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

VARIAÇÕES TRANSCRICIONAIS DOS GENES AR, SRD5A2, KLK2, PCA3, KLK3 E PSMA E IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Aluno: ***Adriana Freitas Neves***

Orientador: ***Luiz Ricardo Goulart***

UBERLÂNDIA-MG

2007

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

VARIAÇÕES TRANSCRICIONAIS DOS GENES AR, SRD5A2, KLK2, PCA3, KLK3 E PSMA E IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO CÂNCER DE PRÓSTATA

ALUNO: ***Adriana Freitas Neves***

Orientador: ***Luiz Ricardo Goulart***

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA-MG
2007

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

VARIAÇÕES TRANSCRICIONAIS DOS GENES AR, SRD5A2, KLK2, PCA3, KLK3 E PSMA E IMPLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO CÂNCER DE PRÓSTATA

ALUNO: ***Adriana Freitas Neves***

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:

Luiz Ricardo Goulart (Orientador - UFU)

Examinadores:

Laura Sterian Ward (Universidade Federal de Campinas – UNICAMP)
Marco Antonio Arap (Universidade Federal de São Paulo – USP)
Etel Rodrigues P. Gimba (Instituto Nacional do Câncer – INCA/RJ)
Adriano Mota Loyola (Universidade Federal de Uberlândia – UFU)

Data da Defesa: 26/02/2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas.

_____

(Orientador)

"O valor das coisas não está
no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que
acontecem.
Por isso existem momentos
inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis"

(Fernando Pessoa)

Aos meus amores...

Dedico:
ao meu pai Mauro,
ao meu anjo da guarda,
minha mãe Doni,
minha irmã Dadá,
meu irmão Val

Ofereço:
ao meu companheiro
Jader e
às minhas princesas
Amanda e Giovanna

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, pela graça concedida.

Ao Prof. Luiz Ricardo minha eterna gratidão pela amizade e confiança.

Aos pacientes e suas famílias, que pela dor e sofrimento, permitiram a realização desse trabalho, contribuindo diretamente para o avanço da ciência e pesquisa.

Aos Docentes do Instituto de Genética e Bioquímica, coordenadores de laboratório, pelo auxílio com equipamentos, materiais e ensinamentos ministrados.

Aos secretários do Instituto de Genética e Bioquímica, Gerson e Marlene, pela paciência e ajuda nos momentos que precisei.

A todos os amigos do laboratório de Genética Molecular: Karina, Paula Sousa, Guilherme, Fausto, Carlos, Karla, Márcia, Paula Cristina, Janaína, Érika, Thiago, Elisângela, Luciana, Thiago, Juba, Tininha, Rone, Tatiana, Andréia...

Àqueles que um dia compartilharam metas de aprendizagem profissional, com quem aprendi muito mais do que fazer simples géis, minha sincera admiração: Maurício Machaim, Wãnia, Vivian, Marcelo, Juliana São Julião, Robson, Bárbara, Graciele, Kleber, Jackie, Ana Cândida, Jú Meola, Alexandra, Kaline, Fred, Waldesse, Weruska, Elaine, Walter...

Às amigas Juliana Franco e Sílvia pela ajuda com o sequenciamento.

Aos amigos do grupo "Câncer de Próstata":

Thaíse e Ana Paula Peres, pelo auxílio com a prática e as discussões...

Ana Paula Carneiro, Carolina e Fabiana pela ajuda com as reações, géis, purificação de bandas, clonagem...

Washington pela ajuda com os géis e organização das amostras...

À equipe médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, em especial ao Dr. Danielo Garcia de Freitas, pela disposição e cooperação direta nesse trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade oferecida.

Ao CNPq e Capes, pelo apoio financeiro.

Aos amigos de graduação e de sempre: Pablo Peixoto, Gilvan, Kally, Simone, Gleyce, Noella, Ana Luíza, Idessânia e André Mamede.

Ao Riva, Adriana Grooke, Eliete, Eliene, Dona Marlene e Sr. Leno pelo apoio e incentivo.

Aos meus sobrinhos Thiaginho, Felipe, Mariana, Thiago e Camila pela alegria irradiada.

E a todos aqueles, que o pouco espaço me impede enumerá-los, que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Obrigada.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS..... vii
LISTAS DE ABREVIAÇÕES..... xi
INTRODUÇÃO GERAL..... 1
CAPÍTULO I: Análise semi-quantitativa dos níveis transcricionais dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos com hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma prostático..... 6
Abstract..... 7
Resumo..... 8
Introdução..... 9
Materiais e Métodos..... 12
Casuística e obtenção da amostras..... 12
a) Triagem dos pacientes..... 12
b) Biópsias..... 12
c) Dosagem do PSA..... 13
d) Pacientes analisados e coleta das amostras..... 13
Extração do RNA total..... 14
Transcrição Reversa (RT) 14
PCR Multiplex Semi-quantitativa..... 15
Análise da RT-PCR Relativa..... 16
Análise Estatística..... 17
Resultados..... 18
Discussão..... 27
Referências Bibliográficas..... 33
CAPÍTULO II: Análise combinada dos transcritos KLK2, KLK3, PCA3 e PSMA no sangue periférico de pacientes com câncer de próstata e sua aplicação diagnóstica..... 39
Abstract..... 40
Resumo..... 41
Introdução..... 42

Materiais e Métodos..... 44
Casuística e obtenção da amostras..... 44
a) Triagem dos pacientes..... 44
b) Dosagem do PSA..... 44
c) Pacientes analisados e coleta das amostras..... 44
Extração do RNA total..... 45
Transcrição Reversa, síntese de cDNA e qualificação da reação..... 45
PCR *Nested* para análise dos transcritos do gene PCA3..... 46
PCR *Nested* para análise dos transcritos do gene KLK2..... 46
PCR *Nested* para análise dos transcritos dos genes PSA e PSMA..... 47
Análise das reações RT-PCR..... 48
Análise Estatística..... 48
Resultados..... 49
Discussão..... 60
Referências Bibliográficas..... 66
CAPÍTULO III: Análise da expressão do RNA não-codificante PCA3 em tecidos prostáticos e em sangue periférico e implicações no diagnóstico do câncer de próstata..... 70
Abstract..... 71
Resumo..... 72
Introdução..... 73
Materiais e Métodos..... 74
Resultados..... 75
RT-PCR do gene PCA3 combinada para os dados obtidos no sangue periférico e tecido prostático..... 75
Estadiamento molecular do câncer de próstata pela RT-PCR do PCA3..... 76
Cálculo de *Odds Ratio* para diferenciar CaP de controle saudável e CaP localizado de doença recidiva..... 80
Testes diagnósticos para a RT-PCR do PCA3..... 80
Discussão..... 82
Referências Bibliográficas..... 87
CAPÍTULO IV: Caracterização de transcritos do gene PCA3, sua provável

ação como miRNA e implicações no diagnóstico do câncer de próstata..... 89
Abstract..... 90
Resumo..... 91
Introdução..... 92
Materiais e Métodos..... 94
Pacientes analisados..... 94
Extração do RNA total..... 94
Transcrição Reversa, síntese de cDNA e qualificação da reação..... 95
PCR para a análise dos transcritos do gene PCA3..... 95
Sequenciamento dos produtos transcricionais do gene PCA3..... 96
Bioinformática..... 96
Resultados..... 97
Homologia dos produtos de RT-PCR variantes..... 97
Estruturas secundárias das moléculas de RNA variantes do gene PCA3..... 100
Discussão..... 111
Referências Bibliográficas..... 113

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1: Potenciais marcadores moleculares associados ao câncer de próstata..... 5

CAPÍTULO I

FIGURAS

Figura 1: RT-PCR representativa para a expressão diferencial relativa dos genes AR e SRD5A2 em tecidos prostáticos de pacientes com hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma de próstata..... 19

Figura 2: RT-PCR Multiplex representativa para a expressão diferencial relativa dos genes KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos prostáticos de pacientes com hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma de próstata..... 20

Figura 3: Box Plot das medianas e quartis para os níveis relativos de expressão dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos prostáticos de pacientes com hiperplasia benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP)..... 22

Figura 4: Níveis relativos de RNAm do gene AR e SRD5A2 de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata de acordo com a classificação TNM (pT1, pT2 e pT3)..... 22

Figura 5: Representação gráfica para as correlações de Pearson positivas encontradas para as expressões dos biomarcadores KLK2, PSMA e PCA3 no câncer de próstata (CaP) e na hiperplasia prostática benigna (HPB)..... 23

TABELAS

Tabela 1: Parâmetros clínicos para os pacientes analisados apresentando hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata..... 13

Tabela 2: Freqüências dos pacientes com CaP segundo o sistema de classificação TNM e grau de Gleason..... 14

Tabela 3: Seqüências de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em amostras de tecidos prostáticos..... 16

Tabela 4: Médias e medianas para as expressões relativas dos genes AR,

SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em fragmentos de tecidos prostáticos..... 20
Tabela 5: Cálculo de *Odds Ratio* para a RT-PCR semi-quantitativa dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos prostáticos, individualmente e em combinação..... 25
Tabela 6: Análise de parêmtros diagnósticos dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos prostáticos benignos e malignos, individualmente e em combinação..... 26
CAPÍTULO II
FIGURAS
Figura 1: Representação da RT-PCR *Nested* qualitativa dos genes PCA3, PSMA, KLK3 e KLK2 realizado no sangue periférico de voluntários saudáveis, pacientes com hiperplasia benigna e com câncer de próstata..... 50
Figura 2: Freqüência dos marcadores KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA no sangue periférico de voluntários saudáveis, pacientes com hiperplasia benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP), realizada pela RT-PCR *Nested*..... 51
TABELAS
Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR internas e externas (*Nested*) para amplificar os RNAm dos genes PCA3, KLK2, KLK3 e PSMA..... 47
Tabela 2: Associação entre os resultados da RT-PCR, em sangue periférico, para os genes KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA e os diferentes estadios e graus de desenvolvimento do câncer de próstata..... 52
Tabela 3: Freqüência dos transcritos gênicos do KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA no sangue periférico de 99 casos de câncer de próstata (CaP) e 140 controles negativos..... 53
Tabela 4: Associação entre os resultados da RT-PCR, em sangue periférico, para os genes KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA combinados e os graus de Gleason..... 54
Tabela 5: Cálculo de *Odds Ratio* para verificação das chances de ocorrência do câncer de próstata pela expressão gênica combinada para o KLK2, PCA3 e PSMA no sangue periférico..... 57

Tabela 6: Avaliação dos parâmetros diagnósticos para o câncer de próstata dado pela análise da expressão dos genes KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA..... 59

CAPÍTULO III

TABELAS

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com CaP, HPB e voluntários saudáveis..... 74

Tabela 2: Freqüência do gene PCA3 no sangue periférico e em tecidos prostáticos de pacientes com câncer de próstata, hiperplasia benigna e em voluntários saudáveis……..... 76

Tabela 3: Subgrupos para a RT-PCR do gene PCA3 nos pacientes com CaP versus parâmetros clínicos……..... 77

Tabela 4: Estadiamento molecular por RT-PCR para o PCA3 versus parâmetros clínicos dos pacientes analisados…..... 78

Tabela 5: Falha bioquímica associada aos parâmetros clínicos e moleculares……..... 79

Tabela 6: Falha bioquímica combinada à RT-PCR para o PCA3 e aos parâmetros clínicos…….. 79

Tabela 7: Teste diagnóstico para a RT-PCR do gene PCA3 no sangue periférico e em tecido prostático comparado a controles negativos para o câncer de próstata……..... 81

Tabela 8: Provável evolução do câncer de próstata conforme os resultados dos parâmetros do PCA3 no sangue periférico por RT-PCR e PSA sérico pré e pós-cirúrgico……..... 82

CAPÍTULO IV

FIGURAS

Figura 1: Representação das variantes de RNA do gene PCA3..... 97

Figura 2: Representação do gene PCA3 e moléculas de RNA variantes..... 98

Figura 3: Representação gráfica para as estruturas secundárias das moléculas de RNA variantes do gene PCA3 geradas pelo programa *Sfold*.. 103

TABELAS

Tabela 1: Freqüência dos *splicing* variantes do gene PCA3 no sangue

periférico..... 99
Tabela 2: Possíveis polipeptídeos encontrados para as moléculas *splicing* variantes do gene PCA3..... 99
Tabela 3: Resultado do *clustering* para os RNAs do gene PCA3..... 101
Tabela 4: Seqüências dos RNAs de interferência do gene PCA3 gerados pelo programa *Sfold*..... 104

LISTA DE ABREVIAÇÕES

A	adenina
AR	gene que codifica para o receptor de andrógeno
AREs	elementos de resposta a andrógeno
B2M	gene que codifica para a beta 2-microglobulina
℃	graus Celsius
CaP	câncer de próstata
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CEACAM-1	gene que codifica para a molécula de adesão celular
C	citosina
DD3	*differential display code 3*
DEPC	dietilpirocarbonato
DHT	diidrotestosterona
DNA	ácido desoxirribonucléico
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato
dTTP	desoxitimidina trifosfato
dsRNA	RNA dupla fita
eNOS	gene que codifica para a enzima óxido nítrico endotelial sintase 3 (*nitric oxide synthase 3*)
FAMED	Faculdade de Medicina
G	guanina
HC	Hospital de Clínicas
HCl	cloreto de sódio
HPB	hiperplasia prostática benigna
IC	intervalo de confiança
ID	identidade
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IOD	densidade óptica integrada
Kb	quilobases
KCl	cloreto de potássio
KLK2	gene que codifica para a calicreína humana 2 (hK2)

KLK3	gene que codifica para a calicreína humana 3 ou antígeno prostático específico (hK3 ou PSA)
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
LSP	gene que codifica para a proteína específica de leucócito (*leukocyte specific protein*)
M	molar
mL	mililitro (s)
mg	miligrama (s)
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
min	minuto (s)
miRNA	microRNA
mM	milimolar
MMLV-RT	*Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase*
ng	nanograma (s)
No	número
OPN	gene que codifica para a osteopontina 1
ORF	*open reading frame*
pb	pares de base
PBL	sangue periférico (*peripheral blood*)
PCA3	*prostate cancer antigen 3,* gene que codifica para o RNA não codificante DD3
PCR	reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)
pmoles	picomoles
PSA	antígeno prostático específico
PSMA	gene que codifica para o antígeno de membrana prostático específico
PT	tecido prostático (*prostatic tissue*)
PTI	gene que codifica para o indutor de tumor prostático (*prostate carcinoma tumor-inducing*)
RNA	ácido ribonucléico
RNAnc	RNA não codificante
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RNAr	RNA ribossomal
RNase	ribonuclease
RNAt	RNA transportador
RT	transcrição reversa (*reverse transcriptase*)
RTU	ressecção transuretral

s	segundo (s)
SD	desvio padrão (*standard deviation*)
siRNA	RNA de interferência (*small interference RNA)*
snRNA	*small nuclear* RNA
snoRNA	*small nucleolar* RNA
SRD5A2	gene que codifica para a enzima 5α-redutase tipo II
SV1	*splicing* variante 1
SV2	*splicing* variante 2
SV3	*splicing* variante 3
SV4	*splicing* variante 4
T	timina
Taq	*Termus aquaticus*
TBE	tampão Tris/ Borato/ EDTA
TGF-beta	gene que codifica para o fator de crescimento transformante beta-1 (*tumor growth factor β*)
TNM	tumor-linfonodos-metástases (t*umor-node-metastasis*)
TP53	gene que codifica para a proteína p53 (*tumor protein 53*)
U	unidade (s) de enzima
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
µg	micrograma (s)
µl	microlitro (s)
µm	micromolar
uPA	ativador plasminogênio tipo urocinase
UV	ultravioleta
USTR	ultra-sonografia transretal
VDR	gene que codifica para o receptor de vitamina D
VPN	valor preditivo negativo
VPP	valor preditivo positivo

Apresentação

Nas últimas décadas, o câncer de próstata tem emergido como uma das causas mais comuns de doenças na população masculina. Nos Estados Unidos e no Brasil é o segundo mais comumente diagnosticado após o câncer de pele, não melanoma e a segunda causa de morte em homens depois do câncer de pulmão. O Sudeste do Brasil apresenta um dos maiores índices de incidência desse tipo de tumor, sendo que em Minas Gerais, ele ocupa o segundo lugar em casos diagnosticados e o terceiro em número de óbitos.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos estimados para o Brasil em 2006 foi de 47.280. Estes valores correspondem a um risco estimado de 51 casos novos a cada 100 mil homens. Estima-se que a freqüência para a região Sul seja de 68/100.000, 63/100.000 na região Sudeste, 46/100.000 na região Centro-Oeste, 34/100.000 na região Nordeste e, 22/100.000 na região Norte.

O rastreamento de anomalias prostáticas é realizado por três etapas: o exame físico (toque retal), a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) e a ultra-sonografia transretal (USTR). A USTR é indicada quando os resultados do toque digital ou das dosagens de PSA são anormais, em que é requerida a análise de fragmentos da próstata. A realização do toque retal e das dosagens do PSA sérico são recomendados em todos os homens a partir de 50 anos, e a partir dos 45 anos para pacientes com histórico familiar. Para os pacientes com câncer de próstata o estadiamento clínico e o resultado histopatológico são de fundamental importância para o planejamento terapêutico, e se baseiam principalmente nas análises do sistema de classificação TNM (*Tumor Node-Metastasis*) e na escala de Gleason.

Destacando características de sua biologia, o câncer de próstata corresponde a uma alteração no balanço entre a proliferação e a morte celular. Durante os estágios iniciais do crescimento do câncer, as células irão responder aos mesmos fatores regulatórios (hormônio-dependente), embora as taxas de proliferação celular sejam maiores do que as de morte celular. A disfunção no processo regulatório associada a mutações genéticas, reflete graus de respostas anormais dos fatores de crescimento, gerando um processo que leva a formação de clones autônomos de células malignas, que passa a não responder ao controle androgênico (hormônio-independente).

Diversas aberrações gênicas e cromossômicas têm sido reportadas como sendo capazes de levar ao aumento, redução ou mesmo à perda de expressão gênica em células com câncer de próstata. As análises utilizadas em genética molecular, como a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), têm permitido a análise diferencial da expressão de diversos genes entre amostras contendo células fenotipicamente normais e aquelas que apresentam potencial para malignidade. Dentre os vários genes prostáticos envolvidos na ativação para a carcinogênese estão: os prostáticos específicos, ativadores transcricionais, reguladores, sinalizadores, receptores, supressores e oncogenes que podem atuar de forma integrada entre si e com fatores ambientais, modulando diferencialmente a resposta individual, bem como os diferentes fenótipos da doença. Assim, a natureza maligna do câncer de próstata revela ser essa uma doença heterogênea, multifocal e multifatorial, além de ser uma patologia com grande impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes que a apresentam. De acordo com os dados publicados sobre os potenciais marcadores para o câncer de próstata e baseado no banco de dados GeneCards (http://www.genecards.org) parte dos genes associados com a ocorrência, desenvolvimento e progressão dessa patologia, foram sumarizados na Tabela 1.

O trabalho aqui apresentado visa buscar métodos auxiliares para o diagnóstico do câncer de próstata, tanto para a doença localizada quanto em estágios avançados, as quais requerem diferentes medidas terapêuticas. Os estudos em oncogenética molecular para o câncer de próstata vêm sendo realizados pelo LABGEM/UFU (Laboratório de Genética Molecular/UFU) desde 2001, e genes como o KLK2, KLK3, PSMA, LSP, CEACAM-1, PTI, TP53, VDR, PCA3, AR, SRD5A2, eNOS, TGF-beta e OPN têm sido testados para verificar seus papéis associados a polimorfismos ou mutações pontuais no DNA e a alterações na expressão gênica comparado às doenças benignas. No presente trabalho, quatro dos genes listados na Tabela 1 e dois associados à ação da testosterona foram avaliados quanto aos seus perfis de expressões gênicas, utilizando a técnica de RT-PCR. A literatura tem demonstrado que a testosterona, após entrar nas células prostáticas, é convertida em diidrotestosterona pela enzima 5-alfa redutase (gene SRD5A2), atuando em genes alvos, como o KLK2 e

KLK2, por ligação ao receptor de andrógeno (gene AR). Ainda, a regulação de um outro gene, o PSMA, indica uma regulação por andrógenos em seus níveis intracelulares, contudo nenhum ARE (elemento de resposta a andrógenos) tem sido encontrado na região promotora desse gene. Dessa forma, baseado nos dados significantes quanto à importância clínica e a biologia diretamente associada à ação da testosterona no câncer de próstata, foram avaliados os produtos transcricionais dos genes SRD5A2, AR, KLK2, PCA3, PSA e PSMA.

Nos quatro capítulos que se seguem serão abordadas as alterações transcricionais dos seis genes e suas implicações no diagnóstico do câncer de próstata por meio de: análises semi-quantitativas dos transcritos gênicos do AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 pela RT-PCR de tecidos prostáticos provenientes de pacientes com a HPB (hiperplasia prostática benigna) e com câncer de próstata (Capítulo I); análises qualitativas dos transcritos gênicos do KLK2, KLK3, PSMA e PCA3 por RT-PCR *Nested* de sangue periférico de pacientes com câncer de próstata, HPB e de voluntários saudáveis (Capítulo II); análises conjuntas dos transcritos do gene PCA3 em tecidos prostáticos e em sangue periférico, usando ambas as técnicas, no diagnóstico molecular do câncer de próstata (Capítulo III) e, por fim, uma caracterização molecular do gene PCA3 com a descrição de novos variantes transcricionais e suas freqüências em pacientes com câncer de próstata, HPB e em indivíduos saudáveis (Capítulo IV).

Em resumo, pretende-se com esta tese fornecer novas informações moleculares que possam ser úteis como ferramentas complementares aos parâmetros clínicos e laboratoriais existentes no diagnóstico do câncer de próstata.

Tabela 1: Potenciais marcadores moleculares associados ao câncer de próstata.

Marcador	***Locus Cromossômico***	***Localização Subcelular***	***Função Bioquímica***	***Função Biológica e Celular***
Caderina-1	16q22.1	Membrana plasmática	Ligação a Catenina/integrina	Adesão celular
DD3/PCA3	9q21-22	Núcleo/ citoplasma	Não-codificante	Desconhecida
HSP90	11q13	Citoplasma	Chaperona	Resposta ao stress celular
IGFBP-3	7p13-12	Secretado	Ligação a IGF	Sinalização/apoptose
IL-6	7p15.3	Secretado	Citocina	Diferenciação de células-B
KLK2	19q13.41	Secretado	Protease	Clivagem Met-Lys/Ser-Arg
Maspin	18q21.3	Extracelular	Inibidor de protease	Supressor de invasão celular
NKX3.1	8p21	Núcleo	Fator de transcrição	Proliferação celular
OPN	4q22.1	Secretado	Ligação a Integrina	Interação Célula-matriz
p53	17p13.1 44	Núcleo	Fator de transcrição	Paralização do crescimento/apoptose
PCGEM1	2q32	Núcleo/ citoplasma	Não-codificante	Proliferação celular/sobrevivência
KLK3 (PSA)	19q13.3-.4	Secretado	Protease	Liquefação do semen
PSCA	8q24.2	Membrana plasmática	Desconhecida	Desconhecida
PSMA	11p11.2	Membrana plasmática	Folato hidrolase	Resposta ao stress celular
RNAseL	1q25.3	Citoplasma/ Mitocôndria	RNAse	Resistência viral
TERT	5p15.33	Núcleo	Transcriptase reversa	Síntese telomérica
VEGF	6p12	Secretado	Ligação ao VEGFR	Angiogênese

Fonte: http://www.genecards.org, Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA (2004) Detection of Prostate Cancer and Predicting Progression: Current and Future Diagnostic Markers. Clin Cancer Res 10: 3943–3953.

CAPÍTULO I:

Análise semi-quantitativa dos níveis transcricionais dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos com hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma prostático

[1]

[1] ***FORMATO DE SUBMISSÃO PARA DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY***

Abstract

Prostate cancer is a common disease in the world and in some countries it is one of the main causes of male population mortality. Some molecular markers have been associated with prostate carcinogenesis. To observe changes in transcript levels of the AR, SRD5A2, KLK2, PSMA and PCA3 genes, the mRNA was analyzed in tissues with prostatic adenocarcinoma (PCa, N= 48) and benign prostatic hyperplasia (BPH, N= 25), performed through a differential multiplex RT-PCR assay. Significant differences were observed in the relative expression of these genes between cancerous and non-cancerous tissues. The optical density ratio of the cDNA amplicons between PCa and BPH for the AR gene was 1.6-fold higher for the prostatic adenocarcinoma. On the other hand, the SRD5A2 mRNA levels were associated with BPH and were 1.4-fold higher than that of PCa. For KLK2, PSMA and PCA3, the transcriptional levels were respectively, 1.9-, 1.9- and 5-fold higher in PCa than those in BPH tissues. Of the diagnostics tests carried through individually, the PCA3 gene was that presented higher sensitivity and accuracy, and the inclusion of the serum PSA improved the sensitivity (of 76 to 92%), positive preditive value (of 85 to 94%), negative preditive value (of 60 to 62%) and accuracy (of 74 to 78%). The results suggest that the higher AR, KLK2, PSMA, and PCA3 and/or reduced SRD5A2 genes expression in prostatic tissues may indicate the occurrence of prostate adenocarcinoma; however the PCA3 and serum PSA analysis together are highly promising as auxiliary method in the diagnosis of this cancer.

Key words: AR, SRD5A2, KLK2, PSMA, PCA3, multiplex RT-PCR, gene expression, prostate cancer, benign prostatic hyperplasia.

Resumo

O câncer de próstata é uma doença comum no mundo e já assumiu em alguns países uma das principais causas de mortalidade da população masculina. Vários marcadores moleculares têm sido associados à gênese do câncer de próstata. A fim de demonstrar a expressão diferencial dos níveis transcricionais dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em doenças prostáticas, o RNAm foi analisado em tecidos com adenocarcinoma prostático (CaP, N= 48) e hiperplasia prostática benigna (HPB, N= 25) por meio da técnica RT-PCR multiplex semi-quantitativa. Foram observadas diferenças significativas na expressão relativa desses genes entre os tecidos cancerosos e não-cancerosos. A taxa de densidade ótica entre os amplicons para cDNA provenientes do gene AR foi 1.6 vezes maior no adenocarcinoma prostático. Por outro lado, os níveis de RNAm do gene SRD5A2 foi associado com a HPB e foi 1.4 vezes maior do que no CaP. Para os genes KLK2, PSMA e PCA3, os níveis transcricionais foram respectivamente, 1.9, 1.9 e 5 vezes maior no câncer comparado a tecidos benignos. Dos testes diagnósticos realizados, o gene PCA3 individualmente foi o que apresentou as melhores sensibilidade e acurácia, sendo que a inclusão das medidas de PSA sérico melhorou a sensibilidade (de 76 para 92%), o valor preditivo positivo (de 85 para 94%), o valor preditivo negativo (de 60 para 62%) e a acurácia (de 74 para 78%). Os dados sugerem que a maior expressão dos genes AR, KLK2, PSMA e PCA3 ou expressão reduzida do gene SRD5A2 em tecidos prostáticos podem indicar a ocorrência do adenocarcinoma da próstata, sendo que as análises do gene PCA3 juntamente aos do PSA sérico são altamente promissores como método auxiliar no diagnóstico desse tipo de câncer.

Palavras-chave: AR, SRD5A2, KLK2, PSMA, PCA3, RT-PCR multiplex, expressão gênica, câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna.

Introdução

Os hormônios esteróides apresentam importante papel no crescimento, diferenciação e fisiologia de tipos celulares, como células prostáticas, células T, células do timo e do sistema imune [1]. Em relação à próstata normal, após entrar nas células prostáticas, a testosterona é convertida em diidrotestosterona (DHT) pela ação da enzima 5α-redutase tipo II (SDR5A2) [2-4].

Devido à conversão da testosterona em DHT com conseqüente ativação de vias genômicas e proteômicas, necessárias para a manutenção das funções normais da próstata, a caracterização das ações da enzima 5α-redutase tipo II se torna importante em níveis gênicos e protéicos [5, 6]. Uma variedade de fármacos capazes de bloquear a atividade da enzima 5α-redutase tipo II têm sido sintetizados para tratamento de patologias da próstata e para prevenir o câncer de próstata. Quanto aos níveis dos transcritos do gene SRD5A2, Luo *et al.* [7] demonstraram, por RT-PCR semi-quantitativa, que o câncer de próstata está associado com reduzida expressão desse gene. Contudo, esses dados apontam para a necessidade de se estabelecer melhor quais são as implicações das terapias que inibem os efeitos da 5α- redutase tipo II nas doenças prostáticas.

A DHT modula a transcrição de genes de modo tecido-específica e célula-específica pela sua associação ao receptor de andrógeno (AR) no citoplasma [2-4], e posterior atuação no núcleo pela ligação do complexo formado (receptor de andrógeno – diidrotestosterona) a elementos de resposta a andrógenos (AREs) [2, 3, 8]. O receptor de andrógeno é um membro da família dos receptores nucleares [9] que trans-ativa a expressão de genes e medeia o recrutamento de co-activadores e co-repressores [10-14]. Embora muitas doenças genéticas sejam causadas pela presença de mutações de ponto em determinados genes, um grande número de doenças apresentam alterações no número de cópias de um gene. De acordo com Brinkmann *et al.* (1995) [15], as mutações no gene AR podem contribuir para o crescimento celular aberrante no câncer de próstata e a análise de sua proteína revela ser essa uma molécula chave na recidiva do câncer de próstata, o que implica que sua regulação possa ocorrer em nível transcricional. Alguns autores têm investigado os níveis de RNAm do gene AR por *northern blotting* [16] ou *RNase protection assay* [17], demonstrando que os

RNAm do gene AR são pouco abundantes o que indica que sua quantificação permanece difícil por métodos convencionais.

