

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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *LSP1* NO
DIAGNÓSTICO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA
BENIGNA E DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Karla Saba de Freitas

**UBERLÂNDIA – MG
2006**

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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *LSP1* NO
DIAGNÓSTICO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA
BENIGNA E DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Aluna: Karla Saba de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

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

**UBERLÂNDIA - MG
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

F866a Freitas, Karla Saba de, 1976-

Análise da expressão do gene LSP1 no diagnóstico da
hiperplasia prostática benigna e do câncer de próstata /
Karla Saba de Freitas. - Uberlândia, 2006.

67f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Próstata - Teses. 2. Próstata - Câncer - Teses.
3. Próstata - Hipertrofia - Teses. I. Goulart Filho, Luiz
Ricardo. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 616.65

Palavras Chave do Trabalho: Próstata, Câncer e Hipertrofia

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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *LSP1* NO
DIAGNÓSTICO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA
BENIGNA E DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Karla Saba de Freitas

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: **Dr. Luiz Ricardo Goulart (Orientador)**

Examinadores: **Silvia Regina Rogatto
Laura Sterian Ward**

Data da Defesa:

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

Dr. Luiz Ricardo Goulart

Uberlândia, ____/____/____

Dedico este trabalho...

... ao meu marido Danielo, que foi o maior responsável pela realização deste trabalho. Obrigada pela ajuda, paciência e disponibilidade todas as vezes que precisei de você!!!

... aos meus pais, Georges e Neusa, por terem me proporcionado todas as oportunidades para a minha formação pessoal e profissional e à minha irmã Aline, amiga sincera de todos os momentos

Agradecimentos

Agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram na concretização deste trabalho. A todos de minha família e todos os amigos de quem recebi o estímulo sempre necessário para chegar a este momento,

Ao meu orientador Luiz Ricardo, pela confiança e incentivo, pela liberdade concedida e rigor nos momentos necessários.

À Ana Paula, Juliana, Andréia, Renata, Fausto, Guilherme, Rone, Carlos, Alexandra, Karina, Silvia, Fabiana, Rafael, Tiago e todos os outros do laboratório de genética, pela amizade, ajuda nas horas necessárias, trocas de conhecimentos, momentos de alegria e brincadeiras. Amizades que durarão para sempre,

Em especial às amigas Paula Cristina e Paula Souza, pelas inúmeras demonstrações de companheirismo, apoio em todos os momentos difíceis deste trabalho e principalmente pela amizade.

Aos amigos do grupo Cap, Elisangela, Isabella, Thaíse, Ana Paula, Carolina e Washington, pelo excelente trabalho feito em grupo, pela ajuda em todos os momentos. Agradeço em especial à Adriana, por ter me ajudado tanto nos momentos finais deste trabalho, me auxiliando nas análises estatísticas.

À prima Semia e à tia Ione, pela ajuda valiosa na correção deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABELAS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
INTRODUÇÃO GERAL	
• A Hiperplasia Prostática Benigna e o Câncer de Próstata -	01
• O Biomarcador <i>LSP1</i> -	06
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS -	08
CAPÍTULO ÚNICO	
1 – INTRODUÇÃO -	16
2 – OBJETIVO-	18
3 – MÉTODO E CASUÍSTICA -	19
4 – RESULTADOS -	31
5 – DISCUSSÃO -	41
6 – CONCLUSÕES -	46
7 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -	47
APÊNDICE -	55
ANEXOS -.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

CAP – Câncer de Próstata
cDNA – DNA complementar
DEPC – Dietil pirocarbonato
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNPTs – Desoxirribonucleotídeos
EDTA – Ácido Etileno diamino tetracético
HC – Hospital das Clínicas
HPB – Hiperplasia Prostática Benigna
KCl – Cloreto de Potássio
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
mL – Mililitro
mM – Milimolar
ng – Nanograma
PBS – Soro Fetal Bovino
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
Pro PSA – Proensima – PSA
PSA – Antígeno Prostático Específico
PSM – Antígeno Prostático Específico de Membrana
RNA – Ácido ribonucléico.
RT – Transcriptase Reversa
Taq – *Thermus aquaticus*
TNM – T-Tumor, N-Linfonodos, M-Metástases
UFU – Universidade Federal de Uberlândia
μM – Micromolar
M – Molar

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Distribuição da idade dos pacientes em anos conforme o grupo de estudo: HPB, câncer de próstata e grupo controle.

Figura II. Distribuição dos valores de PSA total pré-biópsia para os pacientes com HPB e câncer de próstata.

Figura III. Foto demonstrativa da análise da expressão do gene *LSP1* por RT-PCR em gel de agarose para os grupos do estudo.

Figura IV. Níveis de expressão do gene *LSP1* no sangue periférico de paciente com HPB, câncer de próstata e controle. Obtidos por meio de RT-PCR semi-quantitativa.

Figura V. Distribuição dos pacientes em número absoluto (N), conforme o grupo de estudo e suas respectivas taxas de expressão de *LSP1* no sangue.

Figura VI. Distribuição dos pacientes em incidência relativa (%), conforme as taxas de expressão de *LSP1* no sangue, para cada grupo do estudo.

