável no toque retal, B1 - Nódulo < = 1,5 cm em um lobo prostático, B2 - Nódulo > 1,5 cm e/ou ocupando os dois lobos da próstata.

Estad. Clínico T - 92, T - T da classif. TNM 92: T1c - Tumor não palpável - PSA bioq. elevado, T2a - Palpável < 1/2 um lobo, T2b - Palpável > 1/2 um lobo mas não nos dois lobos, T2c - Palpável em ambos os lobos.

Continência, incont. Parc., incontinência parcial.

Potência sexual, P c/ Med. - potente com medicamento, S / Ref. - sem referência.

ANEXO 9.2 - Dados dos procedimentos cirúrgico e anestésicos realizados no grupo de pacientes com câncer da próstata com estadiamento patológico pela classificação TNM 92.

Paciente	Data Cirurgia	Cirurgia	Risco Cirúrgico ASA	Anestesia	Transfusão Sangue ml	Gânglios Pér-Op.	Ligadura Plexo Venoso	Cirurgia Hs	Peso Peça Cir.g.	Intercorrências	Estadiamento TNM 92
1	26/3/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	1	Geral IV Inal.	600	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	5,00	80	Ndn	pT2c pN0 pM0
2	10/9/2000	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Geral IV Inal.	600	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	4,00	40	Ndn	pT2c pN0 pM0
3	21/6/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	1	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,50	75	Ndn	pT3b pN0 pM0
4	18/1/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	4,00	20		pT3a pN0 pMx
5	24/5/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,50	40		pT3c pN0 pMx
6	7/12/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	2,50	40	Ndn	pT1c pNo pMx
7	20/3/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	4,00	50	Ndn	pT3b pN0 pMx
8	9/4/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	300	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	4,15	65	Ndn	pT1c pN0 pM0
9	14/5/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,00	40	Ndn	pT4a pN0 pM0
10	9/8/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil. + Cistolitotomia	2	Peridural L. C. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,50	50	Ndn	pT1a pN0 pM0
11	2/10/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	1500	Sem Ref.	Lig. Dupla Dexon 0	3,05	80	Ndn	pT3c pN0 pM0
12	5/3/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	2,45	50	Ndn	pT2a pN0 pM0
13	8/1/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	1	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,15	50	Ndn	pT3b pN0 pM0
14	5/4/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	1	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	2,00	40	*	pT2b pN0 pM0
15	10/12/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	1	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,00	38	Ndn	pT3c pN0 pM0
16	5/3/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	4,00	50	Ndn	pT3c pN1 pM0
17	23/1/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	2,30	28	Ndn	pT2c pN0 pM0
18	22/1/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	4,00	50	Ndn	pT2c pN0 pM0
19	21/5/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	500	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,00	40	Ndn	pT3b pN0 pM0
20	21/5/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Geral IV e inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	2,30	50	Ndn	pT1c pN0 pMx
21	18/3/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	3	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	300	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	4,00	60	Ndn	pT2c pN0 pM0
22	29/4/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Geral IV Inal.	300	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,00	30	Ndn	pT3c pN0 pM0
24	21/5/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,00	70	Ndn	pT1c pN0 pMx
32	22/4/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,00	50	Ndn	pT3a pN0 pMx
34	5/8/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Peridural L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	2,15	40	Ndn	pT2c pN0 pMx
36	27/5/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,30	75	Ndn	pT1c pN0 pM0
39	10/2/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Raqui L. S.	500	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	2,20	50	Ndn	pT3a pN0 pM0
41	7/5/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	1	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,00	65	Ndn	pT2c pN0 pM0
42	20/8/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	1	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,35	60	Ndn	pT3a pN0 pMx
47	20/4/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Raqui L. S.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	2,00	20	Ndn	pT1c pN0 pMx
48	13/8/2002	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	1	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	2,00	20	Ndn	pT1c pN0 pMx
49	15/1/2001	Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil.	2	Peridural L. S. + Geral IV Inal.	0	Não Real.	Lig. Dupla Dexon 0	3,50	50	Ndn	pT2c pN0 pM0

*ASA, American Anesthesiology Association**.

AP, anatomopatológico.

Prostatovesi. Rad. + Linf. Obt. Bil., prostatectomia radical + linfadenectomia obturatória bilateral.

IV, intra venosa.

Inal., inalatória.

L, lombar.

S, simples.

Real., realizado.

Lig., ligadura.

Ndn, nada digno de nota.

Cir. Cirúrgica.

*, Broncoespasmo severo pér-op. sem queda na saturação de O₂ - Reverteu com Fiebocontid 500 mg IV.

ANEXO 9.3 - Avaliação dos resultados dos estadiamentos patológicos TNM 92 das prostatovesiculectomias radicais realizados pelos patologistas.

		Observador 1		Total
		Ca. Metast.	Ca. Local.	
Observadores	Ca. Metast.	a 13	b 1	14
	Ca. Local.	c 1	d 17	18
Total		14	18	32

Ca., câncer.

Metast., metastático.

Local., localizado.