Dentre os genes ativados pelo receptor de andrógeno estão o KLK2 e o KLK3 [18]. Em humanos, até 1992, a família dos genes que codificam para as calicreínas teciduais incluía somente três membros: gene que codifica a calicreína pancreática/ renal (KLK1), gene que codifica a calicreína glandular prostática (KLK2) e, o gene que codifica o antígeno prostático específico (KLK3 ou PSA). Em 2000, Yousef e colaboradores [19] descreveram a existência de quinze genes que estão incluídos na família das calicreínas. A calicreína glandular prostática, *in vitro*, ativa a forma zimogênica do uPA (ativador plasminogênio tipo urocinase), sugerindo ter influência na cascata proteolítica extracelular das células prostáticas tumorais [20, 21]. O produto do gene KLK3, o antígeno prostático específico (PSA) tem sido amplamente utilizado como marcador tumoral. Desde sua descoberta em 1979 [22], a sua utilização no acompanhamento dos pacientes e como método auxiliar no diagnóstico clínico tem melhorado a detecção do câncer de próstata. Contudo, atualmente, frente aos avanços científicos e tecnológicos, o uso das medidas desse antígeno na circulação tem sido discutido, por apresentar elevados níveis também em doenças benignas da próstata, como hiperplasias e prostatites.

Outro gene que também parece ser regulado pelos níveis prostáticos de testosterona, o PSMA (antígeno de membrana prostático específico), tem apresentado expressão gênica aumentada com a redução nos níveis de testosterona, o que é confirmado pelo aumento da expressão desse gene em doença hormônio-refratária de pacientes tratados [23, 24], no entanto, nenhum ARE tem sido encontrado na região promotora desse gene [25, 26]. O antígeno prostático específico de membrana, codificado pelo gene PSMA, é uma glicoproteína transmembrana celular, composta por 750 aminoácidos e se apresenta na superfície das células epiteliais da próstata, com uma estrutura constituída de três partes: uma região interna com 19 aminoácidos, uma região transmembrana com 24 aminoácidos e uma região externa com 707 aminoácidos, cuja função principal indica ser a de folato hidrolase, envolvido na biossíntese folato intraceluarmente [25, 27].

O gene PCA3 de expressão próstata-específica tem sido descrito associado com a perda da homeostase prostática, resultando no câncer de próstata. O gene DD3/PCA3 foi isolado pela técnica molecular que analisa a expressão diferencial de genes (*Differential Display*) entre tecidos doentes e saudáveis, o qual se mostrou altamente expresso no câncer de próstata comparado a tecidos não neoplásicos [28]. O gene PCA3 apresenta em sua composição 4 exons, sendo que os RNAm provenientes de um *splicing* do exon 2 parecem ser freqüentes no adenocarcinoma prostático e a poliadenilação alternativa em três diferentes posições do exon 4 geram diferentes tamanhos de transcritos [18].

A natureza heterogênea, multifatorial e multifocal do câncer de próstata o torna um alvo importante para elucidação dos mecanismos associados à gênese e progressão dessa doença considerada a segunda causa de morte por câncer em homens, estando atrás somente do câncer de pulmão [2, 29]. As técnicas de biologia molecular têm fornecido ferramentas úteis na análise de mutações e da expressão de genes envolvidos nas mais diversas vias de desenvolvimento deste câncer. Em relação ao câncer de próstata são cada vez mais freqüentes as reportagens sobre o uso potencial da RT-PCR na descoberta de marcadores potenciais associados à ocorrência e desenvolvimento dessa patologia.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a expressão dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3, por RT-PCR multiplex semi-quantitativa, individualmente e em combinação. Essas análises foram feitas em tecidos prostáticos benignos e malignos, a fim de se encontrar possíveis associações entre os níveis de transcritos desses genes e a ocorrência do câncer de próstata, assim como verificar possíveis associações também com o estadiamento anátomo-patológico e níveis de PSA sérico.

Materiais e Métodos

Casuística e obtenção das amostras

a) Triagem dos pacientes

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e pela equipe de urologia do Hospital de Clínicas da referida instituição, mediante aprovação do comitê de ética em Pesquisa sob o número de parecer 005/2001. Para a realização da análise molecular associada à parte clínica, foram coletadas amostras de tecidos prostáticos mediante assinatura de um termo de consentimento. A coleta das amostras foi realizada de janeiro/2001 a julho/2006, pelos médicos e residentes da disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina (FAMED) da UFU.

A triagem para obtenção dos grupos de estudo, estabelecida pela equipe urológica, foi iniciada para os pacientes com mais de 50 anos, sem história familiar do câncer de próstata, e a partir dos 40 anos, nos casos de história familiar ou em pacientes de raça negra, incluindo a avaliação de sintomas do trato urinário inferior, que freqüentemente estão relacionados à presença da HPB, do exame digital e das dosagens bioquímicas do PSA no sangue periférico.

b) Biópsias

As biópsias foram realizadas por agulha, no Centro Cirúrgico do HC/UFU. O procedimento foi sempre realizado por via transretal, sendo coletados seis fragmentos de cada lobo prostático para análise anátomo-patológica, de forma não guiada por ultra-som. A análise patolológica das amostras quanto à presença do câncer de próstata foram feitas por macrodissecção. Posteriormente confirmado o diagnóstico final da anatomia-patológica, os pacientes foram encaminhados para o tratamento cirúrgico definitivo, respeitando a técnica e as indicações de cada patologia urológica individualmente. A prostatectomia radical foi realizada para o câncer de próstata e a ressecção transuretral para os pacientes com hiperplasia prostática benigna.

Nos casos de câncer prostático, o grau tumoral foi definido de acordo com a escala de Gleason, e o estadio clínico de acordo com a classificação TNM 92, estabelecida pela União Internacional Contra o Câncer.

c) Dosagem do PSA

Dois tubos de sangue de cada paciente foram encaminhados para o laboratório de análises clínicas do HC da UFU onde se utilizou o kit de dosagem quantitativo do PSA IMMULITE, de acordo com as instruções do fabricante, com valor normal entre 0 e 4,0 ng/mL.

d) Pacientes analisados e coleta das amostras

As amostras de tecidos maligno e benigno foram obtidas de 73 pacientes, sendo que 48 apresentaram adenocarcinoma da próstata (CaP) e 25 apresentaram hiperplasia benigna (HPB). Após a coleta, as amostras de tecido foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular em *RNAHolder* (BioAgency) para a manutenção da integridade do RNA e posteriormente armazenados em ultrafrezeer à -80°C. A idade média dos casos de HPB e CaP foram de 71 e 66 anos, respectivamente. A média para o níveis de PSA sérico foi de 7.6 e 14.7 para os pacientes com HPB e CaP, respectivamente (Tabela 1). Dos pacientes com CaP analisados, 63% apresentaram doença localizada e 40% Gleason <7 (Tabela 2).

Tabela 1. Parâmetros clínicos para os pacientes analisados apresentando hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

Diagnóstico		***Idade***		***PSA (ng/mL)***	
Clínico	***No. (%)***	***Média (SD)***	***Variação***	***Média (SD)***	***Variação***
HPB	25 (34)	70.8 (10.4)	47 – 87	7.6 (6.1)	0.8 – 24.3
CaP	48 (66)	66.4 (7.4)	48 – 80	14.7 (6.2)	8.0 – 25.0

HPB = hiperplasia prostática benigna; CaP = câncer de próstata; No. = número de indivíduos; SD = desvio padrão.

Tabela 2: Freqüências dos pacientes com CaP segundo o sistema de classificação TNM e grau de Gleason.

Estadiamento do Tumor	***Pacientes No. (%)***
pT1	3/48 (6)
pT2	27/48 (57)
pT3	17/48 (35)
pT4	1/48 (2)
Grau de Gleason	
5-6	19/48 (40)
7	26/48 (54)
8-9	3/48 (6)

Extração do RNA total

O RNA total foi extraído em duplicata para cada tecido analisado, utilizando Trizol *Reagent* (Invitrogen) seguindo-se as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose e por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,5 %, 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 vídeo documentação *ImageSystem* – VDS, Amersham Biosciences).

Transcrição Reversa (RT)

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 1 µg de RNA total, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Biosciences), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. O volume final de cada reação foi completado para 20 µl com água tratada com DEPC. A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37°C por 1 hora e aquecida a 95°C por 5 minutos para desnaturação do híbrido RNA-cDNA e também, para inativação da

enzima MMLV-RT. Reações controle foram realizadas para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA foi estocado a -20ºC para posterior amplificação.

PCR Multiplex semi-quantitativa

As seqüências de todos oligonucleotídeos utilizados, com seus respectivos locais gênicos de ligação e fragmentos gerados pela PCR estão descritos na Tabela 2. Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PCA3 e PSMA foram desenhados pelo programa *Primer* versão 2.0.

A reação de PCR multiplex semi-quantitativa para o gene AR foi realizada para um volume final de 25 µl contendo: 4 µl de cDNA, 1.5 U of Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 2.5 pmoles de *primers* direto e reverso para o gene B2M (beta-2-microglobulina) [19] e 10.5 pmoles de *primers* direto e reverso do AR. A reação para os transcritos do gene SRD5A2 foi realizada com as mesmas condições, contudo foram utilizados 3 pmoles de *primers* direto e reverso. As condições de PCR foram: 95°C por 5 min, 10 ciclos a 94°C por 30 s, 61°C por 1 min, 72°C por 1 min, e mais 22 ciclos a 94°C por 30 s, 61°C por 40 s, 72°C por 50 s, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 min.

A reação de PCR Multiplex semi-quantitativa para os genes KLK2, PSMA e PCA3 foi realizada para um volume final de 25 µl contendo: 4 µl de cDNA, 1.5 U of Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.0 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 7 pmoles de *primers* direto e reverso para o gene B2M; 4.0, 7.0 e 3.0 pmoles de *primers* para o gene KLK2, PSMA e PCA3, respectivamente. A reação foi incubada por 10 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min, e mais 18 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 40 s, 72°C por 50 s, precedida de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min e uma posterior extensão final a 72°C por 5 min.

Os transcritos do gene B2M foram co-amplificados como controle interno e semi-quantitativo de todas as reações realizadas. O número de ciclos necessários

para que as reações estejam em fase exponencial de amplificação foram experimentalmente determinados.

Tabela 3: Seqüências de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em amostras de tecidos prostáticos.

Gene	***Sequência de primers 5'-3' (direto/reverso)***	***Localização***	***Tamanho do produto amplificado (pb)***
AR	CATGTGGAAGCTGCAAGGTCT	Exon 2	
	GTGTAAGTTGCGGAAGCCAGG	Exon 4 e 5	464
SRD5A2	GGTACTTCTGGGCCTCTTCTG	Exon 1	
	GAAGACACCCAAGCTAAACCG	Exon 2 e 3	211
KLK2	CAGCATCGAACCAGAGGAGT	Exon 3	
	ACTAGAGGTAGGGGTGGGAC	Exon 5	378 [1] e 341
PSMA	AGGGGCCAAAGGAGTCATTC	Exon 6	
	CTCTGCAATTCCACGCCTAT	Exon 7	196
PCA3	CCGAGGGAGACCAGGAAGAT	Exon 1	
	ATCGATGACCCAAGATGGCG	Exon 4	277
B2M[2]	AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA	Exon 2	
	TGTTGATGTTGGATAAGAGAA	Exon 4	536

[1]= A molécula de 378 pb representa um *splicing* alternativo descrito por Riegman *et al.* (1991) [30], acesso No. AF188747 (www.ncbi.nlm.nih.gov); [2]= *Primers* descritos por Bussemakers *et al.* (1999) [28].

Análise da RT-PCR Relativa

Os amplicons obtidos foram separados eletroforeticamente em um gel de agarose 2.0 % corado com 0.5 µg/ml de brometo de etídeo. As imagens do gel foram capturadas sob luz ultravioleta e as concentrações relativas foram estimadas pelas leituras densitométricas, dadas pelo IOD do programa *Image*

Master™ VDS *Software* (versão 2.0 – Amersham Biosciences), seguida pelas taxas relativas do RNAm alvo/B2M. Os resultados obtidos em duplicatas para cada paciente foram submetidos à média para análise final da estimativa dos níveis relativos de RNAm dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa BioEstat, versão 3.0. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para as comparações de médias para a expressão relativa do AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 entre os grupos de CaP e HPB. Os níveis relativos dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 nos tecidos prostáticos com HPB e CaP foram dadas pela representação gráfica por Box Plot evidenciando as medianas e os quartis. As análises de correlação de Pearson foram realizadas entre todos os parâmetros clínicos e laboratoriais: níveis relativos do AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3, idade do pacientes no diagnóstico, níveis do PSA sérico, sistema de estadiamento TNM e grau de Gleason. Foi estabelecido um *cut off* para testar os índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia e para os cálculos de *Odds Ratio* para os cinco genes individualmente e em associação. Foram considerados significativos os resultados com valores de $P < 0.05$.

Resultados

As amplificações para os transcritos dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3, por RT-PCR multiplex semi-quantitativa, mostraram que a estratégia de reação múltipla não apresentou competição prejudicial na amplificação, permitindo grande eficiência na detecção dos níveis de expressão de genes prostáticos de diferentes vias de atuação.

Na Figura 1 foi representada a amplificação de cDNAs em formato multiplex para os genes AR e SDR5A2. Em 1A e 1B estão as amplificações para o gene AR em tecidos com HPB e CaP, respectivamente. As análises para a expressão relativa deste gene foram significativamente diferentes entre os grupos (P= 0.03), com níveis significativamente maiores no câncer de próstata comparado à doença prostática benigna. Em 1C e 1D estão as amplificações para os genes B2M e SRD5A2 em tecidos com HPB e CaP, respectivamente. Diferenças significantes foram observadas na expressão relativa deste gene SRD5A2 entre tecidos cancerosos e não cancerosos (P= 0.02), apresentando maiores níveis na doença benigna (Tabela 4).

Na Figura 2A estão representadas as reações feitas para os amplicons de cDNA dos genes B2M, KLK2, PSMA e PCA3 em separado e simultaneamente. Em 2A estão os testes da reação de PCR demonstrando que a reação multiplex para os quatro genes em questão pode ser realizada simultaneamente, sem competição prejudicial nas amplificações. Nas Figuras 2B e 2C estão as amplificações para os genes KLK2, PSMA e PCA3 simultaneamente num formato multiplex, e as amplificações para o gene B2M como controle endógeno da reação da PCR relativa, em tecidos com HPB e CaP, respectivamente.

De acordo com os dados descritos na Tabela 4, a taxa de densidade ótica dos amplicons de cDNA para o gene AR foi 1.6 vezes maior no adenocarcinoma em relação a HPB e, por outro lado, os níveis de RNAm do gene SRD5A2 foi 1.4 vezes maior na hiperplasia benigna comparado ao câncer de próstata. Para os genes KLK2 e PSMA as taxas de densidade ótica dos amplicons de cDNA foram 1.9 vezes maior no adenocarcinoma em relação à HPB e para o gene PCA3, a diferença foi maior em 5 vezes para o adenocarcinoma prostático. A variação de expressão gênica (limite superior e inferior) e os valores encontrados para os

quartis na análise de expressão dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 podem ser visualizados na Figura 3. Essa representação gráfica por Box Plot demonstrou que para a expressão do AR, KLK2 e PSMA a maior diferença está abaixo da mediana para o grupo HPB e acima do primeiro quartil para o grupo CaP. Para o SRD5A2 a maior diferença encontra-se acima do primeiro quartil para o grupo HPB e abaixo da mediana para o CaP. Para os transcritos do gene PCA3 as diferenças foram acentuadas, sendo que aproximadamente 75% dos casos com HPB apresentaram níveis de RNA menores que os pacientes com CaP.

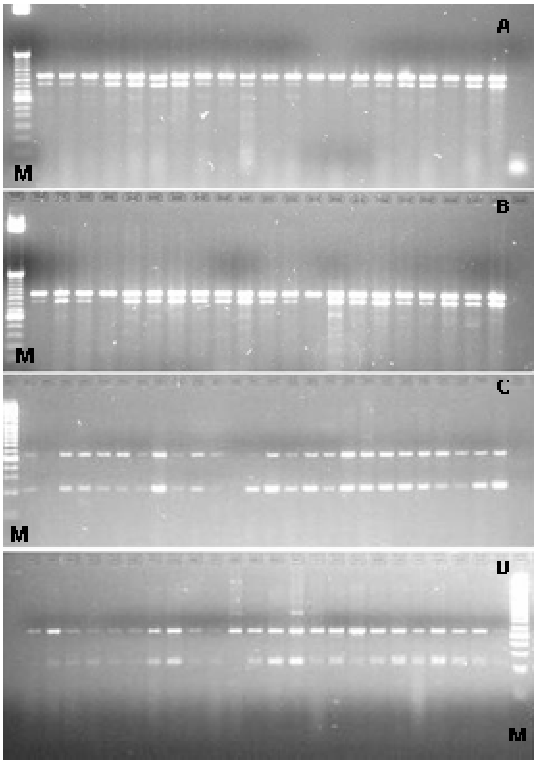


Figura 1. RT-PCR representativa para a expressão diferencial relativa dos genes AR e SRD5A2 em tecidos prostáticos de pacientes com hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma de próstata. A e C – AR (434 pb) e SRD5A2 (211 pb) amplicons de cDNA em tecidos prostáticos com HPB, respectivamente. B e D – AR e SRD5A2 cDNA amplicons amplicons de cDNA em tecidos prostáticos com CaP, respectivamente. Os transcritos do gene B2M (536 pb) foram usados como controle interno de reação. M - Marcador de peso molecular de 100 pb. O tamanho dos produtos amplificados foi indicado entre parênteses.

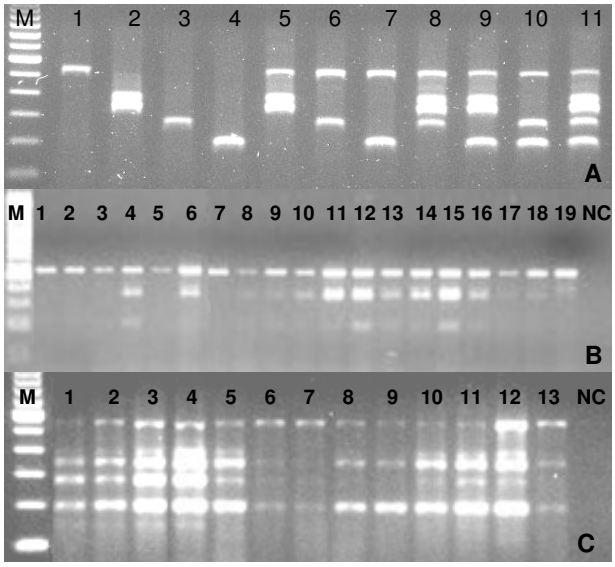


Figura 2. RT-PCR Multiplex representativa para a expressão diferencial relativa dos genes KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos prostáticos de pacientes com hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma de próstata. A – Reações de PCR realizadas separadamente e em combinações para cada gene para teste de competição em amostra de CaP. As reações 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 contêm *primers* para o gene B2M (536 pb); 2, 5, 8, 9 e 11 para o KLK2 (378 e 341 pb); 3, 6, 8, 10 e 11 para o PCA3 (277 pb); 4, 7, 9, 10 e 11 para o PSMA (196 pb). B e C – Reações multiplex para os genes KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos prostáticos com HPB e CaP, respectivamente. M - Marcador de peso molecular de 100 pb. O tamanho dos produtos amplificados foi indicado entre parênteses. NC- controle negativo de reação.

Tabela 4: Médias e medianas para as expressões relativas dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em fragmentos de tecidos prostáticos.

RT-PCR semi-quantitativa	***CaP***		***HPB***		***P***
	Média (SD)	***Mediana***	***Média (SD)***	***Mediana***	
AR	0.47 (0.33)	0.41	0.30 (0.19)	0.28	0.03
SRD5A2	0.75 (0.48)	0.70	1.04 (0.49)	0.99	0.02
KLK2	1.45 (1.08)	1.13	0.74 (0.85)	0.60	0.0008
PSMA	1.09 (0.78)	1.05	0.58 (0.48)	0.58	0.0027
PCA3	0.71 (0.98)	0.54	0.14 (0.23)	0.00	0.0001

Para verificar associações entre as expressões do gene AR e SRD5A2 e o estadiamento TNM foi montado um gráfico de tendência considerando as médias de HPB e dos estágios pT1, pT2 e pT3. Foi observado um comportamento bimodal e diferente entre ambos os genes, AR e SRD5A2 de acordo com grupo HPB e estadiamento TNM (Figura 4). Os grupos de pacientes com HPB, pT2 e pT3, embora morfologicamente e fisiologicamente diferentes, foram os que apresentaram menores níveis do AR, e diferentemente, para o gene SRD5A2 níveis maiores de expressão foram apresentados pelos grupos de pacientes com HPB, pT2 e pT3.

Resultados significativos também foram obtidos para as correlações entre os dados de expressão relativa entre os genes KLK2, PSMA e PCA3. Observou-se que, no CaP, a expressão desses genes aumentam concomitantemente, enquanto na HPB, apenas foram associadas positivamente as expressões dos genes PSMA e KLK2 (Figura 5). Nenhuma outra correlação significativa foi obtida para os demais parâmetros clínicos e laboratoriais analisados nesse estudo.

De acordo com os limites de medianas e quartis que diferenciaram o grupo de pacientes com CaP daqueles com HPB , foi estabelecido um *cut off* para cada gene para cálculo do valor de *Odds Ratio* e do teste diagnóstico, sendo de 0.5, 0.8, 1.0, 0.7 e 0.2 para o AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3, respectivamente. Na Tabela 5 foram listados os valores de *Odds Ratio (OR)* para cada gene individualmente e em suas combinações. Para tentar melhorar os parâmetros de testes diagnósticos os dados do PSA sérico (com 94% de sensibilidade e 28% de especificidade) foram analisados juntamente com os marcadores moleculares, sendo considerados positivos os valores ≥ 4ng/mL. Os índices *Kappa* demonstraram que as melhores concordâncias foram dadas pelas análises do gene PCA3 individualmente (0.49); quando pelo menos três dos cinco marcadores foram positivos (0.47); quando os genes AR e SRD5A2 ou PCA3, PSMA e KLK2 foram duplo ou triplo positivos comparado aos casos duplo ou triplo negativos para esses marcadores (0.64 e 0.52, respectivamente); quando pelo menos três dos cinco marcadores foram positivos incluindo os dados de PSA sérico ≥ 4ng/mL (0.59) e; quando o gene PCA3 foi positivo incluindo os dados de PSA sérico ≥ 4ng/mL (0.63).

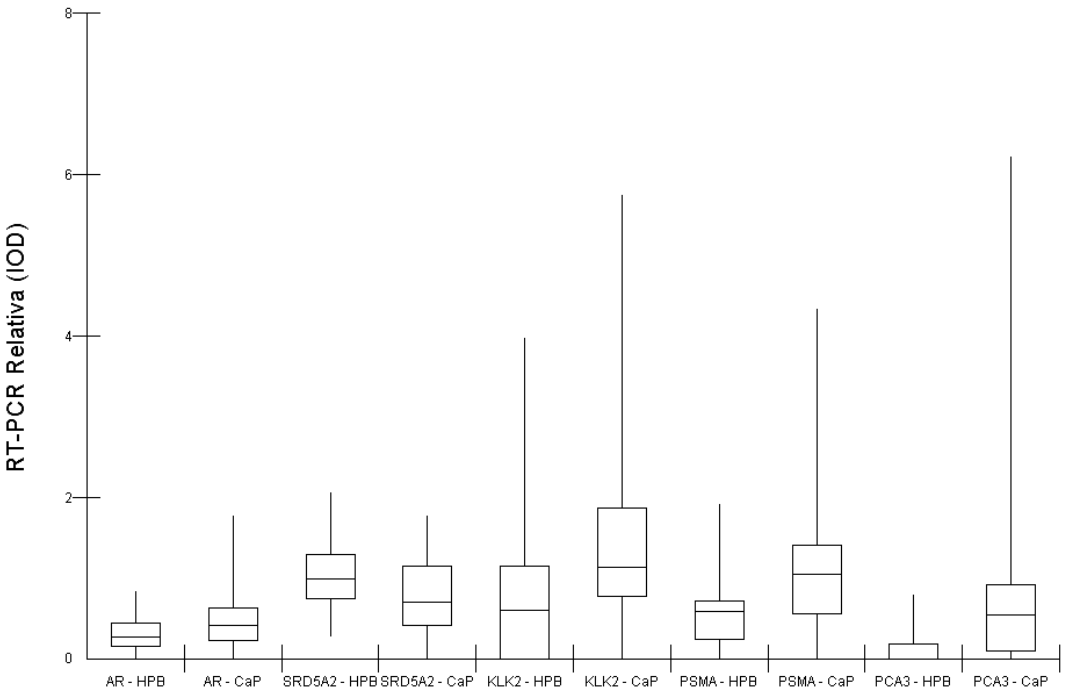


Figura 3. Box Plot das medianas e quartis para os níveis relativos de expressão dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos prostáticos de pacientes com hiperplasia benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP).

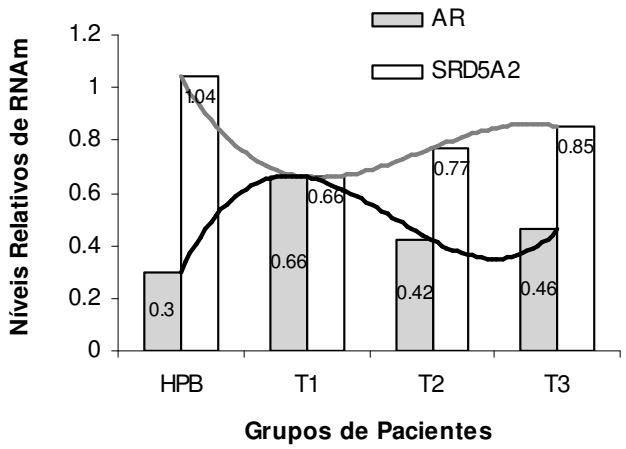


Figura 4. Níveis relativos de RNAm do gene AR e SRD5A2 de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata de acordo com a classificação TNM (pT1, pT2 e pT3). As médias para o grupo de HPB e para cada estádio do câncer foram descritas dentro das caixas.

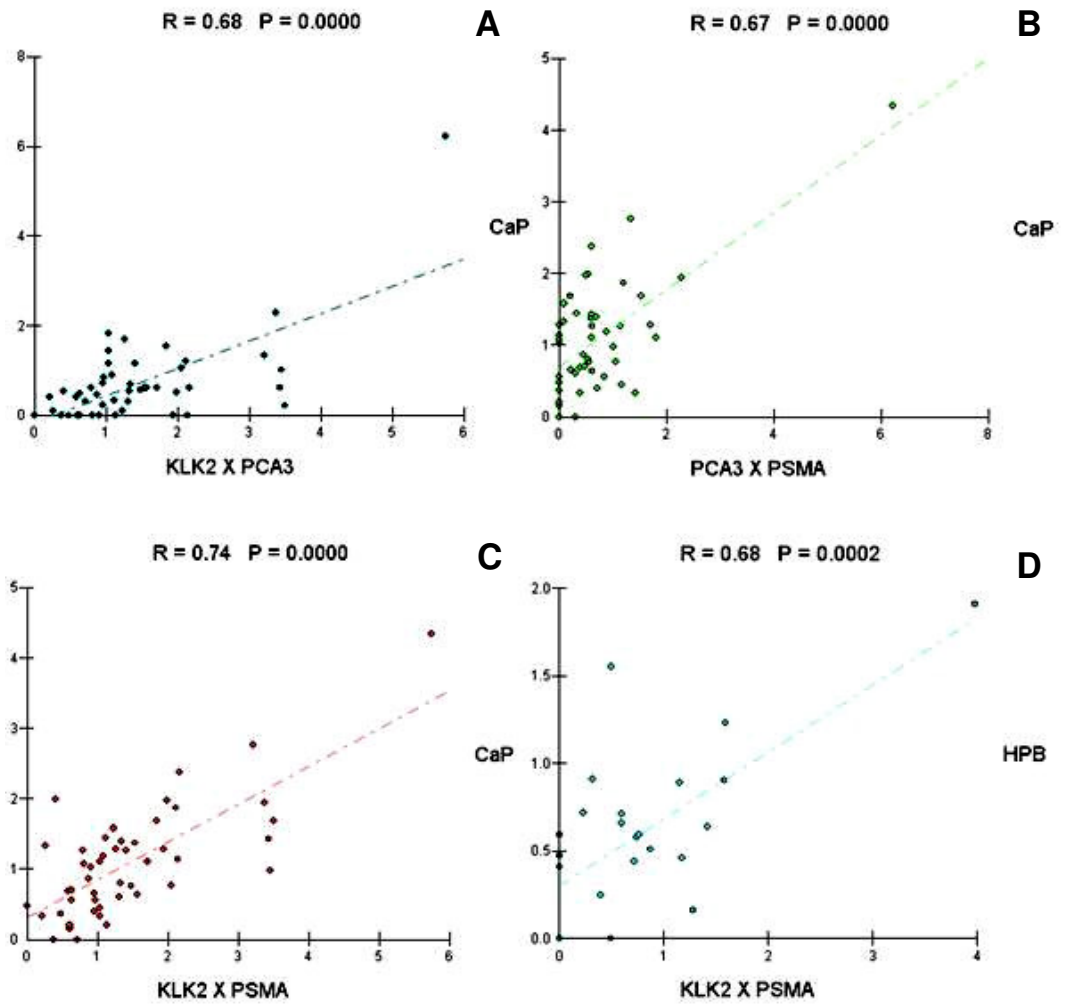


Figura 5. Representação gráfica para as correlações de Pearson positivas encontradas para as expressões dos biomarcadores KLK2, PSMA e PCA3 no câncer de próstata (CaP) e na hiperplasia prostática benigna (HPB). A– Correlação entre a expressão do gene KLK2 e PCA3 no câncer de próstata; nenhuma associação foi observada na HPB. B– Correlação entre a expressão do gene PCA3 e PSMA no câncer de próstata, nenhuma associação foi observada na HPB. C e D– Correlação entre a expressão do gene KLK2 e PSMA no câncer de próstata e na hiperplasia prostática benigna, respectivamente.