Figura VII. Níveis de expressão do *LSP1* no sangue periférico de pacientes com câncer de próstata, discriminados conforme o estadio T(TNM).

Figura VIII. Níveis de expressão do *LSP1* no sangue periférico de pacientes com câncer de próstata, discriminados conforme o escore de Gleason.

Figura IX. Níveis de expressão do gene *LSP1* em amostras de tecidos de pacientes com HPB e câncer de próstata.

Figura X. Distribuição dos pacientes em incidência relativa (%), conforme as taxas de expressão de *LSP1* nos tecidos prostáticos, para cada grupo do estudo

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Distribuição dos pacientes por intervalo de expressão de acordo com o grupo de estudo.

Tabela II – Distribuição dos pacientes por patologia de acordo com o intervalo de expressão semi-quantitativa do *LSP1* no sangue.

Tabela III – Cálculo do “odds ratio” para os níveis de expressão do gene *LSP1* ≥ 1 , por regressão logística.

RESUMO

Marcadores biomoleculares capazes de diferenciar o câncer de próstata da hiperplasia prostática benigna têm sido pesquisados na tentativa de auxiliar ou mesmo suplantar a eficiência dos métodos tradicionais de avaliação dos pacientes (PSA e toque prostático).

O estudo em questão tem como objetivo a análise semi-quantitativa por RT-PCR do biomarcador (gene) *LSP1* em hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata. Procurou-se identificar qual o padrão de expressão do *LSP1* nessas patologias e sua aplicabilidade clínica.

Foram selecionados cinqüenta pacientes com mais de 40 anos, com indicação de biópsia prostática por toque retal alterado ou níveis de PSA > 4ng/ml. Vinte e cinco pacientes com menos de trinta anos de idade foram incluídos como controle para o estudo. Foram coletadas amostras de sangue para análise do *LSP1* e realizadas biópsias transretais. O resultado da análise patológica final foi considerado como padrão ouro ("standard") para definir os três grupos: câncer de próstata (24 pacientes) e hiperplasia prostática benigna (26 pacientes) e controle (25 pacientes). Os grupos de estudo foram analisados quanto aos intervalos de expressão do *LSP1*: ≥ 1 , de 0.5 a 1 e < 0.5 . Em uma segunda etapa, foi analisada expressão do *LSP1* em amostras de tecidos prostáticos.

Os resultados mostraram nítida diferença nos intervalos de expressão para amostras do sangue em cada grupo de estudo. Sobretudo para HPB e pacientes normais. Portadores de câncer de próstata apresentaram expressão intermediária. A incidência de HPB para expressões superiores a 1.0 é onze vezes maior que a de câncer de próstata.

Apesar de não ser específico para só uma patologia, o *LSP1* representa uma proposta promissora como método complementar ao PSA.

ABSTRACT

Several molecular markers have been studied in order to differentiate prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH). They tried to help the traditional methods in the patient evaluation (PSA and digital rectal exam).

This study analyzed the *LSP1* gene expression by RT-PCR in BPH and prostate cancer patients. We tried to identify the specific pattern of each pathology related to the gene expression.

Fifty patients more than forty years old were selected based on PSA levels > 4ng/ml or altered digital rectal exam. Twenty five healthy patients with less than thirty years old were selected as a control group. Blood sample analyses were performed as prostatic core biopsies. The final pathology was the gold standard for diagnosis defining three study groups: PCa, 24 patients; BPH, 26 patients and control, 25 patients. The study analysis was performed based on intervals of *LSP1* RT-PCR expression, defined as ≥ 1 , from 0.5 to 1 and < 0.5 . A second study phase analyzed *LSP1* expression in prostatic tissues from specimens of twenty three patients.

The results in blood sample showed a clear difference in intervals of *LSP1* expression for the study groups. The BPH patients presented the higher expression, prostate cancer patients with median expression and control group with the lower one. The relative risk of BPH in *LSP1* expressions ≥ 1 is eleven times greater than prostate cancer.

Although, it is not a specific marker for prostate cancer or benign hyperplasia. The *LSP1* analysis represents a promising complementary purpose to PSA.

INTRODUÇÃO GERAL

A Hiperplasia Prostática Benigna e o Câncer de Próstata

O câncer da próstata é o tumor mais diagnosticado nos homens, representando a segunda causa de morte por tumor maligno nos Estados Unidos, tendo ultrapassado em frequência os tumores do pulmão e do cólon (BRUNINI et al, 1992; BOYLE; SEVERI; GILLES, 2003).

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) caracteriza-se por um aumento notório do componente acinar prostático em relação aos componentes intersticial e capsular, acarretando, por consequência, aumento volumétrico da próstata. Esse aumento benigno ocorre sempre após os 35 anos de idade, sendo responsável por vários sintomas do trato urinário inferior em homens (STAMEY, MCNEIL, 1992; CATALONA, ANTENOR et al. 2002; KRUMHOLTZ, CARVALHAL et al. 2002; CATALONA 2004)

Essas duas patologias conferem risco e prognóstico bastante diferentes aos pacientes. Contudo incidem sobre a mesma faixa etária. A neoplasia prostática, em estágios iniciais, apresenta alterações clínicas e laboratoriais semelhantes à hiperplasia benigna. Além do fato de ambas poderem co-existir, complicando ainda mais o diagnóstico preciso. Esses fatos dificultam sensivelmente a diferenciação dessas patologias (KRUMHOLTZ, CARVALHAL et al. 2002; CATALONA 2004).