Ao=	30	N=	32
(a)=	6	PCT=	94%
(Ac)=	16	(d)=	10

Kappa=	87%
---------------	------------

Interpretação:

a= concordância (Positivo -Positivo)

b=discordância (Negativo-Positivo)

c=discordância (Positivo -Negativo)

d=concordância (Negativo-Negativo)

Fórmulas:

$a+d$ =concordância observada (Ao)

$a+b+c+d$ =maior concordância possível (N)

$(a+d)/(a+b+c+d)$ =percentagem de concordância total (PCT)

$[(a+b)(a+c)/(a+b+c+d)]$ =concordância esperada por acaso (a)

$[(d+c)(d+b)/(a+b+c+d)]$ =concordância esperada por acaso (d)

Concordância Total Exclusivamente Devido ao Acaso (Ac)=(a)+(d)

$Kappa=(Ao-Ac)/(N-Ac)$

Sistema de Gleason

GLÂNDULAS

MARGENS		GLÂNDULAS		
	Padrão Glandular	Tamanho	Distribuição	
GLEASON 1	Bem definida	Simplex Separadas Redondas	Médio	Pacote fechado
2	Menos definida	Simplex - Separadas Redondas Mais Variadas	Pequeno Médio Grande	Espaçamento médio de um diâmetro glandular
3	Irregular Infiltrada	Simplex, separadas, mais irregular Massas epiteliais redondas cribiformes ou papilar	Pequeno	Espaçamento médio de mais de um diâmetro glandular Raramente em pacotes Massas arredondadas c/ contornos pouco definidos
4	Irregular Infiltrada	Massas glandulares fundidas do tipo hipernefroide	Pequeno	Massas epiteliais anaplásicas irregulares
5	Mal definida	Padrão quase ausente Poucas glândulas pequenas ou "signet ring cels" Poucos lumens pequenos envolvidos por massa epitelial sólida às vezes com necrose central	Pequeno	Massas irregulares ou cordões com contornos pouco definidos

Padrões Anátomopatológicos
Adenocarcinoma da Próstata

Diferenciado Moderadamente Diferenciado Indiferenciado
1 a 4 5 6 7 8 a 10

Fonte: 0 (1977).

ANEXO 9.5

ESTADIAMENTO DO CÂNCER DA PRÓSTATA

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

FONTE: (WHITMORE, 1965; JEWETT, 1975; UICC, 1992; SCHRÖREDER et al., 1992) (Tradução nossa.)

ANEXO 9.6**LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO INSTITUTO DE GENÉTICA E
BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA****PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO RNAm TOTAL POR TRIZOL[®]**

O RNAm total do sangue foi extraído utilizando o reagente Trizol[®] "Reagent" (GIBCO BRL) conforme protocolo otimizado no laboratório seguindo as recomendações do fabricante:

- 1-Aliquotar o sangue total em microtubos de 2 mL.
- 2-Centrifugar a 1.800 x g por 40 minutos a temperatura ambiente.
- 3-Coletar a camada de leucócitos e transferir para um microtubo novo.
- 4-Adicionar 1 mL de Trizol[®] "Reagent" (GIBCO BRL) e homogeneizar em vórtex por 15 segundos.
- 5-Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente.
- 6-Adicionar 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol[®] homogeneizar e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7-Centrifugar a 12.000 x g por 15 minutos a 4° C.
- 8-Transferir o sobrenadante para um tubo novo e adicionar 750 µL de isopropanol gelado (para cada 1 mL de Trizol[®]) e incubar por 10 minutos.
- 9-Centrifugar a 12.000 x g por 10 minutos.
- 10-Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em no mínimo 1 mL de etanol a 70%.
- 11-Centrifugar a 7.500 x g por 5 minutos.
- 12-Ressuspender o pellet em água tratada com DEPC ou TE.

OBS. Todo material utilizado na extração deve ser novo, esterilizado e as luvas devem ser periodicamente trocadas.

ANEXO 9.7

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
Instituto de Genética e Bioquímica – Faculdade de Medicina

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, coordenado neste estudo pelo Dr. Sebastião Antônio Borba, sob orientação do Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho e do Dr. Renato E. Sologuren Achá, estão realizando um estudo genético relacionado com as doenças da Próstata. O projeto consiste no estudo da Biologia Molecular do Câncer de Próstata e da Hiperplasia Prostática Benigna.

Para realização dos exames laboratoriais será necessária a coleta de 10 ml de sangue periférico no pré e no pós-operatório, conforme recomendação clínica. Cabe ressaltar, que todo material utilizado será estéril e descartável, sendo que as coletas dos materiais serão obtidas juntamente com os procedimentos rotineiros do centro cirúrgico do ambulatório e do laboratório do Hospital de Clínicas, sem qualquer desconforto ou riscos adicionais 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. Informações adicionais poderão ser obtidas no fone: (34) 3218.2478 com os responsáveis pelo projeto.

Espera-se que, com este estudo seja possível detectar precocemente o câncer, bem como realizar o estadiamento da doença no paciente. Procura-se desenvolver biomarcadores que poderão ser utilizados na detecção precoce, no estadiamento e no acompanhamento do 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 que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos presentes termos apresentados neste documento, Eu,

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

Assinatura

Testemunhas:



Universidade Federal de Uberlândia
Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer nº: 005/2001

Título do Projeto

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

Coordenador

Dr Luiz Ricardo Goulart Elho

Relator

Prof. Dr. Miguel Tannus Jorge

Área do Conhecimento

Ciências Biológicas - Genética

Código

2.02

Projeto

Local

Multicêntrico:

Nacional

Internacional

Grupo I

Nível

Prevenção

Epidemiológico

Grupo II

Diagnóstico

Não se aplica

Grupo III

Terapêutico

Objetivo(s)

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

Metodologia

Riscos e Benefícios

Os riscos são poucos pois
só se aproveitará o material
Estado de São Paulo por questões
clínicas.

Orçamento

63.487,28

Financiador

Termo de Consentimento

Adequado

Inadequado

Observações
Relevantes
(Restrições, etc...)

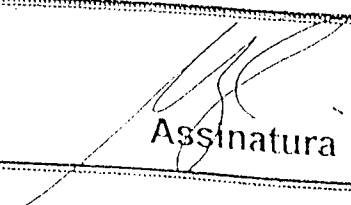
Parecer

Favorável

Favorável com Restrições

Desfavorável

Local e Data: 19.02.2001


Assinatura

97864