O aumento em cerca de nove vezes de ocorrência da doença quando pelo menos três dos cinco marcadores foram positivos demonstra que a maior contribuição em termos de aumento no *OR* foi dada pelo gene PCA3; o qual apresentou individualmente a maior chance de ocorrência da doença, com uma probabilidade oito vezes maior para o CaP do que os casos de doença benigna. Dentro do subgrupo contendo pelo menos três marcadores positivos para a combinação PCA3 positiva com outros dois marcadores positivos ou PCA3 negativo com outros três marcadores positivos, o *OR* obtido também foi de 9 vezes, revelando uma maior contribuição do gene PCA3 dentro desse subgrupo. A análise de pelos menos três marcadores positivos apresentou um *OR* significativamente maior quando o PSA sérico ≥ 4ng/mL foi incluído na análise, com uma probabilidade aumentada em 40 vezes comparado a 28 vezes para o grupo PCA3 positivo e PSA sérico positivo.

Outras combinações como duplo ou triplo positivos para os genes AR e SRD5A2 ou PCA3, KLK2 e PSMA também forneceram informações importantes, apresentando os pacientes uma probabilidade 20 vezes maior para o câncer de próstata comparado aos casos duplo ou triplo negativos para esses genes, com uma acurácia de 75 e 80%, respectivamente. Dos parêmetros diagnósticos realizados considerando todos os casos analisados (Tabela 6), o gene PCA3 individualmente foi o que apresentou as melhores sensibilidade e acurácia, sendo que a inclusão das medidas de PSA sérico melhorou a sensibilidade (de 76 para 92%), o valor preditivo positivo (de 85 para 94%), o valor preditivo negativo (de 60 para 62%) e a acurácia (de 74 para 78%).

Tabela 5: Cálculo de *Odds Ratio* para a RT-PCR semi-quantitativa dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos prostáticos, individualmente e em combinação.

Marcadores Moleculares	***RT-PCR Positiva***		***Odds Ratio (IC 95%)***	***Kappa P<0.05***
	Pacientes com Câncer No. (%)	***Pacientes com HPB No. (%)***		
AR	20/48 (42)	4/25 (16)	3.75 (1.11-12.62) *P= 0.0509*	0.26
SRD5A2	17/48 (35)	16/25 (64)	3.24 (1.18 – 8.87) *P= 0.004*	0.29
KLK2	29/48 (60)	7/25 (28)	3.92 (1.38 – 11.18) *P= 0.02*	0.32
PSMA	31/48 (65)	8/25 (32)	3.88 (1.39 – 10.83) *P= 0.02*	0.33
PCA3	35/48 (73)	6/25 (24)	8.53 (2.79 – 26.05) *P= 0.0002*	0.49
[1] PCA3 + PSMA + KLK2 + AR + SRD5A2	5/43 (10)	1/25 (4)	2.79 (0.31 – 25.30) *P= 0.618*	0.06
≥ 4 marcadores	20/48 (42)	2/25 (8)	8.21 (1.74 – 38.88) *P= 0.000*	0.34
≥ 3 marcadores	31/48 (65)	4/25 (16)	9.57 (2.82 – 32.49) *P= 0.0002*	0.47
[1] PCA3 + PSMA + KLK2	21/48 (44)	2/25 (8)	8.94 (1.89 – 42.28) *P= 0.004*	0.36
[2] PCA3 + PSMA + KLK2	21/27 (78)	2/14 (14)	21.00 (3.65 – 120.90) *P= 0.0004*	0.64
[1] AR + SRD5A2	10/48 (21)	1/25 (4)	6.32 (0.75 – 52.52) *P= 0.118*	0.17
[2] AR + SRD5A2	10/17 (59)	1/15 (7)	20.00 (2.11 – 189.18) *P= 0.006*	0.52
PCA3 e PSA sérico ≥ 4ng/mL	34/48 (71)	2/25 (8)	27.93 (5.79 – 134.98) *P= 0.000*	0.63
≥ 3 marcadores e PSA sérico ≥ 4ng/mL	30/48 (63)	1/24 (4)	40.00 (4.98 – 321.47) *P= 0.000*	0.59

[1]= versus todos os outros casos, [2]= versus somente casos negativos para os marcadores.

Tabela 6: Análise de parêmtros diagnósticos dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 em tecidos prostáticos benignos e malignos, individualmente e em combinação.

RT-PCR	***Teste Diagnóstico***				
Semi-quantitativa	***Sensibilidade***	***Especificidade***	***VPP***	***VPN***	***Acurácia***
AR	42%	84%	83%	43%	56%
SRD5A2	65%	64%	78%	48%	64%
KLK2	60%	72%	81%	49%	64%
PSMA	65%	68%	79%	50%	66%
PCA3	73%	76%	85%	60%	74%
*AR + SRD5A2	59%	93%	91%	67%	75%
*PCA3 + PSMA + KLK2	78%	86%	91%	67%	80%
≥ 3 marcadores	65%	84%	89%	55%	71%
PCA3 e PSA sérico ≥ 4ng/mL	71%	92%	94%	62%	78%
≥ 3 marcadores e PSA sérico ≥ 4ng/mL	63%	96%	97%	57%	74%

VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo; * = versus somente casos negativos para os marcadores

Discussão

A RT-PCR é um método rápido e eficiente para estimar os níveis de RNAm em diferentes amostras [31]. A transcrição reversa usando os *primers* hexanucleotídeos randômicos, como descrito por Santagati *et al.* (1997) [31] e Pernas-Alonso *et al.* (1999) [32], são mais efetivos para a síntese de cDNA, uma vez que a partir de uma única RT podem ser analisados diversos transcritos gênicos.

A RT-PCR relativa realizada para a análise de transcritos dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA, PCA3 e B2M mostrou-se bastante eficiente, uma vez que nenhuma competição prejudicial foi observada entre os vários *primers* utilizados nas três reações multiplex utilizadas nesse estudo. O uso da B2M como controle endógeno para a avaliação da expressão dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3 apresentou diversas vantagens. Primeiro, sua detecção após a RT e PCR indica o sucesso desses dois passos. Segundo, a quantidade de cDNA correspondente ao marcador endógeno é um indicador do grau de degradação e da pureza da amostra. Terceiro, o uso do controle interno compensa a variabilidade entre as técnicas de RT-PCR. Também é importante notar que os resultados da análise de Q-PCR (PCR quantitativa) absoluta tem validado os resultados da análise comparativa, indicando que o número de moléculas de um RNAm está diretamente associado com os dados relativos. Assim, a análise comparativa é um procedimento adequado e consistente para investigar os níveis de expressão e não é dependente dos níveis absolutos de expressão de um gene [33].

Pela representação gráfica por Box Plot, também utilizada em outros trabalhos de expressão gênica [34-36] foram evidenciadas as diferenças entre grupos HPB e CaP e as variações entre indivíduos para a expressão dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3. As variações inter individuais elevam os valores do desvio padrão cujo efeito foi minimizado pelo agrupamento dos indivíduos de acordo com suas semelhanças de expressão dadas pelos quartis e medianas. Por ser altamente específico para o câncer de próstata, o gene PCA3 foi o que melhor diferenciou os grupos de indivíduos com CaP daqueles com HPB.

No presente trabalho, a RT-PCR relativa mostrou diferenças significativas para os níveis de RNAm do AR e SRD5A2 entre os tecidos tumorais e não tumorais. A técnica de RT-PCR multiplex apresentou uma associação positiva com o aumento da expressão do AR no câncer de próstata e por outro lado, os maiores níveis de RNAm da SRD5A2 foram associados com a hiperplasia prostática benigna, sugerindo um importante e diferente papel dos hormônios esteróides sobre a tumorigênese.

Diversos mecanismos têm sido propostos para a expressão aumentada do gene AR, a qual pode contribuir para o processo hormônio independente das células do câncer de próstata, sendo considerada uma das causas de falhas do tratamento endócrino [37]. Linja *et al.* (2001) [38] sugerem que a amplificação do gene AR, com um conseqüente aumento em sua expressão, facilita o crescimento tumoral em baixas concentrações de andrógeno. Outros trabalhos têm demonstrado que a transição para o estado hormônio independente é acompanhado pelo dramático aumento no RNAm do AR e em sua proteína, sem a amplificação ou aparecimento de novas mutações no gene [15, 39]. Também tem sido sugerido que a perda de expressão do AR não é a razão para o crescimento independente do tumor prostático [40-42]. Estudos de imunohistoquímica têm demonstrado que as células do câncer de próstata mantêm a proteína AR em tumores dependentes e independentes de andrógenos [43-46]. O presente trabalho suporta a hipótese de níveis aumentados do RNAm do AR associada a ocorrência do câncer de próstata.

Quanto ao gene SRD5A2, pouco se sabe sobre o real papel das mutações e das ações dos medicamentos sobre os níveis da enzima 5α-redutase tipo II nas doenças da próstata [47]. As diferenças observadas nos níveis relativos do gene SRD5A2 corroboram estudos feitos por outros grupos de pesquisadores. Como demonstrado por Söderström *et al.* 2001 [48], o presente trabalho também suporta semelhante valor para os níveis de RNAm específico para a enzima na próstata e também demonstra uma considerável variação na expressão do gene SRD5A2 nos tecidos prostáticos entre os pacientes. Söderström *et al.* 2001 [48] e Luo *et al.* 2003 [7] demonstraram que a expressão dos RNAm específicos da enzima 5α-redutase tipo II em espécimes de câncer foram significativamente menores do que em tecidos com HPB. Söderström *et al.* 2001 [36] demonstraram que a regulação

da atividade da enzima 5α-redutase tipo II ocorre em nível transcricional e que o nível de expressão dessa enzima e dos fatores que a regulam podem ser de grande interesse para futura explicação sobre a etiologia do câncer de próstata. Em tumores prostáticos metastáticos, Habib e colaboradores (2003) [49] também observaram expressão do receptor de andrógeno e perda da expressão da 5α-redutase tipo II.

A diminuição dos níveis transcricionais do SRD5A2 e o aumento do AR no câncer podem estar implicados numa redução na transformação de testosterona em DHT, e consequentemente a baixa concentração da forma hormonalmente ativa e aumento intracelular da testosterona faz com que, a maquinaria celular produza maior quantidade da proteína receptora de andrógeno para saturar toda a DHT disponível, havendo consequentemente um aumento nos níveis de RNAm do AR. Ao contrário, conforme a doença progride a menor complexação AR-DHT faz com que os níveis transcricionais do AR retornem aos seus níveis basais.

Nos casos hormônio-independentes, vários genes estão associados com uma retomada no aumento de expressão. No caso do AR, o sinal intracelular pode estar associado ao aumento dos níveis de receptor de andrógeno para que novamente haja saturação das poucas moléculas de DHT convertidas a partir das menores quantidades de testosterona disponíveis. Em relação a SRD5A2, é sabido que os níveis de testosterona reduzem com a idade, assim como os índices de CaP aumentam com a idade. Com essa mudança, a maquinaria celular pode estar reconhecendo os níveis reduzidos de testosterona como um sinal para que, para redução de gastos energéticos, os níveis da enzima 5α-redutase também reduzam. Essa redução pode assim estar associada com a ocorrência do CaP. Dessa maneira, as diferentes associações entre a expressão do receptor de andrógeno e da 5α-redutase tipo II, ambos diretamente envolvidos na ação da testosterona, indica que esses genes são diferencialmente regulados na próstata, e consequentemente, altos níveis do AR ou reduzida expressão do gene SRD5A2 em tecidos prostáticos podem indicar a ocorrência do adenocarcinoma, e seus níveis de RNAm podem estar associados com a malignidade e o prognóstico dessa doença.

Quanto aos transcritos analisados simultaneamente para os genes KLK2, PSMA e PCA3 num formato de PCR multiplex, seus níveis aumentados também

haviam sido previamente observados por outros trabalhos [23, 24, 28, 50-57]. Para os transcritos do gene KLK2, Herrala *et al.* (2001) [50] e Meola *et al.* (2006) [51] demonstraram que os tecidos tumorais apresentam níveis maiores de expressão desse gene quando comparados a tecidos benignos, sugerindo uma regulação gênica positiva para o gene KLK2 associada com a ocorrência do câncer de próstata, corroborando os dados aqui apresentados. Ainda, a expressão desse gene parece aumentar progressivamente seguindo a ordem hiperplasia benigna, câncer de próstata primário e em metástase nos linfonodos, e, além disso, a expressão do KLK2 parece ser regulada no epitélio prostático, no adenocarcinoma e em metástases dos linfonodos independentemente do PSA [52]. Apesar de estarem muitos próximos entre si no cromossomo 19q13.3-13.4, de fazerem parte da família das calicreínas e serem regulados por andrógenos, os níveis do KLK2 não são paralelos aos do PSA, o que sugere que essa regulação diferencial possa ser uma promissora e complementar aplicação do KLK2 na distinção dos pacientes com câncer de próstata.

Para o gene PSMA, tem sido demonstrado que a sua expressão é baixa ou ausente em tecidos com hiperplasia benigna, enquanto em tecidos normais e malignos da glândula prostática, a expressão é alta [23, 24, 53, 54]. Os dados aqui apresentados também demonstraram associação positiva entre o câncer de próstata e maiores níveis de RNAm do gene PSMA e níveis menores na doença benigna, mas nenhuma informação pode ser adicionada quanto à expressão desse gene em tecidos normais. Também tem sido reportada uma associação positiva entre a expressão aumentada do RNAm do PSMA e um maior grau de Gleason [24, 53] o que sugere associação da expressão desse gene com a transformação maligna da próstata. Contudo nenhuma correlação com o grau de Gleason ou TNM foi encontrada no presente trabalho.

Além da localização no epitélio prostático, análises de imunohistoquímica têm revelado níveis detectáveis de PSMA em mucosa duodenal, túbulos renais proximais, na neovasculatura do câncer de cólon, bexiga e rim, mas não no câncer de próstata. Essa distribuição anatômica diversa implica em uma maior significância funcional dessa proteína em relação ao que se achava anteriormente [55]. Ainda, tem sido reportado que a expressão do gene PSMA aumenta com a redução nos níveis de testosterona, o que é confirmado pelo aumento da

expressão desse gene em doença hormônio-refratária [23, 24]. As análises de correlação demonstraram que os níveis de transcritos do gene PSMA foram associados positivamente com os níveis relativos dos genes PCA3 e KLK2, mas não com os transcritos do AR e SRD5A2 que são genes que participam diretamente da atuação da testosterona nas células prostáticas.

Para a expressão do gene PCA3 obtida pela RT-PCR multiplex convencional, a maior expressão para os tecidos com câncer de próstata comparada a tecidos com a HPB demonstra a sua aplicação como marcador da doença maligna e corrobora Kok *et al.* (2002) [56]. Ambos, o presente trabalho e Kok *et al.* (2002), demostram grandes diferenças de expressão do PCA3 no tecido contendo o câncer quando comparado à doença benigna. O seu potencial como marcador tumoral prostático-específico foi primeiramente descrito por Bussemarkers *et al.* (1999) [28], e desde então, os trabalhos sobre os níveis transcricionais do PCA3 só têm validado o seu uso para testes diagnósticos da doença maligna [57].

Os controles das expressões dos genes AR, SRD5A2, KLK2 e PSMA parecem ser regulados pela testosterona intra-prostática, contudo os mecanismos dessa regulação não estão completamente compreendidos. Os resultados de expressão para os genes PSMA, AR, SRD5A2 e KLK2 frente às análises de imunohistoquímica [46, 49, 52, 54] demonstram que os níveis desses genes permanecem alterados no câncer de próstata quando as proteínas, e não os RNAm, são o alvo do estudo. Esses dados sugerem que, provavelmente, após a expressão do RNAm, não existem mecanismos pós-transcricionais ou pós-traducionais decisivos na regulação dos produtos gênicos do KLK2, PSMA, AR e SRD5A2. Dessa maneira, pode ser sugerido que as diferenças de expressão encontradas quando se analisa as doenças benignas e malignas são provenientes de regulação gênica diferencial em nível transcricional, pelo recrutamento de co-ativadores ou co-repressores dos diferentes genes, os quais produzem efeitos de regulação positiva (KLK2, PSMA, AR) e negativa (SRD5A2) no câncer de próstata. Contudo, permanece a esclarecer o papel da regulação da expressão do gene PCA3, sendo que os níveis de RNAm são maiores no câncer de próstata, mas nenhuma proteína foi encontrada como sendo codificada por esse gene.

A literatura reportada demonstra um aumento de expressão dos genes AR, KLK2, PCA3 e PSMA e redução dos níveis do gene SRD5A2, corroborando com o presente trabalho, contudo tratam-se de testes individuais em que as análises foram realizadas de forma separada para cada um desses genes.

Os dados do presente trabalho demonstraram que os produtos gênicos do AR, SRD5A2, KLK2, PSMA e PCA3, participando da mesma via ou de modelos independentes de expressão, tem sua contribuição individual na distinção entre os grupos de pacientes com CaP daqueles com a HPB, sendo que quando pelo menos três dos cinco marcadores são positivos associados ao PSA sérico, a chance para o câncer de próstata aumenta em 40 vezes comparado aos casos benignos.

Ainda, a presença do marcador tumoral próstata específico PCA3, associado ao PSMA e KLK2, num formato único de RT-PCR em tecidos prostáticos, otimizando tempo e custo da reação, pode ser uma estratégia interessante para auxiliar no diagnóstico dos pacientes com câncer de próstata, apresentando os casos triplo-positivos para esses genes uma probabilidade 20 vezes maior para o CaP comparado aos casos triplo-negativos. Por outro lado, levando em consideração os testes diagnósticos, as análises combinadas demonstraram que a maior contribuição foi dada pelo gene PCA3, o qual avalidado juntamente com as dosagens de PSA sérico apresentaram uma probabilidade de CaP aumentada em 28 vezes em relação aos indivíduos com a HPB; bem maior do que aquela apresentada pela análise individual do gene PCA3, com 71% de sensibilidade e 92% de especificidade.

Por fim, esses dados podem sugerir que a análise múltipla de marcadores fornece informações importantes quanto à diferenciação dos casos de CaP frente aos caso de HPB, contudo de todos os marcadores analisados individualmente a presença de transcritos do gene PCA3 foi o teste que apresentou melhor associação à doença maligna demonstrando que sua análise juntamente às medidas de PSA sérico pode ser uma ferramenta útil na prática clínica para a investigação dos casos de câncer de próstata.

Referências Bibliográficas

1. Benten WPM, Becker A, Schmitt-Wrede HP, Wunderlich F. Developmental regulation of intracellular and surface androgen receptors in T cells. *Steroids*. 2002;67:925-931.

2. Griffiths K, Morton MS. Aspects of the cell biology of prostate cancer. In: Kaisary AV, Murphy GP, Denis L, eds. *Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment*. London, Martin Dunitz Ltd, 1999:51-74.

3. Hiipakka RA, Liao S. Molecular mechanism of androgen action. *TEM*. 1998;9:317-324.

4. Piccioni F, Simeoni S, Andriola I, et al. A polyglutamina tract expansion of the androgen receptor in a motoneuronal model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain Res Bull*. 2001;56:215-220.

5. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, et al. Association of mis-sense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet.* 1999;354:975-978.

6. Li Z, Habuchi T, Mitsumori K, Kamoto T, et al. Association of V89L SRD5A2 polymorphism with prostate cancer development in a Japanese population. *J Urology*. 2003;69:2378-81.

7. Luo J, Dunn TA, Ewing CM, et al. Decreased gene expression of steroid 5-alpha reductase 2 in human prostate cancer: Implications for finasteride therapy of prostate carcinoma. *Prostate.* 2003;57: 134-139.

8. Császár A, Ábel T. Receptor polymorphisms and diseases. *Eur J Pharmacol* . 2001;414:9-22.

9. Brinkmann AO, Jenster G, Kuiper GG, et al. The human androgen receptor: structure/function relationship in normal and pathological situations. J Steroid *Biochem Mol Biol*. 1992;41:361-368.

10. Hong H, Kohli K, Trivedi A, et al. GRP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:4948-4952.

11. Ikonen T, Palvimo JJ, Jänne O. Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem.* 1997;272:29821-29828.

12. Froesh BA, Takayana S, Reed JC. BAG-1L protein enhancer androgen receptor function. *J Biol Chem.* 1998;273:11660-11666.

13. Yeh S, Miyamoto H, Shima H, Chang C. From estrogen to androgen receptor: a new pathway for sex hormones in prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:5527-5532.

14. Fujimoto N, Mizokami A, Harada S, Matsumoto T. Different expression of androgen receptor coactivators in human prostate. *Urology.* 2001;58:289-294.

15. Brinkmann AO, Jenster G, Ris-Stalpers C, et al. Androgen receptor mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol* . 1995;53:443-448.

16. Wolf DA, Herzinger T, Hermeking H, et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol.* 1993;7:924-936.

17. Le Dai J, Maiorino CA, Gkonos PJ. Androgenic up-regulation of androgen receptor cDNA expression in androgen-independent prostate cancer cells. *Steroids*. 1996;61:531-539.

18. Sun Z, Pan J, Balk SP. Androgen receptor-associated protein complex binds upstream of the androgen responsive elements in the promoters of human prostate-specific antigen and kallikrein 2 genes. *Nucl Acids Res*. 1997;25:3318-3325.

19. Yousef GM, Chang A, Scorilas A, Diamands EP. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;16:125-133.

20. Frenette G, Tremblay RR, Lazure C, Dube JY. Prostatic kallikrein hK2, but not prostate-specific antigen (hK3), activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Int J Cancer.* 1997;71:897-899.

21. Takayama TK, Fujikawa K, Davie EW. Characterization of the precursor of prostate-specific antigen: activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J Biol Chem*. 1997;272:21582-21588.

22. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate-specific antigen. *Invest Urol*. 1979;17:159-163.

23. Israeli RS, Powell CT, Corr JG, et al. Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* 1994;54:1807-1811.

24. Kawakami M, Nakayama J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer Res.* 1997;57:2321-2324.

25. O'Keefe DS, Su SL, Bacich DJ, et al. Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. *Biochem Biophys Acta*. 1998;1443:113-127.

26. Laidler P, Dulínska J, Lekka M, Lekki J. Expression of prostate specific membrane antigen in androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. *Arch Bioch Biophys*. 2005;435-1-14.

27. Llanes L, Ferruelo A, Pàez A, et al. The clinical utility of the prostate specific membrane antigen reverse-transcription/polymerase chain reaction to detect circulating prostate cells, an analysis in healthy men and women. *Int J Urology*. 2002;89:882-885.

28. Bussemakers MJ, Bokhoven A, van Verhaegh GW, et al. DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999;59:5975-5979.

29. INCA (Instituto Nacional do Câncer): Câncer de Próstata, Rio de Janeiro 2006: http:/www.inca.org.br/cancer/tipos/prostata.

30. Riegman PHJ, Vlietstra RJ, Suurmeijer L, et al. Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics*. 1991;14:6-11.

31. Santagati S, Garnier M, Carlo P, et al. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)- based methods. *Brain Res Protoc.* 1997;1:217-223.

32. Pernas-Alonso R, Morelli F, di Porzio U, Perrone-Pcaano C. Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. *Brain Res Protoc.* 1999;4:395-406.

33. Rose'Meyer RB, Mellick AS, Garnham BG, et al. The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. *Brain Res Protoc*. 2003;11:9-18.

34. Patel K, Whelan PJ, Prescott S, et al. The use of real-time reverse transcription-PCR for prostate-specific antigen mRNA to discriminate between blood samples from healthy volunteers and from patients with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 7511-7519.

35. Ylikoski A, Karp M, Pettersson K, et al. Simultaneous quantification of human glandular kallikrein 2 and prostate-specific antigen mRNAs in peripheral blood from prostate cancer patients. *J Mol Diag.* 2001;3: 111-122.

36. Ylikoski A, Pettersson K, Nurmi J, et al. Simultaneous quantification of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 mRNA in blood samples from patients with prostate cancer and benign disease. *Clin Chem* 2002;48: 1265–1271.

37. Latil A, Biecher I, Vidaud D, et al. Evaluation of androgen, estrogen (ER alpha and ER beta) and progesterone receptor expression human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res.* 2001;61:1919-1926.

38. Linja M, Savinainen K, Saramaki O, et al. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* . 2001;61:3550-3555.

39. Wallen MJ, Linja M, Kaartinen K, et al. Androgen receptor gene mutations in hormone-refractory prostate cancer. *Am J Pathol*. 1999;189:559-563.

40. Joly-Pharaboz MO, Soave MC, Nicolas B, et al. Androgens inhibit the proliferation of a variant of the human prostate cancer cell line LNPCa. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;55:67-76.

41. Evans BA, Harper ME, Daniells CE, et al. Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis. *Prostate.* 1996;28:162-171.

42. Kokontis JM, Hay N, Liao S. Progression of LNPCa prostate tumor cells during androgen deprivation: hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen and role for $p27^{Kip1}$ in androgen-induced cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* . 1998;12:941-953.

43. Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, et al. Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer Res.* 1995;55:3068-3072.

44. Klocker H, Neuschmid-Kaspar F, Culig Z, et al. Androgen receptor alterations in patients with disturbances in male sexual development and in prostatic carcinoma. *Urology Int.* 1995;54:2-5.

45. Culig Z, Hobisch A, Hittmair A, et al. Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. *Prostate*. 1998;35:63-70.

46. Culig Z, Hobisch A, Bartsch G, Klocker H. Androgen receptor an update of mechanisms of action in prostate cancer. *Urology Res*. 2000;28:211-219.

47. Giwercman YL, Abrahamsson PA, Giwercman A, et al. The 5α-reductase type II A49T and V89L high-activity allelic variants are more common in men with prostate cancer compared with the general population. *Eur Urol.* 2005;48:679–685.

48. Söderström TG, Bjelfman C, Brekkan E, et al. Messenger ribonucleic acid levels of steroid 5α-reductase 2 in human prostate predict the enzyme activity. *J Clin End Met.* 2001;2:855-858.

49. Habib FK, Ross M, Bayne CW, et al. The loss of 5α-reductase type I and type II mRNA expression in metastatic prostate cancer to bone and lymph node metastasis. *Clin Cancer Res*. 2003;9:1815–1819.

50. Herrala AM, Porvari KS, Kyllönen AP, Vihko PT. Comparison of human prostate specific glandular kallikrein 2 and prostate-specific antigen gene expression in prostate with gene

amplification and overexpression of prostate specific glandular kallikrein 2 in tumor tissue. *Cancer* . 2001;92:2975-2984.

51. Meola J, Goulart LR, Oliveira JDD, et al. Differential expression of the KLK2 and KLK3 genes in peripheral blood and tissues of patients with prostate cancer. *Gen Mol Biol*. 2006;29: 193-199.

52. Darson MF, Pacelli A, Roche P, et al. Human glandular kallikrein 2 expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology.* 1999;53:939-944.

53. Wright GL, Haley C, Beckett ML, Schellhammer PF. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urology Oncol.* 1995;1:18-28.

54. Sweat SD, Pacelli A, Murphy GP, Bostwick DG. Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology.* 1998;52:637-640.

55. Silver DA, Pellicer I, Fair WR, et al. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res*. 1997;3:81-85.

56. KoK JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, et al. DD3PCA3, a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 2002;62: 2695–2698.

57. Hessels D, Verhaegh GW, Schalken JA, Witjes JA. Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004;4: 513-526.

CAPÍTULO II:

Análise combinada dos transcritos KLK2, KLK3, PCA3 e PSMA no sangue periférico de pacientes com câncer de próstata e sua aplicação diagnóstica

[2]

[2] ***FORMATO DE SUBMISSÃO PARA JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY***

Abstract

Purpose: Prostate cancer (PCa) is the most commonly diagnosed malignancy in men, and it consists of multifactorial and multifocal events. Due to the complexity of the disease process, which includes genome alterations, local invasion, micrometastatic cell extravasations to circulation, invasion of secondary organ tissues, and resistance to hormonal blockage, many markers must be used to represent the multiple and variable events that lead to cancer development. The low specificity of the unique serum marker for prostate cancer diagnostics, PSA, has leaded us to investigate four potential markers in the peripheral blood of patients by detecting their mRNA levels and associating them to clinical parameters. *Methods*: The expression levels of the KLK2, KLK3, PCA3 and PSMA transcripts were determined by Nested RT-PCR. Patients with PCa (99) and with benign prostatic hyperplasia (BPH, 36), and healthy volunteers (104) were investigated. *Results*: Significant differences for the RNA relative levels have been found for the KLK2, PCA3 and PSMA transcripts between PCa and BPH patients or healthy volunteers. The KLK2 and PSMA levels also presented a positive association ($P<0.05$) with extra-prostatic disease (pT3). The combined positive RT-PCR Nested for the KLK2, PCA3, PSMA genes with serum PSA higher than 4ng/mL presented a 10-fold higher chance of cancer occurrence than healthy controls, with sensitivity, specificity and positive predictive value of 57%, 89% and 93%, respectively. *Conclusions*: The combined analysis of KLK2, PCA3 and PSMA transcripts may become a useful tool for the discrimination of PCa patients from those with benign disease or healthy individuals. Additionally, the KLK2 and PSMA transcripts may also be used as prognostic markers for the presence of extra-capsular disease and assisting in the prediction of the post-operative outcome.