Apesar da grande evolução observada após a introdução do antígeno prostático específico (PSA), nota-se um aumento progressivo no número de biópsias transretais, muitas vezes, desnecessárias. Ao longo de mais de vinte anos da era do PSA, muitos fatos foram elucidados. Porém permanecem muitas dúvidas acerca da diferenciação clínica entre a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata inicial (STAMEY, CALDWELL et al., 2004).

Estudos em necrópsias mostraram que 80% dos homens acima dos 80 anos de idade apresentam neoplasia da próstata, quando a glândula é estudada por meio de cortes seriados (SCOTT e et al, 1969). Segundo Franks (1973), 30% dos homens acima de 50 anos de idade têm câncer prostático latente e indetectável durante

muitos anos. A incidência varia de 10%, aos 50 anos, para 80% aos 80 anos de idade, duplicando a cada década após os 50 anos de idade.

O risco do câncer da próstata aumenta de 3 a 6 vezes nos pacientes com história familiar desse câncer, nos parentes de 1º e de 2º grau (CUSSENTE; VALERI 2001).

O câncer da próstata apresenta incidência variável de acordo com as regiões geográficas, sendo a mais baixa no extremo Oriente; intermediária na Europa central e Estados Unidos; e mais elevada nos países Nórdicos (KURTH; MICKISCH; SCHRÖDER, 1999).

O exame digital retal da próstata possui uma sensibilidade de 67% a 69% e especificidade de 89% a 97%, de acordo com Guinan et al (1980) e Vihko et al (1985). Contudo estudo mais recente demonstrou um valor preditivo positivo isolado de apenas 21%, segundo Catalona et al (1994 b).

O antígeno prostático específico (PSA) é uma glicoproteína produzida pelas células colunares do epitélio dos ácinos e ductos prostáticos normais, sendo as células colunares circundadas pela camada de células basais, que, por sua vez, são circundadas pela membrana basal e interstício (BRAWER; KIRBY, 1998). Para que o PSA e as células metastáticas tenham acesso à circulação sanguínea, é preciso vencer essa barreira e ainda o endotélio capilar.

Os níveis de PSA do sangue dependem diretamente do volume de tecido prostático, seja este benigno ou maligno (STAMEY; YANG; HAY, 1987; STAMEY; MCNEIL, 1992).

Na hiperplasia prostática benigna (HPB), cada grama de tecido eleva os níveis séricos de PSA em 0,31 ng/ml (dosado pela metodologia Yang), sendo que, nos casos de adenocarcinoma da próstata, cada grama de tecido neoplásico aumenta os níveis séricos do PSA em 3,5 ng/ml (dez vezes mais, dosado pela metodologia Yang). Este fato também demonstra que quanto maior os valores do PSA maior é o volume do tumor do paciente, (STAMEY; YANG; HAY, 1987).

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

Como os níveis séricos de PSA elevam-se já em fase inicial da doença, acreditou-se ser este um método eficaz na detecção precoce do câncer de próstata.

Contudo a baixa especificidade desse exame torna-o isoladamente, pouco relevante como método de diagnóstico precoce da neoplasia.

Catalona et al (1994 b) mostraram que o valor positivo mais alto, de 55%, foi encontrado quando o paciente apresentava simultaneamente, alterações no toque retal e no PSA. No PSA sozinho, houve valor preditivo positivo de apenas 32%, pouco mais alto do que o valor preditivo positivo da alteração do toque retal isolada, que foi de 21%.

Após prostatectomia radical, os níveis de PSA tornam-se indetectáveis (PSA igual ou menor que 0,04 ng/ml) em mais de 91% dos pacientes. Este comportamento tem grande valor prognóstico, sendo utilizado nos controles pós-operatórios da cirurgia (OESTERLINK et al, 1988; STAMEY; CABALIM, 1989).

Algumas alternativas para melhorar a performance do PSA, com aumento de sensibilidade e especificidade, são rotineiramente utilizadas. Dentre estas, a análise do PSA em diferentes níveis de corte, o emprego da densidade e velocidade de crescimento do PSA e ainda a relação PSA livre / PSA total (CATALONA, BARTSCH et al. 2003; D'AMICO, CHEN ET al. 2004) Compondo o que hoje é aceito como raciocínio crítico e particularizado do PSA.

O ponto de corte para indicação de biópsia da próstata em torno de 4,0 ng/ml tem sido progressivamente abandonado. Estudos recentes sugerem que o ponto de corte para indicação de biópsia deve ser 2,5 ng/ml, apesar de apontarem para o alto índice (média de 75%) de patologias benignas diagnosticadas em biópsias na faixa entre 2,5 ng/ml e 4,0 ng/ml.