Key words: RT-PCR, gene expression, prostate cancer, molecular markers, peripheral blood.

Resumo

O câncer de próstata (CaP) e o mais comumente diagnosticado na população masculina e consiste de eventos multifatoriais e multifocais. Devido a complexidade da doença, a qual inclui alterações genômicas, invasão local, liberação de células micrometastáticas para a circulação, invasão secundaria de tecidos de outros órgãos, e resistência ao bloqueio hormonal, muitos marcadores podem ser usados para representar os eventos múltiplos e variáveis que levam ao desenvolvimento do câncer. A baixa especificidade do único marcador para diagnostico do câncer de próstata, PSA, tem nos levado a investigar quatro potenciais marcadores no sangue periférico de pacientes pela detecção de seus níveis de RNAm e associá-los a parâmetros clínicos. Os níveis de expressão dos transcritos do KLK2, KLK3, PCA3 e PSMA foram avaliados pela RT-PCR *Nested*, em pacientes com CaP (99), com hiperplasia prostática benigna (HPB, 36) e voluntários saudáveis (104). Diferenças significativas foram encontradas para a expressão dos genes KLK2, PSMA e PCA3 entre os pacientes com CaP e os pacientes com HPB ou voluntários saudáveis. Os níveis do KLK2 e PSMA também apresentaram associação positiva ($P<0.05$) com doença extra-prostática (pT3). A RT-PCR *Nested* positiva combinada para os genes KLK2, PCA3 e PSMA com PSA sérico maior que 4ng/mL apresentou uma chance 10 vezes maior de ocorrência do câncer comparado aos controles saudáveis, com sensibilidade, especificidade e acurácia de 57%, 89% e 93%, respectivamente. A análise combinada dos genes KLK2, PCA3 e PSMA pode ser uma ferramenta útil na distinção de pacientes com CaP daqueles com doença benigna ou de indivíduos saudáveis. Ainda, a analise dos transcritos KLK2 e PSMA podem ser usados como marcadores prognósticos para a presença de doença extra-capsular e auxiliando na predição de recidiva da doença no pós-operatório.

Palavras-chave: RT-PCR, expressão gênica, câncer de próstata, marcadores moleculares, sangue periférico.

Introdução

O câncer de próstata (CaP) é o mais comumente diagnosticado na população masculina após o câncer de pele não melanoma e a segunda causa de morte após câncer de pulmão.[1-3] A sua incidência aumenta com a idade mais do que qualquer outro tipo de câncer e o número de casos novos diagnosticados continua subindo com o aumento da expectativa de vida da população em geral.[3,4] A cura do câncer de próstata é limitada àqueles pacientes com a doença confinada ao órgão e local, o que não ocorre quando a doença se torna disseminada (metástase). Assim, os esforços para descobrir novos marcadores diagnósticos para pacientes com essa patologia são cada vez maiores.[5]

Desde a introdução da avaliação do PSA sérico nas populações assintomáticas, a incidência do câncer de próstata tem aumentado dramaticamente, assim como o número de homens submetidos à prostatectomia radical e a radioterapia. Contudo, os falso-positivos para o PSA continuam a ser um problema significativo, resultando em biópsias desnecessárias, e o valor do PSA na predição da cura cirúrgica tem sido colocado em questão. Outro problema é que cerca de 20-30% dos homens com câncer de próstata apresentam PSA sérico dentro dos níveis normais, resultando em doença não diagnosticada.[6]

Mais de 90% dos pacientes diagnosticados com câncer de próstata apresentam doença clinicamente localizada, e muitos desses são submetidos à prostatectomia radical com intuito curativo.[7,8] Em proporção, cerca de 25% a 50% desses pacientes com doença localizada apresentam recorrência na primeira década após a cirurgia radical.[7-11]

Essas recorrências podem ser atribuídas a falhas no tratamento ou presença de células do câncer de próstata localmente invasivas com capacidade de micrometástase à distância ou células residuais cancerígenas, as quais não foram detectadas pelas modalidades convencionais de estadiamento (toque retal, níveis de PSA sérico, biópsias guiadas por ultrassonografia transretal – USTR, cintilografia óssea, tomografia computadorizada ou imagem de ressonância magnética).[7,8,11,12] Além disso, o número de células micrometastáticas circulantes pode ser muito pequeno e de difícil detecção pelos exames de rotina e a presença dessas células circulantes não causa necessariamente o desenvolvimento de

doença metastática clinicamente significativa.[12] Contudo, a ineficiência metastática não é total e as metástases estão entre as maiores causas de morte em pacientes com câncer.[13] O câncer de próstata seguido de recorrência está frequentemente associado com metástases ósseas à distância, comprometendo a qualidade de vida e de sobrevivência dos pacientes.[8,12]

A tecnologia molecular têm fornecido meios para identificar os rearranjos cromossômicos presentes em células hematopoiéticas malignas os quais podem ser usados para evidenciar a presença de doença residual mínima.[14] Nos últimos anos, a técnica de PCR tem facilitado significativamente a detecção de doença residual mínima em diversos tipos de câncer, mostrando-se superior às técnicas convencionais e permitindo a detecção de células tumorais circulantes tanto em neoplasias hematopoiéticas quanto em tumores sólidos.[13] No câncer de próstata, vários estudos têm utilizado a análise da expressão de genes como o KLK3, PSMA e KLK2, por RT-PCR qualitativa ou quantitativa, com intuito de tentar estabelecer associações entre a presença de seus RNAm com a ocorrência do câncer de próstata, recidiva da doença e/ou seu potencial metastático.[7,9,12,13,15,16]

Uma extensa variedade de pesquisas tem demonstrado que permanece difícil discriminar entre pacientes com doenças confinadas ao órgão daqueles com doença extra-prostática no pré-operatório. Assim, numerosos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de métodos moleculares capazes de detectar células tumorais que se disseminam no sangue periférico e para a medula óssea a partir de tumores sólidos, tentando correlacionar a detecção ao diagnóstico, valor prognóstico e monitoramento clínico.[8,11,12]

O objetivo desse trabalho foi realizar a análise combinada para os RNAm dos genes KLK2, PCA3, PSMA e KLK3 no sangue periférico de pacientes com câncer de próstata, submetidos à prostatectomia radical, em pacientes com hiperplasia benigna e em voluntários saudáveis afim de verificar a associação de detecção destes marcadores com a ocorrência e a progressão da doença maligna.

Materiais e Métodos

Casuística e obtenção da amostras

a) Triagem dos pacientes

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e pela equipe de urologia do Hospital de Clínicas da referida instituição, mediante aprovação do comitê de ética em Pesquisa sob o número de parecer 005/2001. Para a realização da análise molecular associada aos dados clínicos e patológicos, foram coletadas amostras de sangue periférico mediante assinatura de um termo de consentimento. A coleta das amostras foi realizada de janeiro/2001 a julho/2006, pelos médicos e residentes da disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina (FAMED) da UFU.

A triagem para obtenção dos grupos de estudo, estabelecida pela equipe urológica, foi iniciada para os pacientes com mais de 50 anos, sem história familiar do câncer de próstata, e a partir dos 40 anos, nos casos de história familiar ou em pacientes de raça negra, incluindo a avaliação de sintomas do trato urinário inferior, que freqüentemente estão relacionados à presença da HPB, do exame digital e das dosagens bioquímicas do PSA no sangue periférico.

b) Dosagem do PSA

As amostras de sangue foram coletadas em quatro tubos tipo *vacutainer*™ contendo K_2EDTA 7,2 mg. Após a coleta, dois tubos de sangue periférico foram enviados ao Laboratório de Genética Molecular, INGEB/UFU, para a extração imediata do RNA total. Os outros dois tubos de sangue de cada paciente foram encaminhados para o laboratório de análises clínicas do HC da UFU onde se utilizou o kit de dosagem quantitativo do PSA IMMULITE, de acordo com as instruções do fabricante, com valor normal entre 0 e 4,0 ng/mL.

c) Pacientes analisados e coleta das amostras

As amostras de sangue periférico foram obtidas de 239 indivíduos. Trinta e seis apresentavam hiperplasia prostática benigna, 99 adenocarcinoma prostático e 104 foram voluntários saudáveis. Para os pacientes com câncer de próstata

(idade média de 67 ± 8, variação de 40 a 87 anos) e hiperplasia benigna (idade média de 69 ± 10, variação de 47 a 87 anos), os dados médios para os níveis do PSA sérico foram de 14.2 (±15.7, variando de 2 a 92.9) e 10.2 (±12.5, variando de 1.1 a 66.0), respectivamente. A média de idade para os voluntários saudáveis foi de 23 (± 4) anos, variando de 13 a 30 anos.

Extração do RNA total

O RNA total foi extraído em duplicata das amostras de sangue periférico de pacientes com HPB, CaP e controle saudável, usando os procedimentos descritos por Chomczynski e Sacchi (1987)[17] com modificações.

A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose e por leituras espectro fotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,5 %, 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 vídeo documentação *ImageSystem* – VDS, Pharmacia Biosciences).

Transcrição Reversa, síntese de cDNA e qualificação da reação

Dois microgramas de RNA total do sangue periférico foram transcritos reversamente a 37°C por 1 hora em 20 µl de solução contendo 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Biosciences), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. Reações controle foram realizadas para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. Os produtos de transcrição do gene constitutivo B2M (beta 2-microglobulina) foram usados como controles da transcrição reversa e da integridade do RNA.

Para amplificação dos transcritos do gene B2M, dois microlitros de cDNA foram misturados aos reagentes da PCR contendo: 1.0 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 200

μM dNTPs, 5.0 pmoles de cada *primers* B2M, completado para um volume final de 20 μl. Os *primers* utilizados foram os descritos por Bussemakers *et al.* 1999.[18]

As condições de reação foram: 95°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 40 s, 59°C por 40 s, 72°C por 50 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min.

A seguir estão descritas separadamente as condições de reação e de amplificação para os genes PCA3, KLK2, KLK3 e PSMA. As seqüências dos oligonucleotídeos de cada gene usadas nas reações estão descritas na Tabela 1. Os *primers* utilizados para a amplificação dos genes KLK2, KLK3, PCA3 e PSMA foram desenhados pelo programa *Primer* versão 2.0.

PCR Nested para análise dos transcritos do gene PCA3

A primeira reação (PCR externa) foi realizada com 3 μl de cDNA em 20 μl de uma mistura de reação contendo: 1.0 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 10.0 pmoles de cada *primer* específico para o PCA3. As condições de reação foram: 95°C por 3 min, 30 ciclos a 94°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 40 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min. A segunda reação (PCR *Nested*) foi feita contendo os mesmos reagentes, nas mesmas concentrações. Contudo, foram utilizados 5μl do produto da PCR externa, e adicionado 1.5 X PCR *Enhancer System* (Invitrogen). O programa para a amplificação foi: 95°C por 3 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 62°C por 30 s, 72°C por 40 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 min.

PCR Nested para análise dos transcritos do gene KLK2

A PCR externa para o gene KLK2 foi feita nas seguintes condições: 2 μl de cDNA, 1.0 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs e 3.0 pmoles de cada *primer* para o gene KLK2. A reação foi completada para um volume final de 25 μl. O programa de PCR consistiu de: 95°C por 3 min, 24 ciclos a 95°C por 30 s, 62°C por 40 s, 72°C por 40 s, e uma extensão final a 72°C por 5 min. Para a segunda reação,

foram utilizados os mesmos reagentes nas mesmas concentrações, com exceção dos *primers*. Foram utilizados 3 pmoles para o *primer* reverso e 8 pmoles para o *primer* direto. As condições do programa de PCR também foram as mesmas, havendo, contudo uma redução para 20 ciclos.

PCR Nested para análise dos transcritos dos genes KLK3 e PSMA

Na primeira reação, 3 µl de cDNA foram adicionados a uma mistura contendo: 1.0 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs e 7.0 pmoles de cada *primer* direto e reverso específico para cada gene. A reação *Nested* foi feita contendo os mesmos reagentes, nas mesmas concentrações da primeira reação, contudo foram adicionados 3 e 5 µl do produto da primeira reação, para o gene PSMA e KLK3, respectivamente. O volume final das reações foi de 20 µl. As primeiras reações e *Nested* foram amplificadas nas seguintes condições: 95°C por 4 min, 28 ciclos a 94°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 40 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 2 min.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR internas e externas (*Nested*) para amplificar os RNAm dos genes PCA3, KLK2, KLK3 e PSMA.

Gene	***Primer Outer 5'-3 '*** ***(direto e reverso)***	***Primer Nested 5'-3'*** ***(direto e reverso)***
PCA3	AGATTTGTGTGGCTGCAGC	CCGAGGGAGACCAGGAAGAT
	TCCTGCCCATCCTTTAAGG	ATCGATGACCCAAGATGGCG
KLK2	CAGCATCGAACCAGAGGAGT	AGTTCTTGCGCCCCAGGAGT
	ACTAGAGGTAGGGGTGGGAC	ACTAGAGGTAGGGGTGGGAC
PSA	AACCAGAGGAGTTCTTGACC	GTGTGTGGACCTCCATGTTA
	AATAGGGGGTTGATAGGGGTGCT	GTGATACCTTGAAGCACACC
PSMA	GAATGCCAGAGGGCGATCTA	AGGGGCCAAAGGAGTCATTC
	GCCACCCATTTTTTCTAGGA	CTCTGCAATTCCACGCCTAT

Análise das reações RT-PCR

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2.0%, corados com 0.5 μg/ml de brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. As imagens do gel foram capturadas pelo aparelho *Image Master*™ VDS *Software,* version 2.0 (Amersham Biosciences).

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa BioEstat, versão 3.0. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para as comparações da expressão qualitativa dos genes KLK2, KLK3, PSMA e PCA3 entre os grupos de pacientes com CaP, HPB e voluntários saudáveis. As análises de correlação de Pearson foram realizadas entre todos os parâmetros clínicos e laboratoriais: dados qualitativos para a expressão dos genes KLK2, KLK3, PSMA e PCA3, idade do pacientes no diagnóstico, níveis do PSA sérico, sistema de estadiamento TNM e grau de Gleason. Os resultados positivos e negativos combinados para os genes KLK2, PSA, PSMA e PCA3 foram estratificados entre os graus de Gleason < ou ≥ 7.0 e para os níveis de PSA sérico < ou ≥ 10 ng/mL, de acordo com Mitsiades *et al.* (2004).[8] O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar a significância entre a associação do estadiamento molecular e as variáveis clínicas e patológicas (PSA sérico, grau de Gleason e sistema TNM), de acordo com Kurek *et al.* (2004).[11] Foram calculados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e a chance de ocorrência da doença (*Odds Ratio*). Foram considerados significativos os resultados com valores de $P < 0.05$.

Resultados

A Figura 1 representa os resultados qualitativos para a reação de RT-PCR *Nested* obtida para os genes B2M (constitutivo), PCA3, PSMA, KLK3 e KLK2. As análises de expressão feitas pela RT-PCR *Nested* qualitativa para os genes PCA3, KLK2 e PSMA foram significativamente diferentes entre os grupos CaP versus HPB ($P< 0.05$) e CaP versus voluntários saudáveis ($P< 0.05$) (Figura 2). Nenhuma diferença foi encontrada para a freqüência dos genes PCA3, KLK2 e PSMA entre os grupos HPB versus voluntários saudáveis. Similarmente, não foram encontrados resultados significativos para a freqüência do gene KLK3 entre os grupos CaP, HPB e voluntários saudáveis analisados ($P> 0.05$). Para os grupos de pacientes com câncer de próstata, hiperplasia benigna e voluntários saudáveis, as análises de RT-PCR *Nested* forneceram respectivamente as seguintes porcentagens de positividade: 29%, 3% e 6% para o gene PCA3, 58%, 26% e 36% para o gene KLK2, 38%, 21% e 36% para o gene KLK3 e, para o gene PSMA 58%, 38% e 20%, respectivamente. Na Figura 2 estão representadas as freqüências das reações positivas na RT-PCR para os genes KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA dentro dos grupos analisados, mostrando que os genes KLK2, PCA3 e PSMA apresentam maior positividade no câncer comparado aos voluntários saudáveis ou a HPB.

As características clínicas e patológicas dos pacientes com CaP submetidos à prostatectomia radical apresentaram algumas associações com a RT-PCR positiva para o KLK2, PCA3 e PSMA nas amostras coletadas do sangue periférico (Tabela 2). A RT-PCR positiva para o KLK2, KLK3 e PSMA foi associada com os estadios avançados do câncer de próstata (pT3-pT4, $P= 0.005$, $P= 0.017$ e $P= 0.048$, respectivamente), sendo que os transcritos dos genes KLK2 e PSMA também foram associados com estadio T2c comparado aos T1-T2b ($P= 0.000$ e $P= 0.002$, respectivamente). Ao contrário, a RT-PCR para o gene PCA3 não mostrou diferenças entre os estádios ($P > 0.05$). Ambos, PCA3 e PSMA foram inversamente correlacionados com os graus de Gleason 5-6 ($P= 0.004$, $P= 0.005$, respectivamente). O grau de Gleason e o TNM apresentaram associação positiva ($R = 0.47$, $P = 0.000$, *Pearson*).

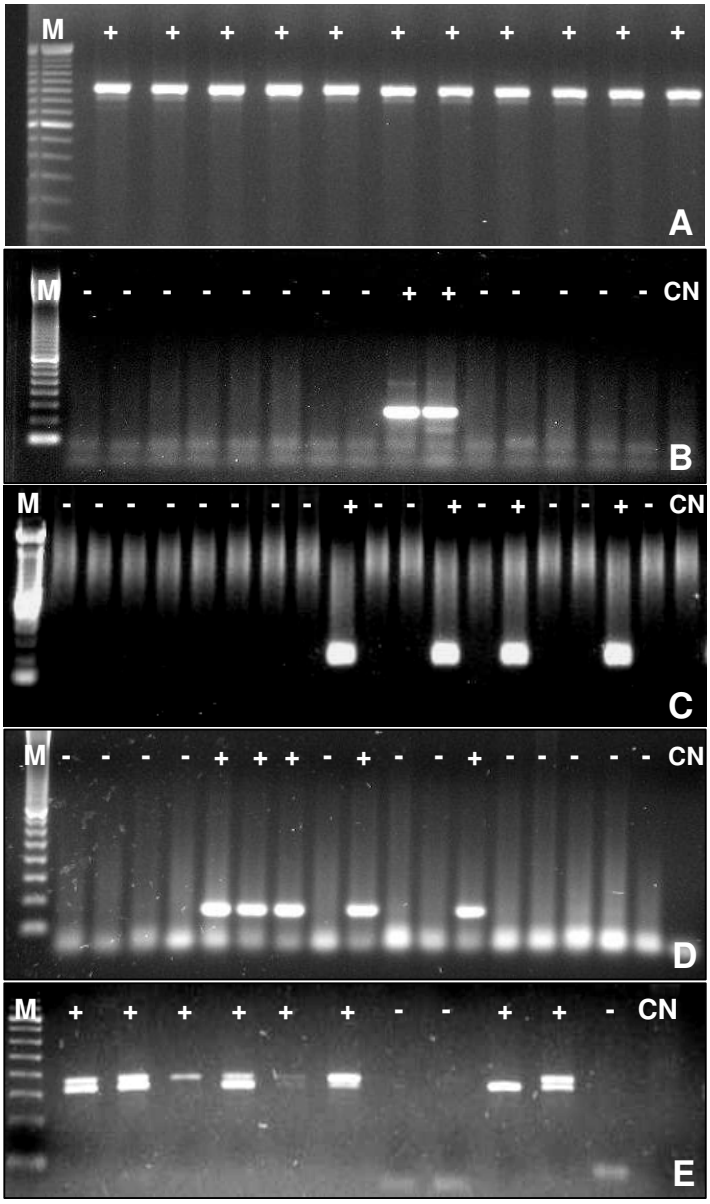


Figura 1. Representação da RT-PCR *Nested* qualitativa dos genes PCA3, PSMA, KLK3 e KLK2 realizado no sangue periférico de voluntários saudáveis, pacientes com hiperplasia benigna e com câncer de próstata. Nas figuras A, B, C, D e E foram marcados como positivos os pacientes que apresentaram os transcritos dos genes B2M, PCA3, PSMA, KLK3 e KLK2, respectivamente e como negativos aqueles em que os transcritos desses genes não foram encontrados. M – marcador de peso molecular de 100 pb. CN – controle negativo de reação de PCR.

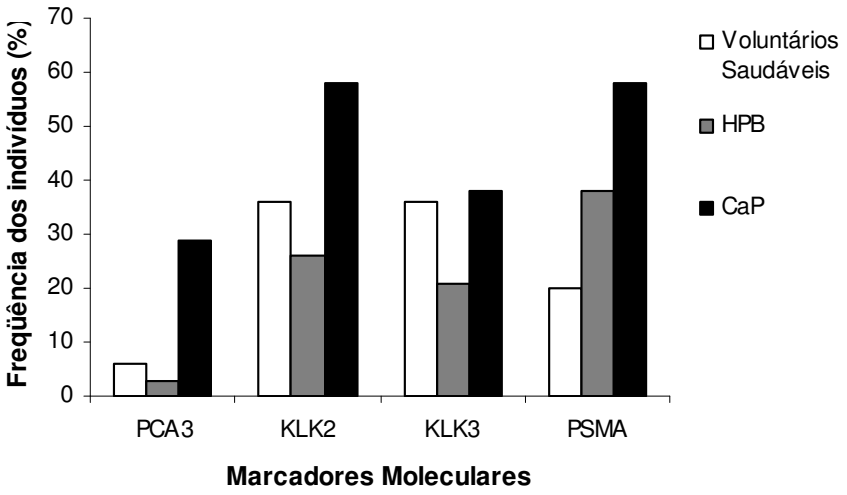


Figura 2. Freqüência dos marcadores KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA no sangue periférico de voluntários saudáveis, pacientes com hiperplasia benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP), realizada pela RT-PCR *Nested.*

Na Tabela 3 foram descritas as freqüências de casos positivos para cada gene, individualmente e em combinação, para os grupos de pacientes com CaP e controles saudáveis, dado pela RT-PCR *Nested*. Para o cálculo das freqüências, os voluntários saudáveis e pacientes com HPB foram considerados controles negativos da doença, por não apresentarem diferenças significativas na freqüência dos transcritos do KLK2, PCA3, PSMA e KLK3. Os marcadores que apresentaram maior freqüência de positividade combinada foram KLK2 e PSMA nos casos de CaP (39%) e KLK3 e PSMA nos casos negativos da doença (19%) e de negatividade combinada foram PCA3 e KLK3 nos casos de CaP (42%) e PCA3 e PSMA nos controles negativos (71%).

Na Tabela 4 foram descritos os resultados estratificados pelo estadiamento molecular dos genes PCA3, KLK2, KLK3 e PSMA combinados e distribuídos entre os estadiamento patológicos dado pelos graus de Gleason < ou ≥ 7.0. Uma única associação foi encontrada para o subgrupo duplo-positivo para o PCA3 e PSMA e triplo-positivos contendo os mesmos genes e incluindo o KLK2 versus Gleason < 7 (*P = 0.001 e 0.028,* respectivamente). Nenhuma associação foi encontrada para os dados da freqüência combinada dos marcadores estratificados pelo PSA sérico < ou ≥ 10ng/mL.

Tabela 2: Associação entre os resultados da RT-PCR, em sangue periférico, para os genes KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA e os diferentes estadios e graus de desenvolvimento do câncer de próstata.

		RT-PCR Positiva			
Dado Anátomo Patológico	***Casos de CaP No. (%)***	***KLK2 No. (%)***	***PCA3 No. (%)***	***KLK3 No. (%)***	***PSMA No. (%)***
Doença Confinada ao órgão	66/99 (67)				
T1	6/66 (9)	4/6 (67)	4/6 (67)	2/6 (33)	5/6 (83)
T2a – T2b	38/66 (58)	11/38 (29)	7/38 (18)	9/38 (26)	13/38 (34)
T2c	22/66 (33)	20/22 (91)	8/22 (36)	10/22 (45)	18/22 (82)
		[1]P = 0.000	*[1]P = 0.337*	*[1]P = 0.092*	*[1]P = 0.002*
Doença Extra Prostática	33/99 (33)				
T3	31/33 (94)	20/31 (64)	8/31 (26)	17/31 (52)	21/31 (68)
T4	2/33 (6)	2/2 (100)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)
		[1] P =0.005	*[1] P = 0.601*	*[1] P = 0.017*	*[1] P = 0.048*
		[2] P =0.038	*[2] P = 0.639*	*[2] P = 0.659*	*[2] P = 0.146*
Gleason					
5-6	59/99 (60)	39/59 (66)	23/59 (39)	23/59 (39)	40/59 (68)
7	30/99 (30)	14/30 (47)	3/30 (10)	9/30 (30)	11/30 (37)
		[3] P = 0.077	*[3] P = 0.004*	*[3] P = 0.404*	*[3] P = 0.005*
8-9	10/99 (10)	4/10 (40)	3/10 (30)	6/10 (60)	6/10 (60)
		[3] P = 0.220	*[3] P = 0.845*	*[3] P = 0.369*	*[3] P = 0.904*
		[4] P = 0.714	*[4] P = 0.307*	*[4] P = 0.187*	*[4] P = 0.356*
PSA sérico					
< 10ng/mL	54/99 (55)	28/54 (52)	13/54 (24)	20/54 (37)	31/54 (57)
≥ 10ng/mL	45/99 (45)	29/45 (64)	16/45 (36)	18/45 (40)	26/45 (58)
		P = 0.207	*P = 0.211*	*P = 0.763*	*P = 0.970*

Nota: os valores de *P* foram calculados pelo teste χ^2. Os estadios T1 e T2a-T2b e, T3 e T4 foram somados para análise de doença localizada e doença extra-prostática, respectivamente. [1] Análise feita com T1 e T2a-T2b, [2] Análise feita com T2c, [3] Análise com Gleason 5-6, [4] Análise com Gleason 7.

Tabela 3: Freqüência dos transcritos gênicos do KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA no sangue periférico de 99 casos de câncer de próstata (CaP) e 140 controles negativos.

Marcadores Moleculares	***RT-PCR Positiva No. (%)***		***RT-PCR Negativa No. (%)***	
	CaP	***Controles Negativos***	***CaP***	***Controles Negativos***
PCA3	29 (29.3)	7 (5.0)	70 (70.7)	133 (95.0)
PSMA	57 (57.6)	35 (25.0)	42 (42.4)	105 (75.0)
KLK3	38 (38.4)	45 (32.0)	61 (61.6)	95 (67.9)
KLK2	57 (57.6)	48 (34.0)	42 (42.4)	92 (65.7)
PCA3 + PSMA	14 (14.1)	1 (0.7)	27 (27.3)	99 (70.7)
PCA3 + KLK2	21 (21.2)	3 (2.1)	34 (34.3)	88 (62.9)
PCA3 + KLK3	10 (10.1)	2 (1.4)	42 (42.4)	90 (64.3)
KLK2 + KLK3	18 (18.2)	22 (15.7)	22 (22.2)	69 (49.3)
KLK2 + PSMA	39 (39.4)	14 (10.0)	24 (24.2)	71 (50.7)
KLK3 + PSMA	23 (23.2)	26 (18.6)	27 (27.3)	86 (61.4)
KLK2 + PCA3 + KLK3	7 (7.1)	1 (0.7)	20 (20.2)	65 (46.4)
KLK2 + PCA3 + PSMA	12 (12.1)	1 (0.7)	18 (18.2)	67 (47.9)
KLK3 + PCA3 + PSMA	7 (7.1)	1 (0.7)	20 (20.2)	71 (50.7)
KLK2 + KLK3 + PSMA	14 (14.1)	11 (7.9)	15 (15.1)	57 (40.7)
KLK2 + PCA3 + KLK3 + PSMA	5 (5.1)	1 (0.7)	13 (13.1)	54 (38.6)

Tabela 4: Associação entre os resultados da RT-PCR, em sangue periférico, para os genes KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA combinados e os graus de Gleason.

Marcadores	***Resultado da RT-PCR***	***Escore de Gleason <7 No. (%)***	***Escore de Gleason ≥ 7 No. (%)***	***P***
KLK2 + PCA3 + KLK3 + PSMA	Positivo	2/59 (3)	3/40 (8)	*0.845*
KLK2 + PCA3 + KLK3 + PSMA	Negativo	6/59 (10)	7/40 (18)	
KLK2 + PCA3 + KLK3	Positivo	4/59 (7)	3/40 (8)	*0.764*
KLK2 + PCA3 + KLK3	Negativo	10/59 (17)	10/40 (25)	
KLK2 + PCA3 + PSMA	Positivo	10/59 (17)	2/40 (5)	*0.028*
KLK2 + PCA3 + PSMA	Negativo	7/59 (12)	11/40 (28)	
KLK3 + PCA3 + PSMA	Positivo	4/59 (7)	3/40 (8)	*0.448*
KLK3 + PCA3 + PSMA	Negativo	8/59 (14)	12/40 (30)	
KLK2 + KLK3 + PSMA	Positivo	8/59 (14)	6/40 (15)	*0.843*
KLK2 + KLK3 + PSMA	Negativo	8/59 (14)	7/40 (18)	
PCA3 + PSMA	Positivo	11/59 (19)	3/40 (8)	*0.001*
PCA3 + PSMA	Negativo	7/59 (12)	20/40 (50)	
PCA3 + KLK2	Positivo	14/59 (24)	7/40 (18)	*0.070*
PCA3 + KLK2	Negativo	14/59 (24)	20/40 (50)	
PCA3 + KLK3	Positivo	6/59 (10)	4/40 (10)	*0.482*
PCA3 + KLK3	Negativo	20/59 (34)	22/40 (55)	
KLK2 + KLK3	Positivo	11/59 (19)	7/40 (18)	*0.482*
KLK2 + KLK3	Negativo	11/59 (19)	11/40 (28)	
KLK2 + PSMA	Positivo	27/59 (46)	12/40 (30)	*0.065*
KLK2 + PSMA	Negativo	11/59 (19)	13/40 (32)	
KLK3 + PSMA	Positivo	14/59 (24)	9/40 (22)	*0.522*
KLK3 + PSMA	Negativo	14/59 (24)	13/40 (32)	

Nota: os valores de *P* foram calculados pelo teste χ^2.

O *Odds Ratio* (*OR*) e os parâmetros diagnósticos foram descritos nas tabelas 5 e 6, respectivamente, de acordo com a positividade de expressão dos subgrupos estratificados pelo estadiamento molecular. Na Tabela 5 foram listados os dados de *OR* para cada gene individualmente e em combinações. Para tentar melhorar os parâmetros diagnósticos, os dados do PSA sérico (com 95% de sensibilidade e 22% de especificidade) foram analisados juntamente com os marcadores moleculares, sendo considerados positivos os valores ≥ 4ng/mL.

Os dados mostraram que individualmente o maior *OR* foi dado pelo PCA3, aumentando seu valor após associação com o PSMA, de 8 para 23 vezes entre os casos duplo-positivos versus todos os outros casos (PCA-PSMA-; PCA3+PSMA- e PCA3-PSMA+), e para 51 vezes entre os casos duplo-positivos versus os casos duplo-negativos. A inclusão do marcador KLK2 para uma análise tripla-positiva embora tenha apresentado o segundo maior *OR* (probabilidade de CaP 44.67 e 19.17 maior versus casos triplo-negativos e todos os outros casos, respectivamente), não melhorou significativamente os parâmetros diagnósticos comparado à combinação PCA3 e PSMA, com valor preditivo positivo de 92% versus 93% (PCA3 e PSMA duplo-positivos). Embora a combinação PCA3 e PSMA tenha aumentado o *OR* comparado à análise individual, a combinação entre esses dois genes em que o teste diagnóstico melhorou comparado ao PCA3 individualmente foi aquela considerando os casos duplo-positivos versus casos duplo-negativos, porém não aborda todos os casos analisados.

Para uma análise mais elaborada a qual inclui toda a amostragem, foram considerados os casos positivos para o PCA3 ou PSMA versus os casos duplo-negativos. De acordo com os resultados, apesar de redução em alguns parâmetros, como de 99% versus 71% para a especificidade; de 93% versus 64% para o valor preditivo positivo e, de 51 ou 23 vezes (PCA3 e PSMA duplo-positivos) para seis vezes no *OR*, houve um aumento considerável na sensibilidade, que variou de 13% a 58% (nos testes individuais e em combinação duplo-positiva) aumentando para 73%; no valor preditivo negativo (com variação de 62% a 71%) aumentando para 79% e, na acurácia, que variou de 64 a 68% aumentando para 72%. A inclusão do PSA sérico nesse subgrupo manteve o *OR* em 6 vezes e o *Kappa* em 0.44, e não melhorou os parâmetros diagnósticos (Tabela 6). Ainda, quando o PCA3 foi considerado juntamente com o PSA sérico

≥ 4ng/mL, o *OR* aumentou de 7.87 para 13.13, contudo, a acurácia do teste reduziu de 68 para 46%.

Para avaliar qual das combinações foi a melhor para testes diagnósticos, foram levados em consideração todos os dados obtidos (índice *Kappa*, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e *OR*). Os testes que incluem a positividade do PCA3 ou PSMA, ou quando o PCA3 é negativo, mas KLK2 e PSMA são positivos, associado ou não ao PSA sérico, foram os mais significantes em relação ao demais testes. Comparando-se essas combinações, o PCA3 individualmente apresentou um *OR* de aproximadamente 8 vezes e *Kappa* de 0.24; sendo que quando o PCA3 ou PSMA foram positivos, o *OR* reduziu para 6 vezes, mas o *Kappa* aumentou para 0.44 assim como a sensibilidade (de 29 para 73%), o valor preditivo negativo (de 66 para 79%) e a acurácia (de 68 para 72%). Em relação ao teste PCA3 ou PSMA positivo comparado PCA3 positivo ou PCA3 negativo, mas PSMA e KLK2 positivos, houve um aumento no *OR* de 6 para 8 vezes, na especificidade (de 71 para 86%), no valor preditivo positivo (de 64 para 74%) e na acurácia (de 72 para 74%). Quando o PSA sérico foi incluído, houve um aumento no *OR* (de 8 para 10 vezes), no *Kappa* (de 0.43 para 0.46), na especificidade (de 86 para 89%) e no valor preditivo positivo (de 74 para 93%). Foi observado também que a associação do PSA sérico aos testes moleculares aumenta o valor preditivo positivo, mas reduz na maioria dos casos a acurácia e o valor preditivo negativo para dados abaixo de 50%, enquanto nos melhores testes moleculares ambos os valores preditivos e a acurácia se encontram acima de 50%. Ainda, foi possível observar que houve uma redução no valor de *Odds Ratio* nas análises duplo-positivas, quando os transcritos do gene PCA3 não foram incluídos. Isoladamente, o menor índice *Kappa* e *OR* foram dados pela freqüência dos transcritos do gene KLK3 entre os grupos de casos analisados.

Tabela 5: Cálculo de *Odds Ratio* para verificação das chances de ocorrência do câncer de próstata pela expressão gênica combinada para o KLK2, PCA3 e PSMA no sangue periférico.

Marcadores Moleculares	***Pacientes com Câncer No. (%)***	***Controles Saudáveis No. (%)***	***Odds Ratio (IC 95%) P***	***Kappa***
KLK2 (+)	57/99 (58)	48/140 (34)	2.97 (1.73-5.10)	0.24
KLK2 (-)	42/99 (42)	92/140 (66)	*0.000*	
PCA3 (+)	29/99 (29)	7/140 (5)	7.87 (3.28-18.88)	0.24
PCA3 (-)	70/99 (71)	133/140 (95)	*0.000*	
PSMA (+)	57/99 (58)	35/140 (25)	4.07 (2.34-7.07)	0.33
PSMA (-)	42/99 (42)	105/140 (75)	*0.000*	
KLK3 (+)	38/99 (38)	45/140 (32)	1.32 (0.77-2.25)	0.06
KLK3 (-)	61/99 (62)	95/140 (68)	*0.389*	
PCA3/PSMA (+)	14/99 (14)	1/140 (1)	51.33 (6.46-408.01)	0.33
PCA3/PSMA (-)	27/99 (27)	99/140 (71)	*0.000*	
PCA3(+)/PSMA(-) e PCA3(-)/PSMA(+)	85/99 (86)	139/140 (99)	22.89 (2.95-177.25) *0.000*	0.13
PCA3/KLK2 (+)	21/99 (21)	3/140 (2)	18.12 (5.07-64.70)	0.35
PCA3/KLK2 (-)	34/99 (34)	88/140 (63)	*0.000*	
PCA3(+)/KLK2(-) e PCA3(-)/KLK2(+)	78/99 (79)	137/140 (98)	12.29 (3.55-42.54) *0.000*	0.19
KLK2/PSMA (+)	39/99 (39)	14/140 (10)	8.24 (3.83-17.73)	0.46
KLK2/PSMA (-)	24/99 (24)	71/140 (51)	*0.000*	
KLK2(+)/PSMA(-) e KLK2(-)/PSMA(+)	60/99 (61)	126/140 (90)	5.85 (2.95-11.59) *0.000*	0.29
PCA3 ou PSMA (+)	72/99 (73)	41/140 (29)	6.44 (3.63-11.42)	0.44
Duplo-negativos	27/99 (27)	99/140 (71)	*0.000*	
PCA3 (+)/ PSA sérico (+)	27/99 (27)	1/36 (3)	13.13 (1.71-100.58)	0.24
PCA3(+)/PSA sérico(-) e PCA3(-)/PSA sérico (+)	72/99 (73)	35/36 (97)	*0.004*	

PCA3 ou PSMA (+)/PSA sérico (+)	71/99 (72)	10/36 (28)	6.59 (2.82-15.43)	0.44
Duplo-negativos	28/99 (28)	26/36 (72)	*0.000*	
KLK2/PCA3/PSMA (+)	12/99 (12)	1/140 (1)	44.67 (5.44-366.71)	0.39
KLK2/PCA3/PSMA (-)	18/99 (18)	67/140 (48)	*0.000*	
Todos os outros casos	86/99 (87)	139/140 (99)	19.17 (2.45-150.06)	0.12
			0.000	
≥ 3 (+)	27/99 (27)	12/140 (9)	4.00 (1.91-8.37)	0.18
< 3 (+)	72/99 (73)	128/140 (91)	*0.0002*	
PCA3 (+) ou PCA3 (-) e KLK2/PSMA (+)	56/99 (57)	20/140 (14)	7.81 (4.21-14.50)	0.43
			0.000	
Todos os outros casos	43/99 (43)	120/140 (86)		
≥ 3 (+)/PSA sérico (+)	26/99 (26)	1/36 (3)	12.47 (1.62-95.64)	0.23
Todos os outros casos	73/99 (74)	35/36 (97)	*0.009*	
PCA3 (+) ou PCA3 (-) e KLK2/PSMA (+) com PSA sérico (+)	56/99 (57)	4/36 (11)	10.42 (3.42-31.70)	0.46
			0.000	
Todos os outros casos	43/99 (43)	32/36 (89)		
KLK2/PCA3/PSMA (+) e PSA sérico (+)	11/99 (11)	1/140 (1)	4.37 (0.54-35.17)	0.12
			0.245	
Todos os outros casos	88/99 (89)	35/36 (99)		

Tabela 6: Avaliação dos parâmetros diagnósticos para o câncer de próstata dado pela análise da expressão dos genes KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA.

Marcadores Moleculares	***Sensibilidade***	***Especificidade***	***VPP***	***VPN***	***Acurácia***
KLK2	58%	66%	54%	69%	62%
PSMA	58%	75%	62%	71%	68%
KLK3	38%	68%	46%	61%	56%
PCA3	29%	95%	81%	66%	68%
PCA3 positivo + PSA sérico ≥ 4ng/mL	27%	97%	96%	33%	46%
[1] PCA3 + PSMA	34%	99%	93%	79%	80%
[2] PCA3 + PSMA	13%	99%	93%	62%	64%
[1] KLK2 + PCA3	38%	97%	88%	72%	75%
[2] KLK2 + PCA3	21%	98%	88%	64%	66%
PCA3 ou PSMA positivo	73%	71%	64%	79%	72%
PCA3 ou PSMA positivo com PSA sérico ≥ 4ng/mL	72%	72%	88%	48%	72%
≥ 3 positivos	27%	91%	69%	64%	65%
≥ 3 positivos + PSA sérico ≥ 4ng/mL	26%	97%	96%	32%	45%
[1] PCA3 + PSMA + KLK2	40%	99%	92%	79%	81%
[2] PCA3 + PSMA + KLK2	12%	99%	92%	62%	63%
PCA3 (+) ou PCA3 (-) e KLK2/PSMA (+)	57%	86%	74%	74%	74%
PCA3 (+) ou PCA3 (-) e KLK2/PSMA (+) com PSA sérico ≥ 4ng/mL	57%	89%	93%	43%	65%

[1]= versus somente casos negativos, [2]= versus todas as outras combinações.

Discussão

Desde a descoberta do uso da RT-PCR para detectar a presença de células tumorais circulantes no sangue, muitos estudos têm utilizado essa técnica para diferentes tipos de tumor, incluindo o câncer de próstata.[7-9,12,13,15,16] É esperado que a demonstração de células do câncer de próstata no sangue dê informações sobre a propagação extra-prostática e da agressividade do câncer.[7]

A procura de novos marcadores séricos se deve pela baixa especificidade do PSA na avaliação clínica de pacientes com câncer de próstata. A presente investigação baseou-se na hipótese de que vários marcadores devem ser avaliados simultaneamente para tentar explicar as intrincadas associações de eventos múltiplos e variados que levam ao desenvolvimento do câncer, tais como: alterações genômicas, invasão local da matriz extracelular, liberação de células micrometastáticas para a circulação, invasão de tecidos de órgãos secundários, seguido pela resistência ao bloqueio hormonal. Os padrões de expressão entre diferentes genes podem ter um significado individual para cada paciente. Neste contexto, procurou-se nesta investigação demonstrar o potencial combinado do uso de quatro transcritos, KLK2, KLK3, PCA3 e PSMA, como marcadores em nível de sangue periférico, os quais possuem expressão diferencial e regulação positiva no câncer de próstata,[12,13,16,18-24] informações que foram reafirmadas no Capítulo I dessa tese.

O KLK2, KLK3 e PSMA são genes induzíveis e tecido-inespecíficos, embora possuam alta concentração no tecido prostático,[6-11,19,25,26] e são induzidos mediante alterações fisiológicas da próstata, principalmente nos eventos tumorais.[18-23] O transcrito PCA3, por sua vez, é um gene não-codificante tumoral e próstata-específico.[18]

A escolha dos quatro genes se deve pela íntima associação com a regulação hormonal (testosterona) dos genes KLK2, KLK3 e PSMA[19,21,27] e pela alta especificidade do PCA3 em identificar células tumorais prostáticas,[18,24,28-30] sendo este o primeiro trabalho que investigou simultaneamente estes transcritos e seus comportamentos nos pacientes com CaP e HPB e em um grupo controle de indivíduos jovens com o intuito de aprimorar o diagnóstico clínico.

Os resultados não mostraram diferenças na freqüência dos transcritos gênicos do KLK2, PCA3 e PSMA entre os casos de hiperplasia e voluntários saudáveis, e ao contrário, ocorreu uma freqüência significativamente maior desses transcritos no sangue de pacientes com adenocarcinoma prostático, o que demonstra que a detecção de RNAm dos genes KLK2, PCA3 e PSMA no sangue periférico está associada com ocorrência da doença maligna.

Quanto ao uso da RT-PCR para o KLK3 (ou PSA) embora nenhuma diferença tenha sido encontrada entre os casos de CaP e controles negativos, os dados obtidos demonstraram uma associação entre a presença do KLK3 e doença com invasão local. Corroborando com os dados aqui apresentados diversos trabalhos têm reportado que a análise por RT-PCR dos transcritos desse gene no sangue periférico pode ser útil como marcador pré-operatório na distinção entre doença localizada e avançada, demonstrando uma associação desse gene com a doença metastática.[7,8,13,16] Assim, esses dados sugerem que um maior número de indivíduos devem ser estudados e nas diferentes classes do CaP (localizado, com metástase local, com metástase à distância, hormônio independente) devido a grande importância que as análises do PSA sérico ou pela RT-PCR têm apresentado nos diversos trabalhos que demonstram a sua aplicação clínica.[7,8,13,16]

Nesta investigação, as análises combinadas da RT-PCR para o KLK2, PCA3 e PSMA discriminaram a doença benigna do câncer de próstata, sugerindo sua utilização para diferenciar esses dois grupos de pacientes. Os resultados comparados ao estadiamento TNM demonstraram que os genes KLK2 e PSMA podem estar associados com a invasão extra-prostática (pT3), e consequentemente com células localmente invasivas que foram liberadas para a circulação, podendo sugerir a presença de doença residual oculta em pacientes submetidos à prostatectomia radical, o que pode, num estudo futuro, aumentar a habilidade para predizer a progressão da doença localizada.

O uso da RT-PCR para os genes KLK2 e PSMA como marcadores de células prostáticas circulantes associadas com a progressão da doença tem sido descrito em outros trabalhos. Na RT-PCR pré-operatória entre os pacientes com câncer submetidos à cirurgia radical tem sido observada uma positividade variando entre 27 a 88%, e entre 35 a 65% para os genes KLK2 e PSMA,

respectivamente.[7,8,11,13,15,32] Os dados aqui apresentados de 58% de positividade para os genes KLK2 e PSMA, estão dentro dessa variação.

Alguns trabalhos têm realizado a tripla combinação dos genes PSMA, KLK2 e KLK3 no sangue periférico para estabelecer o papel desses genes como método auxiliar para a prática clínica para avaliação do câncer de próstata.[11,31,32] A RT-PCR *Nested* para esses genes tem demonstrado que a análise do RNAm dos genes PSMA e o KLK2 foram melhores no monitoramento da progressão da doença após o bloqueio por andrógenos, sendo que a combinação de ambos é desejável para os pacientes submetidos à terapia endócrina,[31] ou pela associação da expressão desses genes com o TNM T3-T4 observadas no presente trabalho, como também para o monitoramento da doença após a cirurgia radical, podendo estar associado com a ocorrência de doença metastática.[31] Também tem sido observado que a positividade de expressão do gene PSMA no sangue periférico apresenta maior valor para diagnóstico comparado a expressão dos genes KLK3 e KLK2,[32] o que foi semelhante aos dados aqui apresentados, sendo que seu valor se estende quanto à escolha da terapia e avaliação prognóstica para os pacientes com câncer de próstata.[32] A característica carcinogênica do PSMA tem sido revelada pela presença dessa proteína na neovasculatura de tumor de bexiga, rim e colon, sugerindo um possível papel na angiogênese tumoral, contudo essa ligação com a neovasculatura de tumores sólidos malignos parece não ocorrer no câncer de próstata.[25] Outros trabalhos realizados em pacientes submetidos à terapia hormonal têm encontrado associação entre a expressão duplo-positiva para os genes KLK3 e PSMA e um maior grau de Gleason, sendo que a avaliação tripla dos genes KLK2, KLK3 e PSMA em sangue periférico parece não ter um valor prognóstico, mas a terapia anti-androgênica administrada nos pacientes pode ter comprometido os resultados obtidos.[11]

Quanto ao gene PCA3, os seus transcritos foram encontrados em 1999 por Bussemakers e colaboradores,[18] pela técnica *Differential Display*, e por isso o produto do gene PCA3 foi inicialmente denominado de DD3. Desde sua descrição, os estudos têm confirmado o uso desse gene como marcador tumoral próstata específico.[24,28-30,33] Por serem específicos da próstata e significativamente aumentados no câncer, os seus RNAs podem ser detectados em importantes alvos para a análise clínica como tecidos prostáticos ou

biópsias,[18,28,30] na urina após massagem prostática [29] e em sangue periférico.[33] O trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa[33] havia descrito a presença do gene PCA3 no sangue periférico associada com o câncer de próstata, assim os resultados do presente estudo corroboram com os dados anteriores. Os dados apresentados indicam que a expressão do gene PCA3 foi maior em pacientes com CaP comparado aos controles saudáveis, contudo não se diferenciou entre os pacientes com doença localizada e extra-prostática, o que sugere que a sua expressão está aumentada em todos os estadios tumorais.

Em relação à associação entre o grau de Gleason e a freqüência dos marcadores PCA3 e PSMA algumas considerações devem ser feitas. A diferença de concordância entre a expressão de marcadores prostáticos e os níveis de PSA sérico, TNM e Gleason pode ser explicada, em parte, pela natureza multifatorial do câncer de próstata entre os diferentes pacientes. [7,8,10-12,15,16] O grau de Gleason indica o quanto indiferenciado o tumor se tornou do padrão celular prostático normal. Essa perda na diferenciação ocorre pelas alterações nos diferentes fatores gênicos e protéicos associados à caracterização fenotípica da doença. Assim, algum fator deve estar influenciando para que ocorra um aumento dos transcritos PSMA e PCA3 nos tumores com características funcionais ainda associadas ao tecido prostático normal, enquanto que o tumor mais indiferenciado, com potencial de agressividade maior, pode estar perdendo a expressão desses genes e aumentando a expressão de outros envolvidos na perda de diferenciação celular. Num próximo momento, o que poderia ocorrer seria a retomada do aumento da expressão desses marcadores, aumentando em conseqüência, a positividade no sangue periférico. Segundo Israeli *et al.* (1994),[19] a expressão do gene PSMA é encontrada em altos níveis em próstata normal e tumoral, mas em baixos níveis em doença benigna. Ou seja, uma alta expressão seguida de sua perda e posterior aumento para o PSMA já havia sido observado associado à ocorrência do CaP. Contudo, os trabalhos têm demonstrado em sua maioria associação positiva entre a expressão aumentada do PSMA e o grau de Gleason[8, 11, 20, 21]. Os dados apontam que a freqüência do PCA3 e PSMA, medida em nível molecular e associada ao adenocarcinoma prostático podem simplesmente ocorrer de forma independente das alterações dadas pelos graus de Gleason, cuja análise é feita baseada em alterações celulares morfológicas.

Como mostrado, existem vários trabalhos avaliando os marcadores individualmente,[10,15,16] com dupla combinação[7,8,13] e até tripla combinação,[11,31,32] contudo esse é o primeiro trabalho utilizando a análise de quatro marcadores moleculares nos mesmos pacientes com câncer de próstata submetidos à cirurgia radical, com hiperplasia benigna e em voluntários saudáveis. A inclusão do marcador PCA3 apresenta duas vantagens fundamentais comparado aos outros marcadores, é próstata e câncer específico.

O estudo combinado para estadiamento molecular demonstra que os melhores marcadores associados foram o PSMA e PCA3, com um aumento da ocorrência do CaP em aproximadamente 51 vezes comparado aos casos duplo-negativos e de 23 vezes comparado aos demais casos. Foi observado que com a presença do PCA3 todos os parâmetros para o teste molecular melhoraram, contudo a sensibilidade foi reduzida. Embora o PCA3 seja um marcador capaz de detectar o tumor, a baixa sensibilidade demonstra a necessidade de melhoria no diagnóstico molecular para esse gene. Contudo, como os transcritos do gene PCA3 são próstata-específicos, a baixa sensibilidade no teste pode estar associada a um dos maiores problemas na detecção das neoplasias, que consiste na detecção de poucas células do câncer no meio de um excesso de populações de células normais e de diferentes tipos celulares no sangue periférico, sendo esse um fato importante e que deve ser considerado.

Com o advento do uso do PSA sérico, a avaliação do câncer de próstata por esse método é parte integral do diagnóstico, estadiamento e terapia, contudo, apresenta baixa eficiência na distinção entre o câncer e as doenças benignas.[34] Vários estudos utilizando valores de PSA com valor de corte acima de 4,0 ng/mL, tem demonstrado sensibilidade variando de 58% a 92%, especificidade de 22% a 84% e valor preditivo positivo de 31% a 54%.[35,36] Comparando-se os dados do PSA sérico isoladamente com os resultados da combinação gênica PCA3 ou PSMA positivo e aquela que inclui PCA3 positivo ou PCA3 negativo, mas KLK2 e PSMA duplo-positivos, observou-se que com exceção da sensibilidade, os dados moleculares apresentaram-se significativamente maiores para a especificidade (86%), para o valor preditivo positivo (74%) e acurácia (74%). Uma especificidade de 98% para os genes KLK2 e PCA3 associados já havia sido previamente reportado por nosso grupo de pesquisa.[37] Ainda, a análise combinada dos

marcadores moleculares ao PSA sérico, apresentou maior índice *Kappa*, especificidade e valor preditivo positivo, com uma probabilidade 10 vezes maior para o CaP, podendo sugerir que o sc*reening* combinado por RT-PCR *Nested* para os RNAm dos genes PCA3, KLK2 e PSMA no sangue periférico juntamente com as medidas de PSA sérico possa ser utilizado na distinção entre pacientes com doença benigna daqueles com doença maligna. Contudo, quando somente o PCA3 ou PSMA forem positivos, embora apresente uma probabilidade de ocorrência menor comparada à combinação anterior, esse teste também tem uma contribuição importante na distinção entre os grupos com câncer daqueles que não apresentam a doença. Assim, ambos PCA3 e PSMA, ou PCA3, PSMA e KLK2, parecem ser ferramentas úteis na detecção e monitoramento de células prostáticas tumorais circulantes.

A amplificação de seqüências expressas pela RT-PCR oferece diversas vantagens em relação às metodologias utilizando proteínas. A detecção de moléculas específicas de RNAm pode indicar a presença de células tumorais no tecido, linfonodos, medula óssea, sangue periférico ou outros fluidos corporais, devido a uma alteração no nível molecular não necessariamente com associação direta a alteração morfológica e também devido a alta instabilidade dessas moléculas no meio extracelular.[9,13,15]

A prostatectomia radical representa um tratamento inadequado para pacientes com doença metastática além de ser um procedimento invasivo, sendo necessárias modalidades de estadiamento não invasivos que possam distinguir pacientes com alto risco de recorrência (que são os que possuem cânceres mais agressivos e com alta capacidade de se metastatizar, onde somente a monoterapia cirúrgica não é suficiente e terapias adjuvantes ou neo-adjuvantes sistêmicas podem ser necessárias) daqueles que apresentam altos índices de cura somente com a prostatectomia radical.[7,8]

O conhecimento dos perfis de expressão gênica envolvidos no processo de desenvolvimento do câncer pode auxiliar em decisões prognósticas importantes, sendo que a utilização da positividade dada pela RT-PCR dos genes KLK2 e PSMA representa um método útil para as análises clínicas voltadas para a detecção de células tumorais circulantes, estando essas diretamente associadas a tumores com alta capacidade de invasão (T3-T4). Esses tipos tumorais

requerem diferentes métodos terapêuticos e tempos de tratamento daqueles cânceres confinados ao órgão.[13] A detecção de células tumorais circulantes por RT-PCR para o KLK2, PSMA e PCA3 poderia auxiliar a clínica do câncer de próstata, o que poderia culminar num resultado final de melhoria do prognóstico do paciente e, consequentemente na sua qualidade de vida.

Referências Bibliográficas

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, et al: Cancer statistics. CA Cancer J Clin 48:6-29, 1998.

2. Griffiths K, Morton MS: Aspects of the cell biology of prostate cancer. In: Kaisary AV, Murphy GP, Denis L, Griffiths K. Textbook of prostate cancer: pathology, diagnosis and treatment. London: Martin Dunitz, 1999, pp 51-74.

3. INCA (Instituto Nacional do Câncer): Câncer de Próstata, Rio de Janeiro 2006: http:/www.inca.org.br/cancer/tipos/prostata.

4. Isaacs, JT: Molecular markers for prostate cancer metastasis: developing diagnostic methods for predicting the aggressiveness of prostate cancer. Am J Pathol 150:1511-1521, 1997.

5. Paulson DF, Moul JW, Walther PJ: Radical prostatectomy for clinical stage T1-2N0M0 prostatic adenocarcinoma: long-term results. J Urol 144:1180–1184, 1990.

6. Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA: Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. Clin Cancer Res 10:3943–3953, 2004.

7. Ylikoski A, Pettersson K, Nurmi J, et al: Simultaneous quantification of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 mRNA in blood samples from patients with prostate cancer and benign disease. Clin Chem 48:1265–1271, 2002.

8. Mitsiades CS, Lembessis P, Sourla A, et al: Molecular staging by RT-PCR analysis for PSA and PSMA in peripheral blood and bone marrow samples is an independent predictor of time to biochemical failure following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. Clin Exp Metast 21:495–505, 2004.

9. Llanes L, Ferruelo A, Paéz A, et al: The clinical utility of the prostate specific membrane antigen reverse-transcription/polymerase chain reaction to detect circulating prostate cells: an analysis in healthy men and women. BJU Int 89:882–885, 2002.

10. Martínez-Piñeiro L, Rios E, Martínez-Gomariz M, et al: Molecular staging of prostatic cancer with RT-PCR assay for prostate-specific antigen in peripheral blood and lymph nodes: comparison with standard histological staging and immunohistochemical assessment of occult regional lymph nodes metastases. Eur Urol 43:342-350, 2003.

11. Kurek R, Nunez G, Tselis N, et al: Prognostic value of combined “triple”-reverse transcription-pcr analysis for prostate-specific antigen, human kallikrein 2, and prostate-specific membrane antigen mRNA in peripheral blood and lymph nodes of prostate cancer patients. Clin Cancer Res 10:5808–5814, 2004.

12. Hara N, Kasahara T, Kawasaki T, et al: Reverse transcription-polymerase chain reaction detection of prostate-specific antigen, prostate-specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in one milliliter of peripheral blood: value for the staging of prostate cancer. Clin Cancer Res 8:1794–1799, 2002.

13. Ylikoski A, Karp M, Pettersson K, et al: Simultaneous quantification of human glandular kallikrein 2 and prostate-specific antigen mRNAs in peripheral blood from prostate cancer patients. J Mol Diag 3:111-122, 2001.

14. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, et al: Detection of minimal residual cells carrying the t (14;18) by DNA sequence amplification. Science 237:175-179, 1987.

15. Shariat SF, Gottenger E, Nguyen C, et al: Preoperative blood reverse transcriptase-PCR assays for prostate-specific antigen and human glandular kallikrein for prediction of prostate cancer progression after radical prostatectomy. Cancer Res 62:5974–5979, 2002.

16. Patel K, Whelan PJ, Prescott S, et al: The use of real-time reverse transcription-pcr for prostate- specific antigen mRNA to discriminate between blood samples from healthy volunteers and from patients with metastatic prostate cancer. Clin Cancer Res 10:7511–7519, 2004.

17. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 62:156 –159, 1987.

18. Bussemakers MJ, Bokhoven A, van Verhaegh GW, et al: DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. Cancer Res 59:5975-5979, 1999.

19. Israeli RS, Powell CT, Corr JG, et al: Expression of the prostate-specific membrane antigen. Cancer Res 54:1807-1811, 1994.