Algumas combinações dos testes positivos, tais como: o toque retal positivo, PSA total bioquímico maior do que 4,0 ng/ml, presença de lesões hipoecóicas no ultra-som transretal da próstata, aumentam o valor preditivo para o câncer da próstata (BRAWER & KIRBY, 1998). Porém estes casos apresentam prognóstico bastante desfavorável em relação ao tumor diagnosticado sem alterações aparentes (STAMEY 2004; STAMEY, CALDWELL et al. 2004). Atualmente, busca-se diagnosticar a neoplasia antes que esta se torne clinicamente relevante em todos esses testes.

O PSA é um método específico para a próstata, podendo alterar-se em condições benignas e malignas, não possuindo, portanto, total especificidade por nenhuma das duas condições. A análise da sua variação, a velocidade e demais parâmetros podem indicar a maior ou menor chance de cada condição. Porém somente o diagnóstico anátomo-patológico pode elucidar com certeza o diagnóstico.

Tanto o câncer da próstata quanto a hiperplasia prostática benigna são diagnosticados pelo exame patológico de material obtido pela biópsia da próstata. No entanto a biópsia é um exame invasivo, com riscos de infecção e extremamente desagradável para o paciente. São retirados pelo menos seis fragmentos de cada lobo da próstata, incluindo fragmentos de áreas suspeitas ao ultra-som.

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

O câncer da próstata é sabidamente uma doença multifocal, o que leva à possibilidade de sub-estadiamento dos escores das biópsias em relação aos das peças cirúrgicas. Segundo Stainberg et al (1997), o sub-estadiamento dos escores de Gleason das biópsias em relação aos escores das peças cirúrgicas poderia ser justificado pelo fato de o tumor ser multifocal. Também pela subjetividade da leitura da lâmina, pelos achados no tumor de áreas limítrofes entre um escore e outro e pela amostragem, uma vez que a quantidade de tecido disponível para exame na biópsia é menor em relação à quantidade disponível nas peças cirúrgicas.

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

Em relação ao estadiamento patológico pela classificação TNM 92, 50% dos pacientes são sub-estadiados no estadiamento clínico. Sabendo-se que a maior chance de cura ocorre com o estágio inicial T1N0M0 (CATALONA; DRESNER, 1985; VOGES et al; 1992).

Com tantas variáveis em questão, existe real necessidade de diferenciação entre a hiperplasia benigna e o câncer de próstata realmente inicial ou T1. O PSA não representa um método isolado eficiente, sobretudo, abaixo de 4,0ng/ml. O número de biópsias desnecessárias aumentou drasticamente. E mesmo em casos multi-biópsiados (mais de três biópsias realizadas) encontra-se dificuldade de chegar a um diagnóstico seguro.

A identificação de células metastáticas no sangue periférico tornou-se possível com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis e colaboradores em 1987, o que lhe valeu o prêmio Nobel de Química de 1993. O aperfeiçoamento da técnica de PCR e a síntese de “Primers” (iniciadores) de biomarcadores específicos permitiram aumento de acurácia neste sentido (SAIK et al; 1985; SMITH et al, 1991; MATTANO et al, 1982; MORENO et al; 1992).

Desde então, diversos biomarcadores estão sendo isolados. O estudo de suas expressões em amostra de sangue periférico e/ou de tecidos tem fornecido importantes informações, em várias linhas de pesquisa (CANTO; SHARIAT; SLAWIN, 2003; KATTAN & SCARDINO, 2003). Atualmente, estudos sobre o diagnóstico molecular do câncer da próstata e outras afecções prostáticas representam uma nova possibilidade de auxílio ao PSA. Esses estudos representam tentativas de melhoria da segurança no diagnóstico, no controle pós-tratamento e no acompanhamento clínico dos pacientes. Representando promessas de incorporação na prática clínica (BUSSEMAKERS et al, 1999; HIROYOSHI et al, 2004; ROGERS et al, 2004; ORNSTEIN et al, 2004).

O Biomarcador *LSP1*

O gene *LSP1* – Leukocyte Specific Protein 1 é responsável pela produção de uma proteína citoplasmática multifuncional envolvida em diversos mecanismos biológicos, tais como: regulação da motilidade de neutrófilos e quimiotaxia, aderência da Imunoglobulina M – IgM à membrana celular; composição do cito-esqueleto; e indução de apoptose mediada por células B. O *LSP1* está expresso em linfócitos, neutrófilos e macrófagos, mas não nas demais linhagens hematológicas, ou mesmo em outras células (JONGSTRA, TIDMARSH et al. 1988; KLEIN, JONGSTRA-BILEN et al. 1989; KLEIN, GALEA et al. 1990; JONGSTRA-BILEN, JANMEY et al. 1992; JONGSTRA, ITTEL et al. 1994; JONGSTRA-BILEN, WIELOWIEYSKI et al. 1999; WONG, MALAPITAN et al. 2003).