20. Wright GL, Haley C, Beckett ML, et al: Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. Urol Oncol 1:18-28, 1995.

21. Kawakami M, Nakayama J: Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. Cancer Res 57:2321-2324, 1997.

22. Herrala AM, Porvari KS, Kyllönen AP, et al: Comparison of human prostate specific glandular kallikrein 2 and prostate-specific antigen gene expression in prostate with gene amplification and overexpression of prostate specific glandular kallikrein 2 in tumor tissue. Cancer 92:2975-2984, 2001.

23. Meola J, Goulart LR, Oliveira JDD, et al: Differential expression of the KLK2 and KLK3 genes in peripheral blood and tissues of patients with prostate cancer. Gen Mol Biol 29:193-199, 2006.

24. Hessels D, Verhaegh GW, Schalken JA, et al: Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer. Expert Rev Mol Diagn 4:513-526, 2004.

25. Silver DA, Pellicer I, Fair WR, et al: Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. Clin Cancer Res 3:81-85, 1997.

26. Renneberg H, Friedetzky A, Konrad L, et al: Prostate specific membrane antigen (PSM) is expressed in various human tissues: implication for the use of PSM reverse transcription polymerase chain reaction to detect hematogenous prostate cancer spread. Urol Res 27:23-27, 1999.

27. Sun Z, Pan J, Balk SP: Androgen receptor-associated protein complex binds upstream of the androgen responsive elements in the promoters of human prostate-specific antigen and kallikrein 2 genes. Nucl Acids Res 25:3318-3325, 1997.

28. KoK JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, et al: DD3PCA3, a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. Cancer Res 62: 2695–2698, 2002.

29. Hessels D, Gunnewiek JMTK, van Oorf I, et al: $DD3^{PCA3}$-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. Eur Urol 44:8-16, 2003.

30. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G: New targets for therapy in prostate cancer: Differential display code 3 ($DD3^{PCA3}$) a highly prostate cancer specific gene. Urol 62: 34-43, 2003.

31. Xu T, Chen X, Wang XF, et al: Study of PSA, PSMA and hK2 mRNA in peripheral blood of prostate cancer patients and its clinical implications. Beijing Da Xue Xue Bao 36:164-168, 2004.

32. Cui WG, Zhao H, Song YZ, et al: Clinical significance of expression of PSA, hK2, PSMA in the peripheral blood of patients with prostate cancer. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 26:479-81, 2004.

33. Oliveira JDD, Goulart LR, Oliveira Jr WP, et al: DD3 gene expression in peripheral blood of patients with prostate cancer and with benign prostate hyperplasia as a molecular diagnostic. Eur Urol Suppl 2:102-102, 2003.

34. Catalona WJ, Smith DS: Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical retropubic prostatectomy for prostate cancer intermediate-term results. *J Urol* 160:2428-2434, 1998.

35. Martins ACP, Borelli- Bovo TJ, Reis RB, et al: Performance of psa and of psa density in the diagnosis of prostate carcinoma. Acta Cirurg Bras Suppl 17:7-11, 2002.

36. Brawer MK, Kirby R: In: Prostate specific antigen. Abingdon: Health Press Limited, 1998.

37. Goulart LR, Neves AF, Oliveira-Jr WP, et al: Prostate cancer diagnostics, tumor staging, disease recurrence and clinical management by analyses of multiple molecular markers. Eur Urol Suppl 2:156-156, 2003.

CAPÍTULO III:

Análise da expressão do RNA não-codificante PCA3 em tecidos prostáticos e em sangue periférico e implicações no diagnóstico do câncer de próstata

[3]

[3] ***FORMATO DE SUBMISSÃO PARA JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY***

Abstract

Purpose: Transcripts of PCA3/DD3 gene are at the moment the most specific molecule found in prostate cancer specimens. This mRNA can be detected in important sample targets for clinical analyses, such as prostatic tissues, urine after prostatic massage, and the peripheral blood. *Methods:* The present study evaluated the PCA3 gene expression in prostatic tissues and in peripheral blood of BPH and PCa patients, by RT-PCR assays, and based on its detection together with other clinical parameters, we proposed a model for molecular monitoring in order to improve diagnosis as an auxiliary technology. *Results:* The concomitant use of PCA3 transcript detection in the peripheral blood and in prostate tissues has improved diagnosis, with sensitivity and an accuracy of 77%. For the molecular staging, patients have been classified as: localized disease (PBL-; negative PCA3) and circulating tumors cells disease (PBL+; positive PCA3). The higher frequencies of PBL- had been observed in T1-T2 stages (75%); on the other hand, the higher PCA3 positivity was observed for the T3-T4 staging (43%), while the T1-T2 stages presented 25% positivity. A correlation was found between the molecular staging and serum PSA < 10ng/mL before surgery, and approximately 60% of patients with T3-T4 stages that presented biochemical failure after radical prostatectomy presented a positive PCA3 result (P= 0.05), with an odds ratio of 16-fold higher for the possibility of disease recurrence in relation to the T1-T2 patients, and an accuracy of 82%. *Conclusion:* These data demonstrated the importance of the PCA3 gene as an auxiliary method in prostate cancer diagnosis, by distinguishing PCa from BPH patients, and also demonstrated its prognostic value in recurrent disease for post-operative patients.

Key words: PCA3/DD3, RT-PCR, gene expression, prostate cancer, benign hyperplasia.

Resumo

Os transcritos do gene PCA3/DD3 são até o momento as moléculas mais específicas encontradas em espécimes de câncer de próstata. Esses RNAm podem ser detectados em importantes alvos para a análise clínica como tecidos prostáticos, na urina após massagem prostática e em sangue periférico. O presente estudo avaliou a expressão do gene PCA3 em tecidos prostáticos e em sangue periférico de pacientes com HPB e CaP, por técnicas de RT-PCR, e baseado na sua detecção juntamente com os parâmetros clínicos, foi proposto um modelo de estadiamento molecular como técnica assessória para melhor o diagnóstico da doença. O uso concomitante da detecção dos transcritos do gene PCA3 no sangue periférico e no tecido prostático melhorou o diagnóstico, com sensibilidade e acurácia de 77%. Para o estadiamento molecular, os pacientes foram classificados como contendo a doença localizada (PBL-) e em doença com células tumorais circulantes (PBL +). Maiores freqüências de tumor localizado pelo estadiamento molecular foram observadas nos estadios T1-T2 (75%), enquanto que 25 e 43% dos cânceres T1-T2 e T3-T4, respectivamente, apresentaram PCA3 positivo (células circulantes). Uma correlação foi encontrada para o estadiamento molecular para doença localizada e PSA sérico pré-cirúrgico < 10ng/mL, e aproximadamente 60% dos pacientes TNM T3-T4 que apresentaram falha bioquímica após a cirurgia radical apresentaram RT-PCR positiva do PCA3 (*P= 0.05*), com um *Odds Ratio* 16 vezes maior para a possibilidade de recorrência da doença em relação aos pacientes T1-T2 e uma acurácia de 82%. Esses dados demonstram a importância da detecção do gene PCA3 como método no diagnóstico do câncer de próstata, por distinguir pacientes com CaP daqueles com HPB, e também demonstrando seu valor prognóstico na doença recorrente no pós-operatório dos pacientes.

Palavras-chave: PCA3/DD3, RT-PCR, expressão gênica, câncer de próstata, hiperplasia benigna.

Introdução

O gene DD3/PCA3 foi isolado pela técnica molecular que analisa expressão diferencial de genes (*Differential Display*) entre tecidos doentes e saudáveis, o qual se mostrou altamente expresso no câncer de próstata comparado a tecidos não neoplásicos.[1] Assim, a abreviação DD3 refere-se à metodologia *Differential Display* que o descreveu e a recente nomenclatura PCA3 reflete sua associação com o câncer de próstata (*prostate cancer antigen*). O gene PCA3 está presente no cromossomo 9q21-22 e apresenta em sua composição 4 exons, sendo que os RNAm provenientes de um *splicing* do exon 2 parecem ser freqüentes no adenocarcinoma prostático e a poliadenilação alternativa em três diferentes posições do exon 4 geram diferentes tamanhos de transcritos.

Provavelmente, devido ao alto número de *stop* codons dentro da sequência do RNAm maduro do gene DD3, nenhum produto protéico tem sido encontrado, nem proveniente da molécula de RNAm completa (contendo os 4 exons), nem na molécula contendo o *splicing* do exon 2, o que sugere ser o RNAm do gene PCA3 uma molécula de RNA não codificante.[1]

Além de ser considerado tumor específico, o RNAm do gene PCA3 é específico de próstata, pois nenhuma expressão deste gene foi encontrada em outros tecidos.[2] Os seus RNAs mensageiros, com níveis significativamente aumentados nas células tumorais da próstata, podem ser detectados em importantes alvos para a análise clínica como: tecidos prostáticos ou biópsias,[1,3] na urina após massagem prostática[2] e em sangue periférico.[4]

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão combinada do gene PCA3 em tecidos prostáticos e sangue periférico de pacientes com HPB e CaP por RT-PCR afim de associar o perfil de expressão desse gene com as características clínicas da doença.

Materiais e Métodos

As amostras de tecidos prostáticos benignos e tumorais, e de sangue periférico foram obtidas de 273 indivíduos. Os tecidos com adenocarcinoma da próstata foram obtidos de 78 pacientes (48 submetidos à prostatectomia radical e 30 à biópsia prostática) e os casos de HPB foram obtidos de 25 pacientes submetidos à ressecção transuretral (RTU). Os fragmentos contendo adneocarcinoma prostatático foram avaliados por análise anátomo patológica feita por macrodissecção. O sangue periférico foi obtido de 36 pacientes com HPB, 99 pacientes com CaP e de 104 voluntários saudáveis. Em 12 e 57 dos casos com a HPB e CaP, respectivamente, foram obtidas amostras de ambos, tecido prostático e sangue periférico dos mesmos pacientes. As características do pacientes que constituíram a casuística deste trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com CaP, HPB e voluntários saudáveis.

Grupo de Pacientes	***Estádio TNM No (%)***	***Grau de Gleason No (%)***	***PSA Sérico Média (SD)***	***Idade Média (SD)***
Voluntários Saudáveis	-	-	-	23 (4)
HPB	-	-	7.60 (6.1)	71 (10)
CaP				
T1	5/78 (6)	-	7.03 (1.4)	68 (5)
T2	47/78 (60)	-	9.49 (4.1)	64 (8)
T3-T4	26/78 (34)	-	10.04 (4.6)	65 (7)
<7	-	46/78 (59)	11.90 (9.8)	65 (8)
≥7	-	32/78 (41)	24.10 (38.7)	67 (8)

HPB = hiperplasia prostática benigna; CaP = câncer de próstata; No. = número de indivíduos; SD = desvio padrão.

Dos 48 pacientes submetidos à cirurgia radical em que as amostras do sangue periférico foram analisadas para o gene PCA3, 32 foram acompanhados (tempo médio de 12 meses) quanto aos níveis de PSA sérico pós-cirúrgico para verificar a recidiva da doença. Para falha bioquímica ou evidência de recorrência da doença, foram considerados os níveis de PSA sérico> 0.2 ng/mL e o método de correlação de *Fisher* foi utilizado para verificar associação entre os parâmetros

clínicos (Gleason < ou ≥ 7, PSA sérico pré-operatório < ou ≥ 10ng/mL e TNM < ou ≥ T3) e o estadiamento molecular (de acordo com Mitsiades *et al*. 2004)[5] dado pela RT-PCR do gene PCA3 no sangue periférico e nos tecidos prostáticos.

Para a análise no tecido, os valores de IOD (densidade ótica integrada) igual ou maior que 0.2 (*cut off*) para a expressão relativa do PCA3 nos tecidos prostáticos foram considerados positivos, e ao contrário, os valores abaixo desse nível foram considerados negativos. Os demais métodos de estudo encontram-se descritos nos Capítulos I e II, dentro dos itens que incluem análises de expressão do gene PCA3.

Resultados

RT-PCR do gene PCA3 combinada para os dados obtidos no sangue periférico e tecido prostático

As freqüências obtidas para a RT-PCR do PCA3 em tecido prostático, no sangue periférico e em ambos simultaneamente estão descritas na Tabela 2. Como nenhuma diferença foi encontrada para a RT-PCR *Nested* do PCA3 entre os grupos HPB e controle saudável, esses foram analisados no sangue como pacientes controles negativos da doença. Os resultados obtidos para a análise no sangue periférico, nos tecidos prostáticos e na análise combinada (PBL + PT), mostraram que a expressão do gene PCA3 é significativamente maior no câncer de próstata ($P< 0.05$). Os resultados demonstraram que nas amostras de sangue periférico e de tecido prostático com CaP a positividade aumentou de 29 e 62% para 77%, respectivamente, quando a análise foi feita prevalecendo o resultado final obtido para a RT-PCR do gene PCA3 nas amostras do mesmo paciente. A baixa freqüência de positividade do gene PCA3 no sangue periférico comparado aos dados obtidos no tecido demonstra que 33% dos casos de CaP estão sub-estadiados quando somente o sangue é analisado. Por outro quando a análise do sangue é incluída observou-se que 15% dos pacientes não diagnosticados como positivos para os transcritos do gene PCA3 no tecido, apresentam essas moléculas no sangue periférico.

Tabela 2: Freqüência do gene PCA3 no sangue periférico e em tecidos prostáticos de pacientes com câncer de próstata, hiperplasia benigna e em voluntários saudáveis.

Casos/Amostras Analisadas	***RT-PCR Positiva para o PCA3***		
	CaP No. (%)	***HPB No. (%)***	***Voluntários Saudáveis No. (%)***
PT	48/78 (62)	6/25 (24)	ND
PBL	29/99 (29)	1/36 (3)	6/104 (6)
PBL e PT	44/57 (77)	3/12 (25)	ND

PBL = sangue periférico, PT = tecido prostático. ND= nenhum dado

Estadiamento molecular do câncer de próstata pela RT-PCR do PCA3

Quando os resultados foram avaliados para a expressão combinada no sangue periférico e no tecido prostático, foram formados os seguintes subgrupos: PBL-PT-, PBL+PT-, PBL-PT+ e PBL+PT+, sendo que a abreviação PBL se refere à denominação "*peripheral blood"* e PT a "*prostatic tissue"*. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os subgrupos e os graus de Gleason < ou ≥ 7.0 ou sistema TNM de classificação do tumor ($P > 0.05$), contudo, o subgrupo PBL+PT+ foi associado com o PSA sérico ≥ 10ng/ml e os subgrupos PBL-PT- e PBL-PT+ foram associados com PSA< 10ng/mL (Tabela 3).

Para o estadiamento molecular, os dados foram divididos em doença localizada (PBL-PT- e PBL-PT+) e em doença com células tumorais circulantes (PBL+PT- e PBL+PT+), para possível recidiva da doença e, consequentemente potencial metastático (Tabela 3). De acordo com o estadiamento molecular, a freqüência de células circulantes foi de 32%. Na Tabela 4 foram observadas maiores freqüências de tumor localizado pelo estadiamento molecular nos estadios T1-T2 (75%), enquanto 25 e 43% dos cânceres T1-T2 e T3-T4, respectivamente, apresentaram células circulantes. Nos dois grupos formados pelo estadiamento molecular combinado, semelhante aos resultados da Tabela 4, foi encontrada uma associação positiva entre a presença de células circulantes e PSA sérico ≥ 10ng/mL ($P = 0.06$).

Tabela 3: Subgrupos para a RT-PCR do gene PCA3 nos pacientes com CaP versus parâmetros clínicos.

Parâmetros Clínicos	***RT-PCR PCA3***			
	[1] PBL-PT-	***[2] PBL+PT-***	***[3] PBL-PT+***	***PBL+PT+***
	No. (%)	***No. (%)***	***No. (%)***	***No. (%)***
PSA				
<10ng/ml	8/29 (28)	3/29 (10)	15/29 (52)	3/29 (10)
≥ 10ng/ml	5/28 (18)	1/28 (4)	11/28 (39)	11/28 (39)
		[1] P = 0.55	*[1] P = 0.55*	*[1] P = 0.04*
			[2] P = 0.47	*[2] P = 0.08*
				[3] P = 0.03
Gleason				
<7	7/30 (23)	1/30 (3)	13/30 (44)	9/30 (30)
≥ 7	6/27 (22)	3/27 (11)	13/27 (49)	5/27 (18)
		[1] P = 0.34	*[1] P = 0.54*	*[1] P = 0.44*
			[2] P = 0.35	*[2] P = 0.21*
				[3] P = 0.30
TNM				
T1-T2	8/36 (22)	1/36 (3)	19/36 (53)	8/36 (22)
T3-T4	5/21 (24)	3/21 (14)	7/21 (33)	6/21 (29)
		[1] P = 0.24	*[1] P = 0.35*	*[1] P = 0.56*
			[2] P = 0.09	*[2] P = 0.29*
				[3] P = 0.25

Nota: os valores de *P* foram calculados pelo teste exato de *Fisher.* PBL = sangue periférico, PT = tecido prostático.

As análises de recorrência da doença associada à falha bioquímica foram listadas nas Tabelas 5 e 6.

Na Tabela 5, foram descritos a média de tempo de acompanhamento para a recidiva da doença (*follow-up*) dos pacientes com câncer de próstata. Os dados obtidos para a recorrência da doença medida pela falha bioquímica do PSA sérico > 0.2 ng/mL foram analisados em 32/48 (67%) dos pacientes com CaP em associação com freqüência do PCA3, estadiamento TNM, Gleason e PSA sérico pré-operatório (Tabela 4). Um maior nível de PSA sérico pós-operatório apresentou-se próximo da significância de correlação com o TNM T3-T4 (*P= 0.06*) e Gleason ≥ 7 (*P= 0.07*).

Tabela 4: Estadiamento molecular por RT-PCR para o PCA3 versus parâmetros clínicos dos pacientes analisados.

Parâmetros Clínicos para avaliação do Tumor	***Estadiamento Molecular***	
	Doença Localizada (PBL-PT- e PBL-PT+) No. (%)	***Células circulantes (PBL+PT- e PBL+PT+) No. (%)***
TNM		
T1-T2	27/36 (75)	9/36 (25)
T3-T4	12/21 (57)	9/21 (43)
Total	39/57 (68)	18/57 (32)
		P = 0.14
Gleason		
< 7	20/30 (67)	10/30 (33)
≥ 7	19/27 (71)	8/27 (29)
Total	39/57 (68)	18/57 (32)
		P = 0.50
[2] *PSA*		
<10ng/ml	23/29 (79)	6/29 (21)
≥ 10ng/ml	16/28 (57)	12/28 (43)
Total	39/57 (68)	18/57 (32)
		P = 0.06

Nota: os valores de *P* foram calculados pelo teste exato de *Fisher.* PBL = sangue periférico, PT = tecido prostático.

Na Tabela 6, a falha bioquímica foi combinada com a RT-PCR do PCA3 (PSA> 0.2ng/mL com PBL+PT+ e PBL+PT-; PSA≤ 0.2ng/mL com PBL-PT- e PBL-PT+) resultando em 17/32 (53%) dos pacientes. Os demais pacientes (15/32) que apresentaram PSA> 0.2ng/mL e PBL- ou PSA≤ 0.2ng/mL e PBL+ serão acompanhados por um período maior de tempo para verificar se esses casos apresentarão aumento do PSA pós-operatório para níveis acima de 0.2ng/mL ou se ocorrerá positividade do PCA3 nos casos discordantes. Aproximadamente 60% (3/5) dos pacientes TNM T3-T4 foram correlacionados com a falha bioquímica no pós-operatório combinada com a RT-PCR positiva do PCA3 (*P= 0.05*).

Tabela 5: Falha bioquímica associada aos parâmetros clínicos e moleculares.

Parâmetros Analisados	***Falha Bioquímica (recorrência da doença) N=32***		***P***
	Freqüência de Falha No. (%)	***Tempo de Falha Bioquímica Meses (SD)***	
RT-PCR PCA3			
PBL-PT- e PBL-PT+	9/22 (41)	9 (± 5)	
PBL+PT+ e PBL+PT-	4/10 (40)	10 (± 6)	*0.64*
PSA (ng/ml)			
< 10	6/18 (33)	11 (± 4)	
≥ 10	5/14 (36)	5 (± 3)	*0.59*
TNM			
T1-T2	4/19 (21)	10 (± 8)	
T3-T4	7/13 (54)	11 (± 4)	*0.06*
Gleason			
< 7	2/14 (14)	9 (± 7)	
≥ 7	8/18 (44)	12 (± 3)	*0.07*

PBL = sangue periférico, PT = tecido prostático. Nota: os valores de *P* foram calculados pelo teste exato de *Fisher.*

Tabela 6: Falha bioquímica combinada à RT-PCR para o PCA3 e aos parâmetros clínicos.

Parâmetros Analisados	***Falha Bioquímica no pós-operatório (recorrência da doença) e RT-PCR para o PCA3 pre-operatório N=17***	
	PSA > 0.2 PBL+PT+ e PBL+PT- No. (%)	***P***
PSA (ng/ml)		
< 10	2/10 (20)	
≥ 10	2/7 (29)	*0.56*
TNM		
T1-T2	1/12 (8)	
T3-T4	3/5 (60)	*0.05*
Gleason		
< 7	1/10 (10)	
≥ 7	3/7(43)	*0.16*

PBL = sangue periférico, PT = tecido prostático. Nota: os valores de *P* foram calculados pelo teste exato de *Fisher.*

Cálculo de Odds Ratio para diferenciar CaP de controle saudável e CaP localizado de doença recidiva

Os dados de *Odds Ratio* entre o câncer de próstata e controles negativos demonstraram as seguintes possibilidades de ocorrência da doença quando os transcritos do PCA3 foram positivos: quando somente o sangue é analisado foi de 7.87 (IC 95%: 3.28 – 18.88, *P = 0.000*), quando somente o tecido é analisado foi de 5.06 (IC 95%: 1.82 – 14.12, *P = 0.002*), e quando ambos são analisados predominando o resultado da RT-PCR positiva, foi de 10.15 (IC 95%: 2.39 – 43.10, *P = 0.001*). Para análise do CaP recorrente, os casos de RT-PCR do PCA3 positiva, PSA sérico pós-operatório >0.2 ng/mL e TNM T3-T4 em combinação aprentaram cerca de 16 vezes maior (IC 95%: 1.09 – 250.19, *P = 0.08*) de recorrência comparado aos demais casos (dado reportado na Tabela 6).

Testes diagnósticos para a RT-PCR do PCA3

Na Tabela 7 foram descritos os dados obtidos para a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia e índice *Kappa* para a RT-PCR do PCA3 (tecidos prostáticos, sangue periférico e em ambos) e para a análise de recorrência. No primeiro caso, o grupo CaP foi analisado versus controles negativos (controles no sangue: HPB e voluntários saudáveis). No segundo caso, os dados da Tabela 6 foram considerados para a análise de recidiva da doença.

A análise de expressão do gene PCA3 no sangue periférico apresentou uma alta especificidade (95%). Contudo, os maiores dados para a sensibilidade (77%), valor preditivo positivo (94%) e acurácia (77%) foram obtidos pela a expressão do PCA3 em ambas as amostras, sangue e tecido do mesmo paciente, de onde foi determinado o resultado final de positividade (*Kappa*= 0.52).

O teste utilizando a associção presença do PCA3 no sangue periférico, PSA pós-operatório maior que 0.2ng/mL e TNM T3-T4 juntos apresentaram sensibilidade, especificidade e acurácia de 60, 92 e 82%, respectivamente para a recorrência da doença (*Kappa*= 0.52).

Foi encontrada uma associação positiva entre a positividade de expressão que inclui PBL e PT para a RT-PCR do PCA3 e a idade do paciente no diagnóstico (*r=0.38, Pearson, P<0.05*). Nenhuma outra correlação foi encontrada entre os demais parâmetros clínicos e laboratoriais do presente trabalho.

A partir dos resultados apresentados foi elaborada a Tabela 8, que sugere possíveis caminhos para a progressão do câncer de próstata baseados nas concordâncias encontradas: entre o estadiamento molecular e o PSA sérico pré-operatório; entre o PSA sérico pós-operatório e o TNM e; entre o TNM, o PSA sérico pós-operatório e o estadiamento molecular.

Tabela 7: Teste diagnóstico para a RT-PCR do gene PCA3 no sangue periférico e em tecido prostático comparado a controles negativos para o câncer de próstata.

Teste Diagnóstico	***RT-PCR PCA3***			**** Recorrência da doença***
	PT	***PBL***	***PBL e PT***	
Sensibilidade	62%	29%	77%	60%
Especificidade	76%	95%	75%	92%
VPP	89%	81%	94%	75%
VPN	39%	66%	41%	85%
Acurácia	65%	68%	77%	82%
Kappa	0.38 (*P = 0.000)*	0.24 (*P = 0.000)*	0.52 (*P = 0.000)*	0.52 (*P = 0.000*)

PBL = sangue periférico, PT = tecido prostático, VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo. * A análise de recorrência da doença foi baseada em três parâmetros de concordância: PSA sérico pós-operatório maior que 0.2ng/mL, RT-PCR PCA3 positiva no sangue e TNM T3-T4.

Tabela 8: Provável evolução do câncer de próstata conforme os resultados dos parâmetros do PCA3 no sangue periférico por RT-PCR e PSA sérico pré e pós-cirúrgico.

RT-PCR Nested PCA3	***PSA pós operatório (0.2ng/mL)***	***PSA pré operatório (≥10ng/mL)***	***Recomendações***
–	–	–	Livre de doença.
–	–	–	Livre de doença. Contudo requer um melhor acompanhamento.
–	+	–	Recidiva. O PSA sérico pós-operatório positivo caracteriza recidiva da doença. A presença do PCA3 positivo é indicativa de câncer e pacientes com PSA pré-operatório acima de 10nm/mL apresentam alto risco para falha bioquímica no pós-operatório.
+	–	+	
+	+	–	Recidiva. Células tumorais circulantes, sendo necessária uma nova escolha terapêutica.

Discussão

De acordo com Carter *et al.* (2004),[6] o *screening* do PSA sérico no diagnóstico clínico do câncer de próstata tem demonstrado uma concordância geral entre os clínicos de que, após a sua utilização, houve um aumento no valor preditivo da doença quando comparado aos métodos de rastreamento utilizados há dez anos atrás, e que muitos cânceres detectados por esse método apresentam importância clínica quando suas características patológicas e seu potencial biológico são avaliados. Contudo, a capacidade para identificar corretamente homens com câncer daqueles que não apresentam a doença é limitada (baixa especificidade), por apresentar alterações também em doenças benignas e em inflamações da próstata.

Frente à evolução dos métodos de avaliação das alterações de células tumorais atualmente disponíveis, tanto morfologicamente quanto molecularmente, o PSA não parece ser o marcador ideal para doença localizada ou para doença em estágios avançados,[6] havendo uma necessidade de melhores marcadores para as doenças biologicamente relevantes como o câncer de próstata.

Vários trabalhos reportam o uso da técnica de RT-PCR como análise molecular de marcadores associados ao câncer de próstata no sangue periférico. Contudo, os estudos têm apresentado controvérsias quanto às diferentes associações dos dados moleculares. Entre essas variações destacam-se: seleção de diferentes *primers*; variações na sensibilidade e especificidade dos protocolos de RT-PCR; diferenças nos tempos de estadiamento molecular, sendo frequentemente realizado logo após o diagnóstico de biópsia seguida por USTR (os quais podem confundir os resultados devido à presença transiente associada à biópsia ou de células prostáticas na circulação); altas taxas de resultados falso-positivos no sangue ou em amostras de medula óssea (transcritos ilegítimos por tecidos não-prostáticos); avaliação de apenas um gene ou de um único tecido (sangue, linfonodo, biópsia prostática ou medula óssea) e; análise de amostras de medula óssea provenientes de aspirados e não de biópsias, os quais estão frequentemente contaminados com sangue, e assim as amostras de medula não são representativas. Cada uma dessas diferenças técnicas tem efeitos adversos sobre a acurácia do diagnóstico e do prognóstico dado pelo método molecular.[5,7,8]

No presente trabalho, essas diferenças foram minimizadas pela análise do sangue periférico e do tecido prostático, assim como pela análise de um marcador tumor específico, que não é associado à expressão de transcritos ilegítimos no sangue como verificado para outros genes prostáticos. De acordo com Kok *et al.* (2002),[9] além de estar associado ao câncer de próstata, o gene PCA3 é também específico dessa glândula, não apresentando expressão em câncer de pulmão, esôfago, íleo, cólon, pâncreas, testículos, mama, bexiga e melanoma. Os dados aqui apresentados demonstraram que a prevalência do gene PCA3 foi maior em tecidos com CaP comparado a tecidos com HPB. Esses dados corroboram com a literatura que descreve superexpressão do gene PCA3 no câncer de próstata comparado a tecidos benignos.[1] Quanto aos dados no sangue periférico, a análise pela RT-PCR *Nested* foi primeiramente reportada por nosso grupo de pesquisa,[4] que num estudo preliminar também demonstrou associação da expressão do gene PCA3 ao câncer de próstata.

Devido à superexpressão do gene PCA3 no CaP e natureza próstata específica,[2] seus RNAs podem ser detectados em importantes alvos para a análise clínica como: biópsias,[1,3] urina após massagem prostática,[2] e sangue

periférico.[4] Individualmente, as análises de expressão do gene PCA3 ou no sangue periférico ou nos tecidos prostáticos apresentam seu valor como auxiliar nos testes diagnósticos para a distinção de pacientes com CaP daqueles com doença benigna. Contudo, as análises de expressão do gene PCA3 no sangue periférico e no tecido prostático dos mesmos pacientes apresentaram-se melhor como teste diagnóstico, com uma acurácia de 77% e uma probabilidade aumentada em 10 vezes para ocorrência da doença maligna quando os transcritos desse gene estavam presentes. Comparado aos dados do Capítulo I, observa-se que com a inclusão da análise de biópsias nos tecidos os parâmetros de sensibilidade, valor preditivo negativo e acurácia foram reduzidos provavelmente pela substancial redução no tamanho da amostra processada para a extração de RNA e posterior análise de expressão gênica, mas com resultados ainda significativos. Assim, quando as biópsias são necessárias, as análises monitoradas por patologistas e pela análise molecular do gene PCA3 combinada aos dados no sangue periférico podem melhorar ainda mais o resultado final do paciente quanto à presença da doença maligna.