Em algumas neoplasias do sistema imune, como linfomas, leucemias e doença de Hodgking, o *LSP1* é descrito como marcador específico, sendo, em alguns casos, superior ao CD45 já sedimentado na literatura (JONGSTRA-BILEN, WIELOWIEYSKI et al. 1999; MARAFIOTI, JABRI et al. 2003). Entretanto sua especificidade como marcador de leucócitos humanos já havia sido descrita anteriormente (PULFORD, JONES et al. 1999).

Recentemente, foi descoberta a expressão do *LSP1* em células endoteliais na microcirculação, sendo este o primeiro sítio identificado fora dos leucócitos. Sua função, contudo, está intimamente relacionada a estes, promovendo a formação de “gaps” com a passagem dos leucócitos para locais específicos do organismo facilitando, assim, a resposta imunológica local (LIU, CARA et al. 2005).

Vários estudos demonstraram que o *LSP1* está intimamente relacionado à resposta imune do organismo, atuando em diferentes níveis. Este potencial se relaciona às neoplasias do próprio sistema imune, mas também em situações de inflamações sistêmicas inespecíficas. O *LSP1* modula a resposta imune de leucócitos em peritônio normal e inflamado (JONGSTRA-BILEN, MISENER et al. 2000). Ele também atua como indutor de apoptose mediada por células B, em situações anormais em que linfócitos com atividade auto-imune e células do baço

imaturas permaneçam na circulação (NEMAZEE AND BUERKI 1989; JONGSTRA-BILEN, WIELOWIEYSKI et al. 1999).

Portanto, o *LSP1* representa um biomarcador de grande importância para o funcionamento do sistema imune em diversas situações. Desde a vigilância imunológica até em respostas imunes frente a inflamações e neoplasias. Apesar do grande enfoque em doenças do sistema imune, sua atuação frente a afecções prostáticas não foi estudada.

A análise por **RT-PCR** semi-quantitativo para o *LSP1* é uma grande promessa para avaliação de afecções locais com consequências sistêmicas. Neste contexto, podem enquadrar-se a neoplasia de próstata e a hiperplasia prostática benigna, que, apesar de iniciarem como processos locais, podem evoluir com complicações fora do sítio prostático.

Oliveira Jr. et al. (2003) identificaram pela primeira vez o *LSP1* por display RT-PCR no sangue periférico de pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Este estudo inovador abriu uma nova opção de biomarcador para estas patologias.

Com base nesses fatos, idealizou-se um estudo capaz de avaliar o padrão de expressão do *LSP1* e sua utilidade na diferenciação entre a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata.

REFERÊNCIAS GERAIS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

BOYLE, P.; SEVERI, G.; GILLES, G.G. The epidemiology of Prostate Cancer, in Localized Prostate Cancer. The Urological Clinics of North America v 30, p 209-217, may, 2003.

BRAWER, M. K.; KIRBY. **Prostate Specific Antigen**. Abingdon: Nuffield Press, 1998, 75 p.

BRUNINI, R.; TORLONI, H.; HENSON, D. E.; GLOTIEB, S. L. D.; SOUZA, J. M. P. **Câncer no Brasil**. Dados histopatológicos 1976-1980. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1992, 198 p.

BUSSEMAKERS, M. J.; VON BOKHOVEN, A. et al. DD3: a new prostate-specific gene highly overexpressed in prostate cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v 59, n 23, p 5.975-5.979, 1999.

CANTO, E.I.; SHARIAT, F.S.; SLAWIN, K.M. Biochemical staging of prostate cancer, in Localized Prostate Cancer. **The Urological Clinics of North America**, Philadelphia, v 30, n 2, p 263-277, may, 2003.

CATALONA, W. J.; DRESNER, S. M. Nerve-sparing radical prostatectomy: extraprostatic tumor extension and preservation of erectile function. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 134, p 1.149, 1.985.

CATALONA, W. J.; RICHIE, J. P.; AHMANN, F. R. Comparison of DRE and serum PSA in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 151, p 1.283-1.290, 1994.

CATALONA, W. J.; ANTENOR, J. A. ET AL. SCREENING FOR PROSTATE CANCER IN HIGH RISK POPULATIONS. THE JOURNAL OF UROLOGY, **BALTIMORE**, v **168**, n **5**, p **1.980-1.984**, **2002**.

CATALONA, W. J.; BARTSCH, G. ET AL. SERUM PRO PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN IMPROVES CANCER DETECTION COMPARED TO FREE AND COMPLEXED PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN IN MEN WITH PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN 2 TO 4 NG/ML. THE JOURNAL OF UROLOGY, **BALTIMORE**, v **170**, n **6** , p **2.181-2.185**, **2003**.

CATALONA, W. J. PROSTATE CANCER SCREENING. INTERNATIONAL BRITISH JOURNAL OF UROLOGY, v **94**, n **7**, p **964-966**, **2004**.

CUSSENOT, O.; VALERI, A. Heterogeneity in genetic susceptibility to prostate cancer. **European Journal of Internal Medicine**, Basel, v 12, p 11-16, 2001.

D'AMICO, A. V. ; CHEN, M. H. et al. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v 351, n 2, p 125-135, 2004.

FRANKS, L. M. Etiology, epidemiology of prostate cancer. **Cancer**, Philadelphia, v 32, p 1.092, 1973.