Os resultados aqui obtidos demonstram que as medidas de expressão do gene PCA3 pela RT-PCR semi-quantitativa e *Nested* são altamente sugestivas como ferramenta auxiliar ao diagnóstico clínico. Esses dados podem ainda sugerir que as análises do gene PCA3 devem ser realizadas em conjunto com os outros parâmetros clínicos, suportado pelos seguintes dados: os índices de especificidade do PSA sérico são baixos, mas a sensibilidade é alta; pela recusa de uma parte da população masculina em realizar o toque retal e baixa sensibilidade desse método (20%); e cerca de 40-50% dos pacientes com CaP são subestadiados. A sensibilidade da RT-PCR *Nested* para o PCA3 no sangue periférico demonstra a necessidade de melhorar o diagnóstico talvez pela modificação dos *primers* utilizados e pelo uso de técnicas mais sofisticadas, como o *Real Time PCR*, o que poderia aumentar os níveis de detecção do PCA3.

Os dados de RT-PCR para o gene PCA3 PBL+PT+ foi indicativa de câncer de próstata e de tumor com maior capacidade de apresentar recorrência no pós operatório, devido à associação positiva com um maior nível de PSA sérico pré-operatório. As análises de PSA sérico evidenciando diferenças significativas para o subgrupo PBL+PT+ para o PCA3 versus PBL-PT- e versus PBL-PT+, indicam

que esses subgrupos provavelmente fazem parte de um mesmo grupo de pacientes e que os subgrupos PBL+PT+ e PBL+PT- também fazem parte de uma outra categoria de pacientes com CaP, sendo que essa apresenta maior potencial maligno. Os casos PT- podem ter ocorrido devido à natureza multifocal do câncer de próstata e provavelmente os níveis de expressão do gene PCA3 no tecido analisado não foram detectados pela técnica. Assim, o estadiamento molecular para o CaP foi feito categorizando os dados de expressão em apenas dois grupos, aqueles com doença localizada (PBL-PT- ou PBL-PT+) e aqueles com células circulantes (PBL+PT+ ou PBL+PT-). Essa combinação demonstrou também resultados próximos de significância entre maiores níveis de PSA sérico e positividade do estadiamento molecular. Segundo Mitsiades *et al.* (2004)[5] pacientes com Gleason≥ 7 ou PSA≥ 10 ng/mL apresentam alto risco para falha bioquímica no pós-operatório, os quais devem ser tratados com terapia neoadjuvante além da prostatectomia radical, para possível prevenção da recorrência da doença.

No presente trabalho, a falha bioquímica dada pelo PSA sérico pós-operatório foi próxima de uma associação com TNM T3-T4 e Gleason ≥ 0.7, sugerindo que esses tumores apresentam maiores chances de recidiva da doença. A correlação obtida para o estadiamento molecular positivo (células circulantes), PSA sérico pós-operatório >0.2 e TNM T3-T4 demonstram que esses pacientes apresentam uma chance aproximadamente 16 vezes maior em apresentar recidiva da doença, comparado aos pacientes com estadiamento molecular negativo (doença localizada), PSA sérico pós-operatório ≤0.2 e TNM T1-T2, com uma acurácia de 82%.

Esses dados demonstram também a importância da RT-PCR para o gene PCA3 como método auxiliar na distinção entre grupos de pacientes com câncer de próstata localizado, em que a cirurgia radical pode ser uma terapia realmente eficaz, daqueles com células circulantes, que provavelmente apresentarão falhas bioquímicas e recidivas da doença. A RT-PCR do gene PCA3 no sangue periférico apresentou 32% de positividade indicando células circulantes com potencial maligno. Em proporção, cerca de 25% - 50% dos pacientes com doença localizada apresentam recorrência na primeira década após a cirurgia radical.[5,7,8,10,11] Devido à formação dos subgrupos necessários para as análises

estatísticas, um grupo maior de indivíduos deverá ser considerado, além de um melhor acompanhamento do paciente no pós-operatório, para verificar o real papel das análises do PCA3 nas doenças recidivas e para obtenção de resultados mais conclusivos.

Quanto às demais variáveis associadas com a presença do gene PCA3, aproximadamente 90% dos cânceres estão associados com fatores ambientais e 10% com fatores hereditários,[12] assim a positividade da RT-PCR *Nested* em 6% dos indivíduos jovens pode sugerir que esses sejam casos de CaP de caráter hereditário. A incidência do CaP aumenta com a idade mais do que vários outros tipos de câncer,[13,14,15] o que pode justificar a natureza carcinogênica dada pelo aumento na freqüência do PCA3 associada com o avanço da idade dos pacientes.

As análises de RT-PCR semi-quantitativa e *Nested* foram eficientes como ferramenta molecular para avaliar a expressão do gene PCA3 e mostrou que esse gene foi um bom biomarcador para distinguir pacientes com CaP daqueles com HPB em ambos, tecido prostático e sangue periférico, assim como demonstrou que a análise no sangue do gene PCA3 pode ser útil, com o PSA sérico pós-operatório e estadiamento TNM, na distinção de pacientes com chances de apresentar recidiva da doença. Análises em um maior grupo de pacientes, considerando pacientes submetidos à terapia hormonal deverão ser realizadas para definir o papel desse gene na resposta terapêutica. Esse e outros trabalhos sobre o desenvolvimento do CaP apenas confirmam a natureza heterogênea dessa doença e reforça a idéia de que o gene PCA3 está associado com a doença maligna da próstata, assim como com a sua progressão.

Referências Bibliográficas

1. Bussemakers MJ, Bokhoven A, van Verhaegh GW, et al: DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. Cancer Res 59:5975-5979, 1999.

2. Hessels D, Gunnewiek JMTK, van Oorf I, et al: DD3^{PCA3}-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. Eur Urol 44:8-16, 2003.

3. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G: New targets for therapy in prostate cancer: Differential display code 3 (*DD3^{PCA3}*) a highly prostate cancer specific gene. Urol 62: 34-43, 2003.

4. Oliveira JDD, Goulart LR, Oliveira Jr WP, et al: DD3 gene expression in peripheral blood of patients with prostate cancer and with benign prostate hyperplasia as a molecular diagnostic. Eur Urol Suppl 2: 102-102, 2003.

5. Mitsiades CS, Lembessis P, Sourla A, et al: Molecular staging by RT-PCR analysis for PSA and PSMA in peripheral blood and bone marrow samples is an independent predictor of time to biochemical failure following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. Clin Exp Metast 21:495–505, 2004.

6. Carter HB, Isaacs WB: Improved Biomarkers for Prostate Cancer: A Definite Need. J Nat Cancer Inst 96: 813-815, 2004.

7. Martínez-Piñeiro L, Rios E, Martínez-Gomariz M, et al: Molecular staging of prostatic cancer with RT-PCR assay for prostate-specific antigen in peripheral blood and lymph nodes: comparison with standard histological staging and immunohistochemical assessment of occult regional lymph nodes metastases. Eur Urol 43:342-350, 2003.

8. Kurek R, Nunez G, Tselis N, et al: Prognostic value of combined “triple”-reverse transcription-pcr analysis for prostate-specific antigen, human kallikrein 2, and prostate-specific membrane antigen mRNA in peripheral blood and lymph nodes of prostate cancer patients. Clin Cancer Res 10:5808–5814, 2004.

9. KoK JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, et al: DD3PCA3, a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. Cancer Res 62: 2695–2698, 2002.

10. Llanes L, Ferruelo A, Paéz A, et al: The clinical utility of the prostate specific membrane antigen reverse-transcription/polymerase chain reaction to detect circulating prostate cells: an analysis in healthy men and women. BJU Int 89:882–885, 2002.

11. Ylikoski A, Pettersson K, Nurmi J, et al: Simultaneous quantification of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 mRNA in blood samples from patients with prostate cancer and benign disease. Clin Chem 48:1265–1271, 2002.

12. Ruijter E, Van De KAAC, Miller G, et al: Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. Endocr Rev 20: 22-45, 1999.

13. Coffey DS: Prostate cancer: an overview of an increasing dilemma. Cancer Supp 71: 880-886, 1993.

14. Isaacs JT: Molecular markers for prostate cancer metastasis: developing diagnostic methods for predicting the agressiveness of prostate cancer. Am J Pathol 150: 1511-1521, 1997.

15. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci EL: What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. Sem Cancer Biol 8: 263-273, 1998.

Short Communication

CAPÍTULO IV:

Caracterização de transcritos do gene PCA3, sua provável ação como miRNA e implicações no diagnóstico do câncer de próstata

---

[4]

[4] ***FORMATO DE SUBMISSÃO PARA INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER***

Abstract

Approximately 98% of all the products transcribed in the human genome correspond to non coding RNAs (ncRNA). Many ncRNA functions are attributed to this structural particularity given mainly for the secondary structures formed from its linear sequence of bases. Among the ncRNA types are tRNA, rRNA, small nuclear RNA, small nucleolar RNA, small interference RNA (siRNA), microRNA (miRNA) and catalytic RNAs (ribozymes). The bioinformatics has supplied useful tools in the prediction of optimal or suboptimal secondary structures allowing the design of interference RNA as miRNAs or siRNAs. In human, miRNAs have been associated with the development of diverse complex diseases as cancer. The PCA3 (DD3) gene was molecularly characterized as cancer and prostate specific, and its transcripts are non-coding, once no peptide products have been found. Due to its structural characteristics, the PCA3 gene belongs thus to the increasing family of ncRNA. In the present work, four new variant molecules of the PCA3 gene have been sequence characterized and their frequencies demonstrated in prostate cancer and in benign prostatic hyperplasia patients, as well as in healthy individuals. We have also investigated and predicted the putative secondary structures formed in order to elucidate its role in prostate cancer biology. No association has been found between the frequency of these molecules and prostate pathologies (PCa or BPH). On the other hand, PCA3 variants were found in 10% (12/115) of cases in the general population. Similar analyses of the possible polypeptides of these molecules demonstrated that it remains as a non-coding RNA, and introns presents in the first, second and fourth variants suggesting a possible role as a miRNA with intracellular activity to these molecules to the PCA3 gene. In prostatic tissues, 100% of the prostate cancer cases presented the RNA molecule with an exon 2 splicing. However, further investigation must be carried out to demonstrate the true role of these splicing variants in prostate tumors and in other pathologies, once these molecules have been preferentially found in the peripheral blood.

Key words: PCA3/DD3, RT-PCR, gene expression, peripheral blood, RNA folding, prostate cancer, benign hyperplasia.

Resumo

Aproximadamente 98% de todos os produtos transcritos do genoma humano correspondem a RNAs não codificantes (RNAnc). Muitas funções dos RNAnc são atribuídas a suas particularidades estruturais dadas principalmente pelas estruturas secundárias formadas a partir da sua sequência linear de bases. Dentre os tipos de RNAnc estão os RNAt, RNAr, *small nuclear* RNA, *small nucleolar* RNA, *small interference* RNA (siRNA), microRNA (miRNA) e RNAs catalíticos (ribozimas). A bioinformática tem fornecido ferramentas úteis na predição de estruturas secundárias ótimas ou subótimas permitindo o *design* de RNAs de interferência como os miRNAs ou siRNAs. Em humanos, os miRNAs tem sido associados ao desenvolvimento de diversas doenças complexas como o câncer. O gene PCA3 (DD3) foi molecularmente caracterizado como câncer- e próstata- específico e os seus RNAs são os responsáveis por essa característica, isso porque nenhum produto protéico tem sido encontrado para esse gene. Devido às suas características estruturais, o gene PCA3, pertence assim à crescente família de RNAnc. No presente trabalho foi analisado as freqüências de quatro moléculas variantes do gene PCA3, além das anteriormente reportadas, como também foram preditas as suas estruturas secundárias na tentativa de elucidar o seu papel na biologia do câncer de próstata. Nenhuma associação foi encontrada entre a freqüência dessas moléculas e as patologias da próstata como hiperplasia benigna ou câncer, sendo que na população geral analisada essas variantes foram encontradas em apenas 10% (12/115) dos casos. As análises de homologia de possíveis polipeptídeos para essas moléculas demonstram que permanece o papel de RNA não-codificante para o gene PCA3. Ainda, a presença de introns nas variantes 1, 2 e 4 podem sugerir um papel intracelular de miRNA para essas moléculas do gene PCA3. Nos tecidos prostáticos, 100% dos casos de câncer foi representando pela molécula com *splicing* do exon 2. Contudo, para as variantes de *splicing*, novas pesquisas deverão ser realizadas incluindo outras patologias além das doenças prostáticas e outros tipos tumorais para verificar o real impacto dessas moléculas, uma vez que foram encontradas preferencialmente no sangue periférico.

Palavras-chave: PCA3/DD3, RT-PCR, expressão gênica, sangue periférico, RNA *folding,* câncer de próstata, hiperplasia benigna.

Introdução

O gene PCA3, localizado no cromossomo 9q21-22, foi molecularmente caracterizado como específico de próstata e altamente expresso em quase todos os espécimes de tumor prostático, incluindo doença metastática.[1-3] Nenhuma expressão ou apenas baixos níveis de PCA3 foram encontrados em próstata normal ou em tecidos com hiperplasia benigna (HPB).[1-4] O gene PCA3 parece ser um membro da classe crescente de RNAs não-codificantes (RNAnc), pois estudos de transcrição e tradução *in vitro* não tem encontrado evidência de que uma proteína seja produzida por esse gene.[1]

Aproximadamente 98% de todos os produtos transcritos em humanos corresponde a RNAnc.[5] Embora as proteínas sejam efetoras fundamentais da função celular, a base da complexidade e variação fenotípica pode primariamente ser devido a um sistema paralelo de informação necessária para a coordenação e modulação da expressão gênica, via remodelagem da cromatina e interações RNA-DNA, RNA-RNA e RNA-proteína.[5,6] Muitas funções dos RNAnc são atribuídas a suas particularidades estruturais (chamadas de motivos) e dentre esses tipos de RNAs estão os RNAt (transportadores), RNAr (ribossomais), snRNA (*small nuclear*), snoRNA (*small nucleolar* RNA), siRNA (*small interference* RNA), miRNA (*micro* RNA) e RNAs catalíticos (ribozimas).[7-9]

Os RNAs de interferência (siRNA e miRNA) têm sido associados ao fenômeno de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), por gerar moléculas efetoras específicas a uma determinada seqüência.[10] Os siRNAs geralmente são provenientes de origem exógena (vírus ou artificial) e apresenta um completo pareamento com o RNAm alvo frequentemente em apenas um sítio, enquanto os miRNAs são formados de um gene próprio a partir de exon, intron ou de regiões intergênicas, e apresentam um pareamento incompleto podendo ser complementar a múltiplos sítios de um alvo, regulando sua expressão em nível transcricional.[5,10,11] A caracterização bioquímica demonstra que os siRNAs apresentam 21-23 nucleotídeos (nts) de dsRNA (RNA dupla fita) com simetria interna após 2-3 nts na extremidade 3' e 5'. No citoplasma, longas moléculas de dsRNA são reconhecidas por uma enzima da família RNase III, conhecida como Dicer, produzindo os siRNAs. Esses siRNAs são incorporados em um complexo

multi-protéico (RISC) induzindo o silenciamento do RNA alvo. Um domínio helicase, dois domínios RNase III e um domínio de ligação a dsRNA estão entre os domínios da proteína Dicer. O duplex siRNA é rompido sendo que uma das fitas é guiada pelo RISC a seu alvo homólogo para clivagem endonucleolítica. Os siRNAs não tem sido encontrado em mamíferos, contudo a molécula relacionada, miRNA tem sido clonado em vários organismos e tipos celulares.[10] Para formação dos miRNA, os dsRNA (pré-miRNA) são processados em precursores menores com cerca de 70 nts (pré-miRNA) no núcleo celular por uma enzima chamada Drosha. Essa enzima também é uma RNase III, contudo cliva dsRNAs apresentando uma estrutura com *loops* e com pareamentos imperfeitos. A molécula pré-miRNA é exportada para o citoplasma, sendo reconhecida pela Dicer e subsequentemente clivada formando os miRNAs (21-25 nts), sendo o processo subseqüente semelhante aquele descrito para os siRNAs.[5,10,11]

Uma característica comum dos RNAnc é que sua homologia é fracamente definida pela similaridade de sequência mas pela similaridade estrutural. As ferramentas fornecidas pela bioinformática permitem a predição do mínimo de energia livre, estruturas ótimas ou subótimas, cineticamente favoráveis e as probabilidades de pareamento de bases para a sequência linear de um dado RNA.[8,9,12] O Sfold é um programa de bioinformática que, a partir de uma molécula de RNA, fornece as suas possíveis estruturas secundárias, assim como permite o *design* de RNAs de interferência e de sítios de ribozima.[12]

O propósito do presente trabalho foi avaliar a expressão das variantes encontradas para o gene PCA3 em tecidos prostáticos e sangue periférico de pacientes com HPB, CaP e em voluntários saudáveis por RT-PCR afim de verificar a freqüência desses transcritos entre os diferentes grupos e analisar as estruturas secundárias dos RNAm do gene PCA3 (completo e com *splicing*), na tentativa de elucidar o seu papel na biologia do câncer de próstata.

Materiais e Métodos

Pacientes analisados

Além dos produtos amplificados para obtenção específica da banda de 277 pb dos transcritos do gene PCA3, foram obtidas, no sangue periférico, outras 4 bandas com peso molecular diferenciado. Para verificar as freqüências dessas bandas foram analisadas 31 amostras de tecido prostático e 115 de sangue periférico. Dos tecidos prostáticos, 17 foram de HPB e 14 de CaP. No sangue periférico, 43 foram de voluntários saudáveis, 32 de pacientes com HPB (22 submetidos à RTU e 10 à biópsias prostáticas) e 40 de pacientes com CaP. A idade média para os grupos analisados foi de 24 (variando de 13 a 30), 69 (variando de 51 a 78) e de 66 (variando de 50 a 87) para os voluntários saudáveis, grupos HPB e CaP, respectivamente.

Extração do RNA total

O RNA total foi extraído em duplicata das amostras de sangue periférico de pacientes com HPB, CaP e controle saudável, usando os procedimentos descritos por Chomczynski and Sacchi (1987)[13] com modificações e no tecido de pacientes com CaP e HPB, utilizando o *Trizol Reagent* (Invitrogen) e seguindo as recomendações do fabricante.

A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose e por leituras espectofotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,5 %, por 1 hora à 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 vídeo documentação *ImageSystem* – VDS, Pharmacia Biosciences).

Transcrição Reversa, síntese de cDNA e qualificação da reação

Um e dois microgramas de RNA total de tecido prostático e do sangue periférico foram transcritos reversamente a 37°C por 1 hora em 20 µl de solução contendo 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Biosciences), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. Reações controle foram realizadas para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. Os produtos de transcrição do gene constitutivo B2M (beta 2-microglobulina) foram usados como controles da transcrição reversa e da integridade do RNA.

Para amplificação dos transcritos do gene B2M, dois microlitros de cDNA foram misturados aos reagentes da PCR contendo: 1.0 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 5.0 pmoles de cada *primer* B2M, completado para um volume final de 20 µl. Os *primers* utilizados foram os descritos por Bussemakers *et al.* 1999.[1] As condições de reação foram: 95°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 40 s, 59°C por 40 s, 72°C por 50 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min.

PCR para a análise dos transcritos do gene PCA3

A primeira reação (PCR externa) foi realizada com 3 µl de cDNA em 20 µl de uma mistura de reação contendo: 1.0 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 10.0 pmoles de cada *primer* específico para o PCA3. As condições de reação foram: 95°C por 3 min, 30 ciclos a 94°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 40 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min. Essa reação foi utilizada para a análise dos transcritos do gene PCA3 no tecido diretamente e no sangue periférico foi realizada uma segunda reação.

A segunda reação (PCR *Nested*) foi feita contendo os mesmos reagentes, nas mesmas concentrações. Contudo, foram utilizados 5µl do produto da PCR externa, e adicionou-se 1.5 X PCR *Enhancer System* (Invitrogen). O programa

para a amplificação foi: 95°C por 3 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 62°C por 30 s, 72°C por 40 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 min.

As sequências dos *primers* externos utilizados foram as descritas por Bussemakers *et al.* (1999),[1] e as dos *primers* internos e os locais de anelamento foram as seguintes: senso, 5'-CCGAGGGAGACCAGGAAGAT-3', exon 1; reverso, 5'-ATCGATGACCCAAGATGGCG-3', exon 4.

Sequenciamento dos produtos transcricionais do gene PCA3

Todos os fragmentos amplificados, incluindo a banda controle de 277 pb, foram purificados do gel de agarose e ligados ao plasmídeo do kit *Topo TA Cloning* (Invitrogen) e transformados em bactéria quimio-competente *Top 10*, seguindo-se as recomendações do fabricante.

Após o processo de transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 ug/mL de ampicilina e 200 ug/mL de IPTG/XGal e incubadas por 15 horas a 37°C para seleção dos clones transformados. Três clones transformados de cada produto amplificado foram crescidos em 5 mL de meio líquido LB por 15 horas a 37°C sob agitação (250 rpm). Os plasmídeos foram extraídos de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Após a extração, as amostras de cada produto amplificado foram submetidas ao sequenciamento automatizado utilizando o kit *DYEnamic ET* (Amersham Bioscience), contendo o *primer* controle universal (5'-GTTTTCCAGTCACGACGTTGTA-3') em aparelho MegaBace™1000 (Amersham Bioscience).

Bioinformática

A seqüências obtidas foram analisadas contra o banco de dados de nucleotídeos GenBank (Blast – www.ncbi.nlm.nih.gov). A verificação da homologia das seqüências encontradas contra a sequência conhecida do RNAm do gene PCA3 (acesso No. AF103907 para a seqüência completa e AY894120 para o *splicing* do exon 2) foi feita pelo programa *Lasergene* (*DNAStar* ®, clustal V). As traduções das seqüências foram realizadas pelo programa Expasy

(www.expasy.org) na procura de possíveis ORFs (*open reading frame*) para as moléculas de RNAs com *splicing* do gene PCA3.

As seqüências nucleotídicas das moléculas do RNAm completo (exons 1, 2, 3 e 4); do RNAm com os exons 1, 3 e 4 (*splicing* do exon 2) e das 4 variantes encontradas para o gene PCA3 foram submetidas ao programa de predição de estrutura secundária *Sfold* (http://sfold.wadsworth.org/). Os histogramas bi-dimensionais (*2Dhist*) foram gerados para se verificar a probabilidade estatística de ocorrência do *folding* da seqüência linear do RNAm. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

Resultados

Homologia dos produtos de RT-PCR variantes

Os dados de alinhamento no Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) mostraram que todas as seqüências encontradas a partir da amplificação de RNA total foram provenientes do gene PCA3. Na Figura 1 estão as bandas que representam as amplificações de 377, 322, 142 e 88 pb que representam os *splicing* variantes I (SV1), II (SV2), III (SV3) e IV (SV4) do gene PCA3, respectivamente. Na Figura 2 está representado o gene completo do PCA3 em que foram esquematizados os seus produtos gênicos e respectivos sítios doadores e aceptores de *splicing.*

Figura 1: Representação das variantes de RNA do gene PCA3. B2M – Beta 2-microglobulina (536 pb), SV1 – *splicing* variante 1 (377pb), SV2 - *splicing* variante 2 (322pb), SE2 – *splicing* do exon 2 (277pb), SV3 - *splicing* variante 3 (142 pb), SV4 - *splicing* variante 4 (88 pb). M – marcador de 100pb.

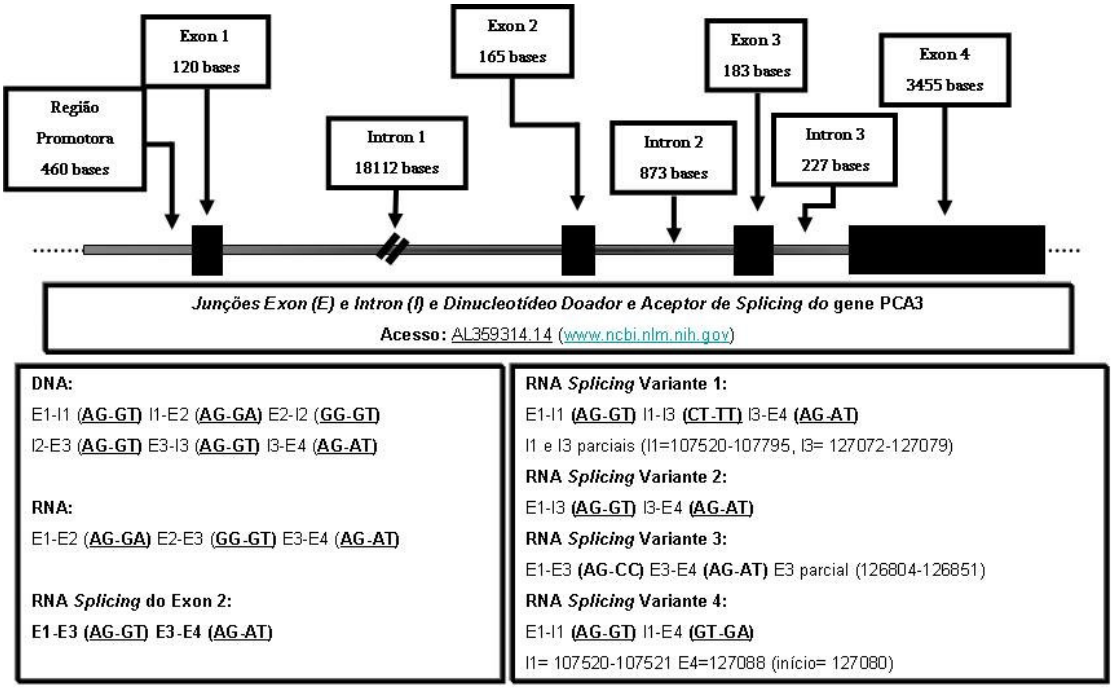


Figura 2: Representação do gene PCA3 e moléculas de RNA variantes. As moléculas variantes 1, 3 e 4 apresentam os introns 1, 3 e exons 3 e 4 apenas parcialmente, enquanto a variante 2 apresenta o intron 3 completo ao invés do exon 3. Os números de acessos desses seqüências no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) estão descritos na Tabela 3.

Dos tecidos prostáticos analisados, a molécula SE2 foi presente em 6/14 (43%) dos casos de CaP e em nenhum caso de HPB e, não foram encontradas nenhuma das 4 moléculas variantes.

Na Tabela 1 estão descritas as freqüências no sangue periférico. Observou-se que as freqüências das variantes são raras, apresentando na população geral analisada uma freqüência de 3%, 4%, 3% e 2%, para SV1, SV2, SV3 e SV4, respectivamente. A presença de SV2 (1/40) e SV4 (1/40) no CaP não ocorreu juntamente com nenhum dos 17 casos de positividade para a SE2. Nos pacientes com HPB, a SV1 (2/10) foi presente em 2 dos 4 casos positivos para a SE2, em que o laudo clínico foi dado pela análise de biópsias e não de fragmentos de RTU. Nos casos de HPB com laudo dado pela análise patológica de fragmentos de RTU, a SV1 (1/22) e a SV2 (2/22) não ocorreu juntamente com a SE2 (1/22). Nos voluntários saudáveis, as SV3 (3/43) foram presentes juntamente com a SE2, mas a SV2 (1/43) e a SV4 (1/43) ocorreram de forma independente. Nenhuma associação foi encontrada entre os grupos de pacientes analisados e a presença específica das variantes do gene PCA3. As análises de

possíveis seqüências protéicas (www.expasy.org) seguidas de *Blastp* (www.ncbi.nlm.nih.gov) não demonstraram homologia completa com nenhuma proteína (Tabela 2).

Tabela 1: Freqüência dos *splicing* variantes do gene PCA3 no sangue periférico.

RNAs do gene PCA3	***Grupos Analisados***			
	CaP No. (%)	***HPB (Biópsia) No. (%)***	***HPB (RTU) No. (%)***	***Voluntários Saudáveis No. (%)***
SE2	17/40 (42)	4/10 (40)	1/22 (4)	4/43 (9)
SV1	0/40 (0)	2/10 (20)	1/22 (4)	0/43 (0)
SV2	1/40 (2)	0/10 (0)	2/22 (9)	1/43 (2)
SV3	0/40 (0)	0/10 (0)	0/22 (0)	3/43 (7)
SV4	1/40 (2)	0/10 (0)	0/22 (0)	1/43 (2)

SE2: *splicing* do exon 2, SV1: *splicing* variante 1, SV2: *splicing* variante 2, SV3: *splicing* variante 3, SV4: *splicing* variante 4.

Tabela 2: Possíveis polipeptídeos encontrados para as moléculas *splicing* variantes do gene PCA3.