GHINAN, P. P.; BUSH, I.; RAY, V. et al The accuracy of rectal examination in the diagnosis of prostate carcinoma. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v 303, p 499, 1980.

GLEASON, D. F. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum, M (Ed). **Urologic Pathology**: The prostate. Philadelphia: Lea e Febiger, 1977, 121 p.

HYROYOSHI, S.; AKAKURA, K.; IGARASHI, T. et al, Clinical usefulness of serum Anti-p53 antibodies for prostate cancer detection: A comparative study with prostate specific antigen parameters. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 171, n 1, p 182-186, 2004.

JONGSTRA, J., M. E. ITTEL, et al. "The LSP1 gene is expressed in cultured normal and transformed mouse macrophages." **Molecular Immunology** 31(15): 1125-31, 1994.

JONGSTRA, J., G. F. TIDMARSH, et al. "A new lymphocyte-specific gene which encodes a putative Ca²⁺-binding protein is not expressed in transformed T lymphocyte lines." **The Journal of Immunology** 141(11): 3999-4004, 1988.

JONGSTRA-BILEN, J., P. A. JANMEY, et al. "The lymphocyte-specific protein LSP1 binds to F-actin and to the cytoskeleton through its COOH-terminal basic domain." **The Journal of Cell Biology** 118(6): 1443-53, 1992.

JONGSTRA-BILEN, J., V. L. MISENER, et al. "LSP1 modulates leukocyte populations in resting and inflamed peritoneum." **Blood** 96(5): 1827-35, 2000.

JONGSTRA-BILEN, J., A. WIELOWIEYSKI, et al. "LSP1 regulates anti-IgM induced apoptosis in WEHI-231 cells and normal immature B-cells." **Molecular Immunology** 36(6): 349-59, 1999.

KATTAN, M.W.; SCARDINO, P. T. Markers and meaning of primary treatment failure in Localized Prostate Cancer. **The Urological Clinics of North America**, Philadelphia, v 30, p 377-401, may, 2003.

KLEIN, D. P., S. GALEA, et al. "The lymphocyte-specific protein LSP1 is associated with the cytoskeleton and co-caps with membrane IgM." **The Journal of Immunology** 145(9): 2967-73, 1990.

KLEIN, D. P., J. JONGSTRA-BILEN, et al. "Lymphocyte-specific Ca^{2+} -binding protein LSP1 is associated with the cytoplasmic face of the plasma membrane." **Molecular Cell Biology** 9(7): 3043-8, 1989.

KRUMHOLTZ, J. S.; CARVALHAL, G. F. et al. "Prostate specific antigen cutoff of 2.6 ng/ml for prostate cancer screening is associated with favorable pathologic tumor features." **Urology** v 60, n 3, p 469-474, 2002.

KURTH, K. H.; MICKISCH, G. H.; SCHRÖDER, F.H. **Renal, bladder and prostate cancer**, New York: Partheon Publishing Group, 1999, 290 p.

LANGE, P. H.; ERCOLE, C. J.; VESSELA, R. Tumor markers in the follow-up of initial therapy of prostate cancer. In Lange, P H: **Tumor markers in prostate cancer**. Amsterdam, Excerpta Medica, 1986, 125 p.

LIU, L., D. C. CARA, et al. "LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration." **J Exp Med** 201(3): 409-18, 2005.

MATTANO JR., L.A.; MOSS, T.J.; EMERSON, S.G. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Cancer Research**, Baltimore v 52, p 4.701-4.705, 1992.

MARAFIOTI, T., L. JABRI, et al. "Leukocyte-specific protein (LSP1) in malignant lymphoma and Hodgkin's disease." **British Journal of Hematology** 120(4): 671-8, 2003.

MORENO, J. G.; GRODE, C. M.; FISHER, R. et al. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v 53, p 6.110-6.112, 1992.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Method Enzymologist**, New York, v 55, p 335-350, 1987.

NEMAZEE, D. AND K. BUERKI. "Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras." **Proc Natl Acad Sci U S A** 86(20): 8039-43, 1989.

OESTERLING, J. E.; CHAN, D. W.; EPSTEIN, J. I. et al. Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. **The Journal of Urology**, Baltimore v 139, p 766, 1988.

OLIVEIRA JR., W.P.; OLIVEIRA, D.D.J.; MEOLA, J.; NEVES, F.A. et al. Gene expression in tumors and hyperplasic prostatic tissues by differential display-RT-PCR. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 2003.

ORNSTEIN, D. K.; RAYFORD, V. A.; FUSARO, V. A. et al. III serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total specific antigen levels between 2.5 and 25 ng/ml. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 172, n 4, p 1.302-1.305, 2004

PARTIN, W. A.; MANGOLD, D. L.; WALSH, P. C. et al. Contemporany update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. **Urology**, Secaucus, v 59, p 843-848, 2001.

PULFORD, K., M. JONES, et al. "Lymphocyte-specific protein 1: a specific marker of human leukocytes." **Immunology** 96(2): 262-71, 1999.

ROGERS, C.G.; YAN, G.; ZHA, S. et al. Prostate cancer detection un uroanalysis for α -methylacy coenzyme a racemase protein. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 172, n 4, p 1.501-1.503, 2004.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J.; FACOONA, F. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v 230, p 1.350-1.354, 1985.

SCHRÖDER, F. H.; HERMANEK, P.; FAIR, W. R. et al. The TNM classification of prostate cancer. **Prostate**, New York, v 4, p 129-138, 1992.

SCOTT JR., R.; MUTCHNIK, D. L.; LASKOWSKI, T. Z.; SCHMALHORST, W. R. Carcinoma of the prostate in elderly men, incidence, growth characteristics and clinical significance. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 101, p 602, 1969.

SMITH, B.; SELBY, B.; SOUTHGATE, J. et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by by menas of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. **Lancet**, London, v 338, p 1.227-1.229, 1991.

STAMEY, T. A.; YANG, N.; HAY, A. R. Prostate specific antingen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v 317, p 909-916, 1987.

STAMEY, T.A.; KABALIN, J.N. Prostate specific antigen in the diagnoses and treatment of adenocarcinoma of the prostate: I. Untreated patients. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 141, p 1.070-1.075, 1989.

STAMEY, T. A.; MCNEIL, J. E. Adenocarcinoma of the prostate. In **Campbell's Urology**. 6 ed. Edited by Walsh P C; Retik AB Stamey T A; Vaughan Jr. E D . Philadelphia Saunders Co., v 2, p 1.159-1.221, 1992.

STAMEY, T. A. THE ERA OF SERUM PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN AS A MARKER FOR BIOPSY OF THE PROSTATE AND DETECTING PROSTATE CANCER IS NOW OVER IN THE USA. INTERNATIONAL BRITISH JOURNAL OF UROLOGY, v 94, n 7, p 963-964, 2004.

STAMEY, T. A.; CALDWELL, M. et al.. "The Prostate specific Antigen in the United States is over for Prostate cancer: what happened in the last 20 years?" **THE JOURNAL OF UROLOGY**, Baltimore, v 172, n 4 (pt 1), p 1.297-1.301, 2004.

STEINBERG, D.M.; SAUVAGEOT, J.; PIATANDOSI, S.; EPTEIN, J.I. Correlation between needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. **American Journal of Surgery Pathology**, Philadelphia, v 21, p 566-576, 1997.

VIHKO, P.; KONTTURI, M.; LUKKARINEN, O. et al. Screening for carcinoma of the prostate. Rectal examination, and enzymatic radio-immunologic measurements of serum acid phosphatase compares. **Cancer**, Philadelphia, v 56, p 173, 1985.

VOGES, G. E.; MCNEIL, J. E.; REDWINE, E. et al. Morphologic analysis of surgical margins with positive findings in prostatectomy for adenocarcinoma of the prostate. **Cancer**, Philadelphia, v 69, p 520, 1992.

WONG, M. J., I. A. MALAPITAN, et al. "A cell-free binding assay maps the LSP1 cytoskeletal binding site to the COOH-terminal 30 amino acids." **Biochim Biophys Acta** 1642(1-2): 17-24, 2003.

CAPÍTULO ÚNICO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *LSP1* NO DIAGNÓSTICO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA E DO CÂNCER DE PRÓSTATA

1. INTRODUÇÃO

O câncer da próstata e a hipertrofia prostática benigna (HPB) representam as patologias prostáticas de maior relevância na clínica urológica (BRUNINI et al, 1992; BOYLE; SEVERI; GILLES, 2003). Estas patologias definem prognósticos distintos, mas sua diferenciação é muitas vezes difícil; acarretando um número acentuado de biópsias transretais desnecessárias (STAMEY 2004; STAMEY, CALDWELL et al. 2004).

Apesar da evolução do PSA nos últimos anos, este se mostrou pouco eficaz em tumores realmente iniciais, sobretudo em valores abaixo de 4ng/mL. (CATALONA, ANTENOR et al. 2002; KRUMHOLTZ, CARVALHAL et al. 2002; CATALONA 2004)

Atualmente a procura pelo diagnóstico precoce, antes mesmo que o tumor possa ser detectado pelo toque, ou seja estadio T1, é uma constante. Sabe-se que os índices de cura nestes casos são bastante superiores aos demais estadios (STAMEY 2004; STAMEY, CALDWELL et al. 2004). Daí a necessidade de novas formas de diagnóstico.

A busca por novos biomarcadores com capacidade de auxiliar o raciocínio do PSA ou mesmo suplantá-lo, é hoje uma realidade (CANTO; SHARIAT; SLAWIN, 2003; KATTAN & SCARDINO, 2003). Muitas propostas em nível molecular tem sido estudadas (BUSSEMAKERS et al, 1999; HIROYOSHI et al, 2004; ROGERS et al, 2004; ORNSTEIN et al, 2004).