Molécula de RNA do PCA3	***Tradução***	***Sentido de leitura***	***Início da leitura***
SE2 , SV1	M L C A S K Y N P G K I L R C F P A C S Q I P W A R T L L R K N S Q L H I R Q Q H E G S L N K M S N V I L Q C R K V T V Q I W E L N I K N E C G W I Y G E C W A Q K E P *Stop*	3'-5'	Exon 4
SV2, SV4	M I M L C A S K Y N P G K I L R C F P A C S Q I P W A R T L L R K N S Q L H I R Q Q H E G S L N K M S N V I L Q C R K V T V Q I W E L N I K N E C G W I Y G E C W A Q K E P *Stop*	3'-5'	Exon 4
SV3	M I Q S P F K Y P H T G S T K G S T E I P W E K C P A A I L G H R W V I D E P R P V P G P A C E G R T L E N E L M C S L K D G Q E N R S C C G Y L F E R D Y R F E M K S Q S E H Y Q *Stop*	5'-3'	Exon 1

SE2: *splicing* do exon 2, SV1: *splicing* variante 1, SV2: *splicing* variante 2, SV3: *splicing* variante 3, SV4: *splicing* variante 4.

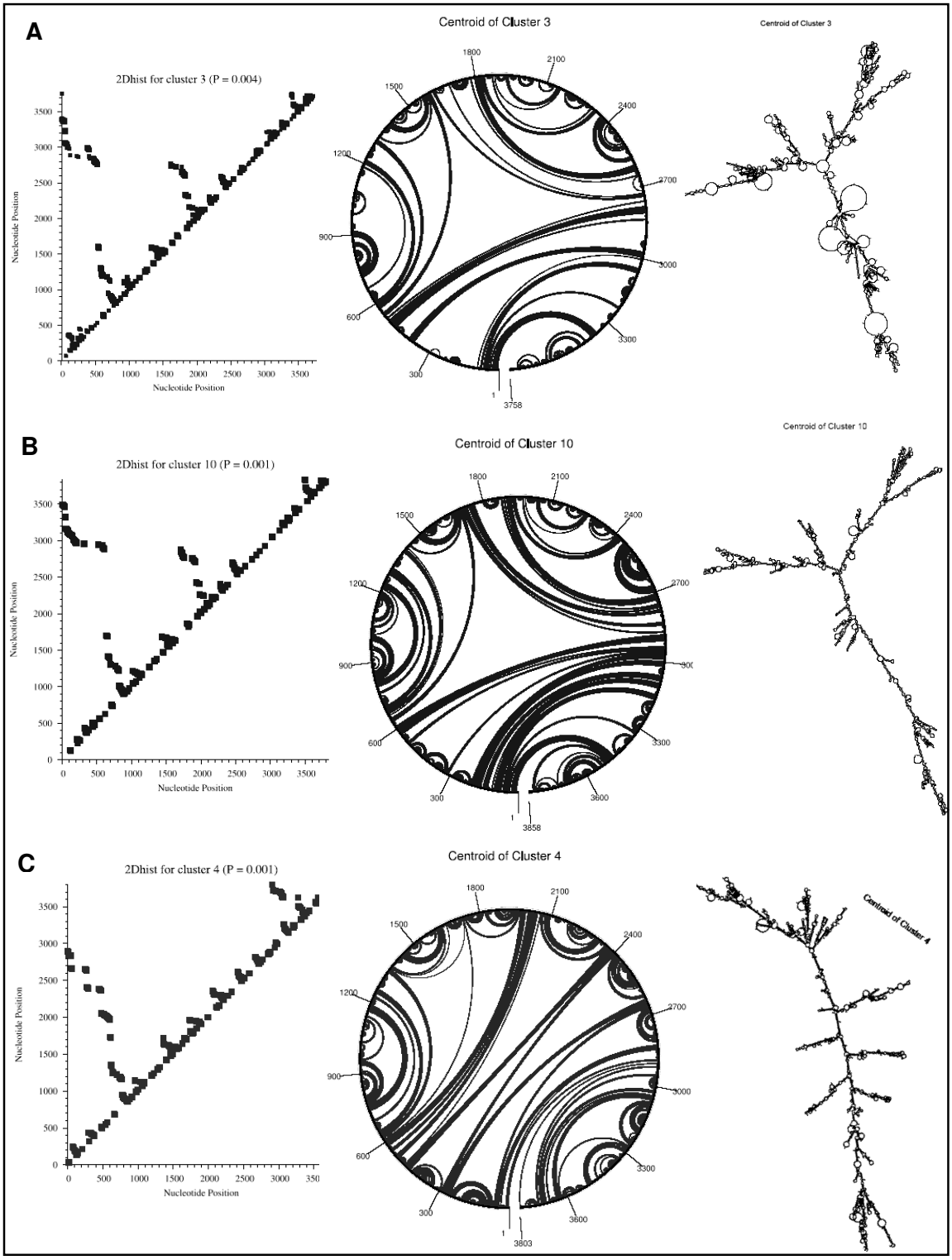
Estruturas secundárias das moléculas de RNA variantes do gene PCA3

As probabilidades de formação de estruturas secundárias das moléculas de RNA completa, com *splicing* do exon 2 (SE2), SV1, SV2, SV3 e SV4 foram descritas na Tabela 3. As moléculas de RNA completa e SV4 do gene PCA3, não apresentaram estruturas secundárias significativas ($P > 0.05$). Para as moléculas SE2, SV1, SV2 e SV3 foram obtidas 1, 5, 2 e 1 estruturas secundárias com $P < 0.05$, respectivamente. Nas Figuras 3A, 3B, 3C e 3D estão os gráficos de clusterização (*2Dhist*), centróides e estruturas secundárias para as moléculas com SE2, SV1, SV2 e SV3, respectivamente. A partir do *folding* das moléculas de RNA do gene PCA3 foram encontradas 83 seqüências possíveis de RNAs de interferência (Tabela 4). As seqüências ID No 63, 64, 67, 70, 71 e 72 (6/83, 7%) ocorreram somente na molécula SE2; as seqüências ID No 73, 75 e 76 (3/83, 4%) somente na SV1; as seqüências ID No 77, 78 e 82 (3/83, 4%) somente na SV2; as seqüências ID No 1 e 83 (2/83, 2%) ocorreram na molécula de RNA completa e na SV3, respectivamente. Duplas combinações foram mais freqüentes para SE2 e SV2 (4/83, 5%). Os mesmos oligonucleotídeos foram compartilhados por todas as moléculas em 32/83 (39%) das seqüências e por cinco das seis moléculas em 18/83 (22%) das seqüências. Além disso, o programa foi capaz de predizer possíveis sítios para atuação dessas moléculas como RNAs catalíticos ou ribozimas (dados não mostrados).

Tabela 3: Resultado do *clustering* para os RNAs do gene PCA3.

Moléculas do gene PCA3	***No. Acesso no GenBank***	***Tamanho esperado da Seqüência (pb)***	***Número de Clusters***	***Probalidades dos Clusters***
Seqüência Completa do RNA	AF103907	3923	2	0.871, 0.129
SE2	AY894120	3735	3	0.724, 0.272, 0.004
SV1	DQ374659	3858	10	0.655, 0.093, 0.084, 0.083, 0.057, 0.016, 0.009, 0.001, 0.001, 0.001
SV2	DQ374660	3803	4	0.693, 0.234, 0.072, 0.001
SV3	DQ374661	3633	3	0.736, 0.229, 0.035
SV4	DQ374662	3580	2	0.767, 0.233

SE2: *splicing* do exon 2, SV1: *splicing* variante 1, SV2: *splicing* variante 2, SV3: *splicing* variante 3, SV4: *splicing* variante 4.


A
2Dhist for cluster 3 (P = 0.004)
Nucleotide Position
Centroid of Cluster 3
Centroid of Cluster 3
B
2Dhist for cluster 10 (P = 0.001)
Nucleotide Position
Centroid of Cluster 10
Centroid of Cluster 10
C
2Dhist for cluster 4 (P = 0.001)
Nucleotide Position
Centroid of Cluster 4
Centroid of Cluster 4

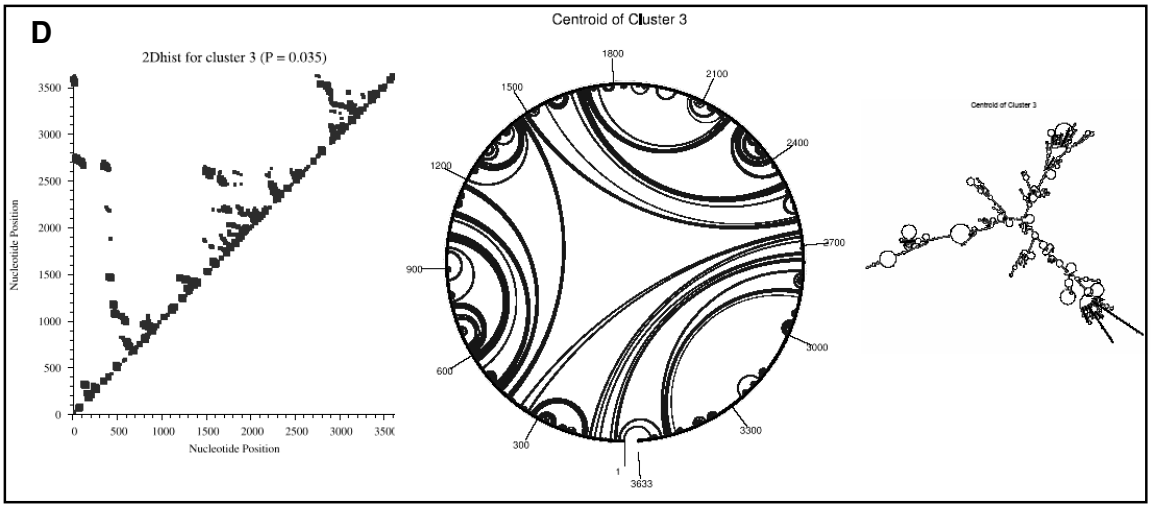


Figura 3: Representação gráfica para as estruturas secundárias das moléculas de RNA variantes do gene PCA3 geradas pelo programa *Sfold*. Em A, B, C e D os gráficos *2Dhist* e centróides estão representado a probabilidade de pareamento entre a sequência linear de base de cada molécula e a estrutura secundária para SE2, SV1, SV2 e SV3, respectivamente. A SV1 foi representada pelo *cluster* 10 e a SV2 pelo *cluster* 4 (http://sfold.wadsworth.org/).

Tabela 4: Seqüências dos RNAs de interferência do gene PCA3 gerados pelo programa *Sfold* (http://sfold.wadsworth.org/).

Seq. ID No.	***Seqüências de siRNA Senso, Anti-Senso e Dinucleotídeos Leader***	***Posição no Genoma***	***Entrada***	**Moléculas**
1	AAGAAAGGCUGCUGACUUUTT AAAGUCAGCAGCCUUUCUUTT AU	126678-126696	AL359314.14	*RNAC*
2	UGUGCGUUCAUAACCAAAUTT AUUUGGUUAUGAACGCACATT AC	127427-127445	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
3	GUGCGUUCAUAACCAAAUCTT GAUUUGGUUAUGAACGCACTT CU	127428-127446	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
4	UGCGUUCAUAACCAAAUCATT UGAUUUGGUUAUGAACGCATT UG	127429-127449	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
5	GCGUUCAUAACCAAAUCAUTT AUGAUUUGGUUAUGAACGCTT GU	127430-127450	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
6	CGUUCAUAACCAAAUCAUUTT AAUGAUUUGGUUAUGAACGTT UG	127431-127450	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
7	UGUGACCUUUCUACACUGUTT ACAGUGUAGAAAGGUCACATT AC	127573-127591	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
8	GUGACCUUUCUACACUGUATT UACAGUGUAGAAAGGUCACTT CU	127574-127592	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
9	UGACCUUUCUACACUGUAGTT CUACAGUGUAGAAAGGUCATT UG	127575-127593	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
10	ACAUCAUCCUCAGUGUCUUTT AAGACACUGAGGAUGAUGUTT CA	127778-127797	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
11	CUCAGUGUCUUUGCCCAUATT UAUGGGCAAAGACACUGAGTT	127786-127804	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*

	UC			
12	UCAGUGUCUUUGCCCAUACTT GUAUGGGCAAAGACACUGATT CC	127787-127806	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
13	CAGUGUCUUUGCCCAUACUTT AGUAUGGGCAAAGACACUGTT CU	127788-127806	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
14	GUGUCUUUGCCCAUACUGATT UCAGUAUGGGCAAAGACACTT CA	127790-127808	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
15	UGUCUUUGCCCAUACUGAATT UUCAGUAUGGGCAAAGACATT AG	127791-127809	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
16	UGCCCAUACUGAAAUUCAUTT AUGAAUUUCAGUAUGGGCATT UU	127797-127817	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
17	CCCAUUCUCAAGACCUCAATT UUGAGGUCUUGAGAAUGGGTT UG	127830-127848	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
18	CCAUUCUCAAGACCUCAAATT UUUGAGGUCUUGAGAAUGGTT GC	127831-127849	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
19	AAGAUGACUAAGUCCUUUATT UAAAGGACUUAGUCAUCUUTT CA	127957-127976	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
20	AGAUGACUAAGUCCUUUAUTT AUAAAGGACUUAGUCAUCUTT AA	127958-127976	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
21	UCCCAUACCACCUAAACAATT UUGUUUAGGUGGUAUGGGATT CC	3000-3018	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
22	CAUCACAUGAGACAGCAAATT UUUGCUGUCUCAUGUGAUGTT AU	128270-128289	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
23	AUCACAUGAGACAGCAAAUTT AUUUGCUGUCUCAUGUGAUTT UC	128271-128289	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
24	UCACAUGAGACAGCAAAUATT UAUUUGCUGUCUCAUGUGATT	128272-128290	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*

	CA			
25	ACAUGAGACAGCAAAUACUTT AGUAUUUGCUGUCUCAUGUTT UC	128274-128292	AL359314.14	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
26	CUUCAUUUCUCUAUCUCUATT UAGAGAUAGAGAAAUGAAGTT UA	128430-128449	AL359314.14	*SV1, RNAC, SV2, SV3, SV4*
27	UUCUCUAUCUCUAUCACAATT UUGUGAUAGAGAUAGAGAATT AU	128436-128455	AL359314.14	*RNAC, SV2, SV3, SV4*
28	UCUCUAUCUCUAUCACAAUTT AUUGUGAUAGAGAUAGAGATT UU	128437-128455	AL359314.14	*RNAC, SV2, SV3, SV4*
29	CUCUAUCUCUAUCACAAUATT UAUUGUGAUAGAGAUAGAGTT UU	128438-128457	AL359314.14	*RNAC, SV2, SV3, SV4*
30	CUAUCUCUAUCACAAUAUCTT GAUAUUGUGAUAGAGAUAGTT CU	128440-128458	AL359314.14	*RNAC, SV2, SV3, SV4*
31	UCUCUAUCACAAUAUCCAATT UUGGAUAUUGUGAUAGAGATT UA	128443-128461	AL359314.14	*RNAC, SV2, SV3, SV4*
32	CUAUCACAAUAUCCAACAATT UUGUUGGAUAUUGUGAUAGTT CU	128446-128464	AL359314.14	*RNAC, SV2, SV3, SV4*
33	UCACAAUAUCCAACAAGCUTT AGCUUGUUGGAUAUUGUGATT UA	128449-128469	AL359314.14	*RNAC, SV2, SV3, SV4*
34	UCUCUCUCUUGACCCAUUATT UAAUGGGUCAAGAGAGAGATT CC	3646-3666	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*
35	CUCUCUCUUGACCCAUUAUTT AUAAUGGGUCAAGAGAGAGTT CU	3647-3667	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*
36	UCUCUCUUGACCCAUUAUUTT AAUAAUGGGUCAAGAGAGATT UC	3648-3667	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*
37	CUCUCUUGACCCAUUAUUUTT AAAUAAUGGGUCAAGAGAGTT	3649-3667	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*

	CU			
38	UGACCCAUUAUUUCAGACUTT AGUCUGAAAUAAUGGGUCATT CU	3655-3674	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*
39	GACCCAUUAUUUCAGACUUTT AAGUCUGAAAUAAUGGGUCTT UU	3656-3674	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*
40	ACCCAUUAUUUCAGACUUATT UAAGUCUGAAAUAAUGGGUTT UG	3657-3675	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*
41	CCCAUUAUUUCAGACUUAATT UUAAGUCUGAAAUAAUGGGTT GA	3658-3676	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*
42	CCACCAUAUCUCAUUAUUCTT GAAUAAUGAGAUAUGGUGGTT CA	3724-3743	AF103908.1	*RNAC, SV2, SV3, SV4*
43	CUGAACUUCUGUCCCUCUUTT AAGAGGGACAGAAGUUCAGTT CU	4072-4091	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
44	UGAACUUCUGUCCCUCUUUTT AAAGAGGGACAGAAGUUCATT UC	4073-4091	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
45	GAACUUCUGUCCCUCUUUGTT CAAAGAGGGACAGAAGUUCTT CU	4074-4093	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
46	AGGAGAGAAUAUAAGAACUTT AGUUCUUAUAUUCUCUCCUTT AU	4142-4160	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
47	AGGAACCAAGAUACAAAGATT UCUUUGUAUCUUGGUUCCUTT AA	4222-4240	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
48	GGAACCAAGAUACAAAGAATT UUCUUUGUAUCUUGGUUCCTT AA	4223-4241	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
49	GAACCAAGAUACAAAGAACTT GUUCUUUGUAUCUUGGUUCTT AG	4224-4243	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
50	CCAACACAUCGCUUACCAATT UUGGUAAGCGAUGUGUUGGTT	4441-4460	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*

	CU			
51	CAACACAUCGCUUACCAAUTT AUUGGUAAGCGAUGUGUUGTT UC	4442-4460	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV2, SV3, SV4*
52	CCACUAACCUGAAUGCCUATT UAGGCAUUCAGGUUAGUGGTT CA	4535-4553	AF103908.1	*SV1, RNAC, SV2, SV3, SV4*
53	CUGAAUGCCUAGACCCUUATT UAAGGGUCUAGGCAUUCAGTT AC	4543-4563	AF103908.1	*RNAC, SV3, SV4*
54	UCUCCCUAUAUUACUGAUUTT AAUCAGUAAUAUAGGGAGATT CC	4687-4705	AF103908.1	*SV1, RNAC, SV3, SV4*
55	CUGUCCUUGUAAAUUACUUTT AAGUAAUUUACAAGGACAGTT AU	5022-5042	AF103908.1	*RNAC, SE2, SV1, SV2, SV3, SV4*
56	CCACUAUGGCACACGUAUATT UAUACGUGUGCCAUAGUGGTT AA	5348-5366	AF103908.1	*SV1, RNAC, SV2, SV3, SV4*
57	GCACACGUAUACCUGUGUATT UACACAGGUAUACGUGUGCTT UG	5356-5374	AF103908.1	*SV1, RNAC, SV2, SV3, SV4*
58	CACACGUAUACCUGUGUAATT UUACACAGGUAUACGUGUGTT GG	5357-5375	AF103908.1	*SV1, RNAC, SV2, SV3, SV4*
59	CACGUAUACCUGUGUAACATT UGUUACACAGGUAUACGUGTT CA	5359-5377	AF103908.1	*SV1, RNAC, SV2, SV3, SV4*
60	ACGUAUACCUGUGUAACAATT UUGUUACACAGGUAUACGUTT AC	5360-5378	AF103908.1	*SV1, RNAC, SV2, SV3, SV4*
61	CGUAUACCUGUGUAACAAATT UUUGUUACACAGGUAUACGTT CA	5379-5360	AF103908.1	*SV1, RNAC, SV2, SV3, SV4*
62	CCUGGCAAUAAAGAAUUUATT UAAAUUCUUUAUUGCCAGGTT CU	3547-3565	AF103908.1	*SV1, SE2*
63	UGAUGUAUCACCACCAUAUTT AUAUGGUGGUGAUACAUCATT	3714-	AF103908.1	*SE2*

	AA	3732		
64	ACCACAAUAUGCAUAAAUCTT GAUUUAUGCAUAUUGUGGUTT CA	3819-3838	AF103908.1	*SE2*
65	CCACAAUAUGCAUAAAUCUTT AGAUUUAUGCAUAUUGUGGTT AA	3820-3838	AF103908.1	*SE2*
66	UUGGCAUACUAUAUCAACUTT AGUUGAUAUAGUAUGCCAATT UC	5055-5075	AF103908.1	*SE2, SV2*
67	UGGCAUACUAUAUCAACUUTT AAGUUGAUAUAGUAUGCCATT CU	5056-5075	AF103908.1	*SE2, SV2*
68	GGCAUACUAUAUCAACUUUTT AAAGUUGAUAUAGUAUGCCTT UU	5057-5075	AF103908.1	*SE2, SV2*
69	UAACAAACCUACACAUUCUTT AGAAUGUGUAGGUUUGUUATT UG	5372-5391	AF103908.1	*SE2, SV2*
70	CUGCACAUGUAUCCCAGAATT UUCUGGGAUACAUGUGCAGTT UU	5390-5408	AF103908.1	*SE2*
71	CAUGUAUCCCAGAACGUAATT UUACGUUCUGGGAUACAUGTT CA	5395-5413	AF103908.1	*SE2*
72	UCCCAGAACGUAAAGUAAATT UUUACUUUACGUUCUGGGATT UA	5401-5419	AF103908.1	*SE2*
73	GCUACACACUGCUUGACAUTT AUGUCAAGCAGUGUGUAGCTT CA	3853-3871	AF103908.1	*SV1*
74	CUCCUCUUGACACAUAUUATT UAAUAUGUGUCAAGAGGAGTT CU	4385-4403	AF103908.1	*SV1, SV2, SV3, SV4*
75	GCUUACCAAUCCUCUCUCUTT AGAGAGAGGAUUGGUAAGCTT UC	4451-4469	AF103908.1	*SV1*
76	CCAACUCAUUAUCUUCUCUTT AGAGAAGAUAAUGAGUUGGTT	4648-4668	AF103908.1	*SV1*

	AU			
77	GGCCUUAAGUUCCUCUACUTT AGUAGAGGAACUUAAGGCCTT AU	126898-126916	AL359314.14	*SV2*
78	CCUCCAUAUUUGUCCUCCATT UGGAGGACAAAUAUGGAGGTT UC	127052-127070	AL359314.14	*SV2*
79	UCACUUAUCUCAACUUUGATT UCAAAGUUGAGAUAAGUGATT GG	3461-3479	AF103908.1	*SV2, SV3, SV4*
80	ACCACCAUAUCUCAUUAUUTT AAUAAUGAGAUAUGGUGGUTT UC	3723-3741	AF103908.1	*SV2, SV4*
81	CACCAUAUCUCAUUAUUCUTT AGAAUAAUGAGAUAUGGUGTT AC	3725-3743	AF103908.1	*SV2, SV4*
82	UGCAUGCAAGACUGCUGAATT UUCAGCAGUCUUGCAUGCATT CA	4772-4790	AF103908.1	*SV2*
83	GGUCACUUAUCUCAACUUUTT AAAGUUGAGAUAAGUGACCTT CU	3459-3477	AF103908.1	*SV3*

RNAC: Seqüência de RNA Completa, *SE2*: Seqüência de RNA com *Splicing* do exon 2, *SV*1: Seqüência de RNA *Splicing* Variante 1, *SV*2: Seqüência de RNA *Splicing* Variante 2, *SV*3: Seqüência de RNA *Splicing* Variante 3, *SV*4: Seqüência de RNA *Splicing* Variante 4.

Discussão

A falta de homologia entre as *ORFs* geradas e o banco de proteínas demonstram que permanece o papel de RNA não-codificante para o gene PCA3. Contudo, quanto ao estudo das variantes para esse gene, análises mais completas deverão ser realizadas em outras patologias e outros tipos tumorais para verificar o real impacto dessas moléculas, uma vez que foram encontradas preferencialmente no sangue periférico e podem ou não estarem associadas às patologias da próstata. No presente trabalho, 100% dos casos de câncer de próstata foi representado pela molécula com *splicing* do exon 2 do gene PCA3 em tecidos prostáticos, dados próximos aos reportados por Bussemarkers *et al.* (1999),[1] que descreveram a presença dessas moléculas em cerca de 95% dos casos de CaP, contudo para as variantes encontradas novas pesquisas no câncer de próstata deverão ser realizadas.

As ferramentas que alinham seqüências (DNA, RNA e proteína), como o *Blast*, são válidas para identificar regiões homólogas, que podem levar à descoberta de unidades funcionais; contudo, seu sucesso é mais evidente no estudo de DNA e proteínas do que de RNAs. Isso porque as similaridades de seqüências entre DNA e proteínas podem usualmente refletir sua relação funcional, enquanto informações adicionais da estrutura são necessárias para estudo da conservação de função entre os RNAs. Assim, para análise de RNA é preciso considerar sua informação seqüencial e estrutural.[8,9]

A análise preliminar de bioinformática para as moléculas variantes de RNA do gene PCA3 incluindo a molécula com *splicing* do exon 2, demonstraram que cerca de 61% das seqüências de oligonucleotídeos, obtidas a partir da formação das estruturas secundárias, foram concordantes em pelo menos cinco das seis moléculas de RNA analisadas. Além disso, a presença da SV1 e SV3 juntamente com a SE2 (dados obtidos pela RT-PCR *Nested*) e a maior associação entre a SV2 e SE2 para os oligonucleotídeos formados (dados obtidos pela análise de bioinfomática) podem sugerir que os transcritos do gene PCA3, embora apresente diferenças nas seqüências de seus RNAs, podem apresentar semelhanças estruturais como um mecanismo de escape a degradação frente à maquinaria celular de reconhecimento de alvos associados ao processo de carcinogênese

(molécula com *splicing* do exon 2), como também formas alternativas de gerar moléculas de RNA com função catalítica ou de oligonucleotídeos curtos com função de silenciamento das mensagens de genes alvos, conhecidos como RNAs de interferência (RNAi).

O papel intracelular do PCA3 dado pela sua estrutura secundária e pelas variantes descritas contendo elementos intrônicos, pode estar associado a uma função de miRNA, o qual atuaria num outro alvo de RNAm, provavelmente de genes *check points* de restrição do ciclo celular ou de indutores da perda de potencial de membrana mitocondrial, formando estruturas reconhecidas por RNAses e que impedem a passagem dos ribossomos pelos códons desse RNA no momento da tradução. A perda de expressão desses genes ocorreria por um mecanismo de repressão da tradução pela formação de RNAm dupla fita com o miRNA.

As moléculas de RNAi geradas pelo programa Sfold, além de sugerir função de miRNA para o PCA3, poderão ser testadas, *in vitro*, com função de inativar o próprio gene PCA3, como método terapêutico, ou ainda como meio de investigar a ação dessas moléculas sobre a expressão de outros genes, auxiliando a compreensão do complexo papel de regulação de possíveis vias gênicas e metabólicas associadas à gênese ou progressão tumoral.

Muitos estudos têm enfatizado o acúmulo de mutações, superexpressão ou perda de expressão em oncogenes codificando proteínas e em genes supressores tumorais, contudo a recente identificação de novas classes de RNAnc implica em passos importantes na formação e progressão do câncer. No futuro, haverá uma mudança entre os oncologistas e biologistas moleculares para identificação não apenas de proteínas codificantes que apresentam algum defeito, mas também quanto à transcrição de RNA não codificantes em células tumorais. Os miRNAs têm sido associados ao desenvolvimento de diversas doenças complexas como o câncer.[6] Frente à quantidade de RNAnc funcionais que têm sido descobertos, é esperado que tipos adicionais ainda sejam encontrados, sendo de fundamental importância as novas ferramentas de bioinformática para a identificação desses tipos de RNAs. Nos próximos anos os pesquisadores terão uma difícil tarefa a cumprir, compreender a biologia de eucariotos complexos

revelado pelas proteínas (Proteoma), pelos RNAnc (RNoma) e suas interações (Interactoma) em cada tipo de célula em um dado momento.

Referências Bibliográficas

1. Bussemakers MJ, Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HFM, Schalken JA, Debruyne FMJ, Ru N, Isaacs WB. DD3^{PCA3}: a new prostate-specific gene highly overexpressed in prostate cancer. Cancer Res 1999;59: 5975-5979.

2. Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeney LA, Aalders TW, Swinkels DW, Schalken JA. DD3^{PCA3}, a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. Cancer Res 2002;62:2695-2698.

3. Hessels D, Gunnewiek JMTK, van Oort I, Karthaus HFM, van Leenders GJL, van Balken B, Kiemeney LA, Witjes JA, Schalken JA. DD3^{PCA3}-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. Eur Urol 2003;44:8-16.

4. Verhaegh GW, Bokhoven A, Smit F, Schalken JA, Bussemakers MJG. Isolation and characterization of the promoter of the human prostate cancer-specific DD3^{PCA3} gene. J Biol Chem 2000;275:37496-37503.

5. Mattick J, Gagen MJ. The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. Mol Biol Evol 2001;18:1611-1630.

6. Costa F. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. Gene 2005;357:83-94.

7. Akashi H, Matsumoto S, Taira K. Gene discovery by ribozyme and siRNA libraries. Nature Rev 2005;6:413-422.

8. Liu J, Wang JTL, Hu J, Tian B. A method for aligning RNA secondary structures and its application to RNA motif detection. BMC Bioinformatics 2005; 6:1-20.

9. Vob B. Structural analysis of aligned RNAs. Nucleic Acids Res 2006;34:5471–5481.

10. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. Nat Rev 2003;4:457-467.

11. He L, Hanoon GI. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev 2004;5:522-531.

12. Ding Y, Lawrence CE. Rational design of siRNAs with the Sfold software. In RNA Interference: from Basic Science to Drug Development, ed. Krishnarao Appasani, Cambridge University Press, 2004.

13. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;62:156 –159.

14. Sambrook J, Fritsch EF, Miniatis T. Molecular Cloning: A Laboratorial Manual. Cold Spring Laboratory Press. Cold Spring. New York, EUA, 1989.