O gene *LSP1* teve sua expressão relacionada a diversos eventos do sistema imune, em situações de inflamações, neoplasias hematológicas e vigilância imunológica; participando em diferentes níveis moleculares (NEMAZEE AND

BUERKI 1989; JONGSTRA-BILEN, WIELOWIEYSKI et al. 1999). Mas, foi a sua identificação fora dos leucócitos que despertou interesse sobre a atuação em outras patologias (JONGSTRA-BILEN, MISENER et al. 2000; LIU, CARA et al. 2005)

Estudo pioneiro de Oliveira Jr. et al. (2003) demonstrou, por meio de display-RT-PCR, que o *LSP1* estava expresso em HPB bem como em câncer de próstata. Porém com intensidades diferentes. Contudo, pouco se sabe sobre sua repercussão clínica ou expressão em pacientes normais.

Para tanto, foi idealizado um estudo capaz de avaliar a uma só vez a expressão do *LSP1* em HPB e câncer de próstata, comparando os níveis de expressão com os de pacientes jovens e saudáveis.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o nível de expressão do gene ***LSP1*** e seu potencial como marcador molecular na hiperplasia prostática benigna (**HPB**) e no câncer de próstata (**CAP**).

3. MÉTODO E CASUÍSTICA

3.1 DESENHO

O estudo foi realizado de forma prospectiva, duplo cego e randomizada, em duas etapas. Sendo, a primeira com setenta e cinco pacientes consecutivos para análise em sangue periférico e a segunda com vinte e três pacientes para análise em tecidos prostáticos.

3.2 LOCAL E ÉPOCA

O estudo foi efetuado durante vinte e um meses, no período de março de 2004 a novembro de 2005, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – UFU. O estudo envolveu o Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) e a disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina (FAMED), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.3 PACIENTES

Foram avaliados setenta e cinco pacientes do sexo masculino, consecutivos e com idades entre 13 e 82 anos, para coleta de amostras de sangue periférico. Dentre estes, vinte e cinco foram selecionados com idades inferiores a 30 anos (variando de 13 a 29), como controle negativo para o estudo. Esses pacientes foram

voluntários para a coleta de sangue periférico e estavam clinicamente assintomáticos. É sabido que tanto a hiperplasia prostática benigna quanto o câncer de próstata ocorrem após os 30 anos de idade.

Cinquenta pacientes com idades entre 44 e 82 anos foram selecionados para estudo de HPB e câncer de próstata com coletas em sangue periférico. Outros vinte e três pacientes foram selecionados, em uma segunda etapa, para análise em tecidos de biópsias transretais.

Todos os pacientes passaram por avaliação clínica e urológica inicial em ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas da UFU. Os pacientes com mais de quarenta anos, candidatos ao rastreamento urológico, foram selecionados e ingressaram no estudo respeitando os critérios abaixo.

Critérios de inclusão: todos os pacientes com toque transretal suspeito e/ou níveis séricos de PSA > 4,0 ng/mL, que foram submetidos ao rastreamento ambulatorial.

O rastreamento foi realizado pelo Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da UFU. Sendo iniciado para os pacientes com mais de 50 anos, sem história familiar de câncer de próstata, e, a partir dos 40 anos, nos casos com história familiar ou em pacientes de raça negra. A avaliação também incluiu análise de sintomas do trato urinário inferior que freqüentemente estão relacionados à presença de Hiperplasia Prostática Benigna.

Os pacientes foram submetidos ao exame digital retal de próstata e à dosagem bioquímica do PSA no sangue periférico. Todos os pacientes também seguiram a rotina do serviço, com exames laboratoriais e avaliação cardíaco-anestésica do risco cirúrgico para a realização da biópsia transretal, quando indicada.

Os raios-x da bacia, coluna lombo-sacral, fêmures ou a cintilografia óssea pelo Tecnécio (Radioisótopos) foram realizados naqueles com PSA maior ou igual 10 ng/mL no sangue e nos com dor óssea, independente do nível PSA.

Critérios de exclusão: pacientes com história prévia de irradiação pélvica ou outro tratamento prévio para câncer de próstata, evidência de infecção urinária nos últimos três meses; uroanálise e/ou cultura de urina alterados na avaliação inicial; febre de origem não definida; instrumentação endoscópica urinária nas últimas duas semanas; portadores de próteses em geral; portadores de doenças valvulares; vigência de antibioticoterapia e pacientes em profilaxia para endocardite bacteriana; pacientes em uso de cateter vesical de demora.

3.4 MATERIAL

Os pacientes com suspeita de câncer de Próstata foram submetidos à biópsia de próstata via transretal para análise patológica dos fragmentos obtidos e análise da expressão do *LSP1*.

Foi empregada antibiótico-profilaxia (ciprofloxacina 500 mg via oral a cada 12 h. durante sete dias). A biópsia foi guiada ou não por ultra-som transretal, utilizando-se o conjunto de pistola automática e agulha (BARD - 18 G. x 20 cm, referência MC 1820). Procurou-se, de rotina, retirar, no mínimo, 12 fragmentos, seis do lobo direito e seis do lobo esquerdo.

No ultra-som a inclusão das áreas suspeitas na biópsia foi a rotina. O aparelho utilizado foi o Aloka SSD – 2000 Multiview™, utilizando transdutor transretal 7,5MHz/60deg./40mmR UST-9101-7,5.

3.5 INTERVENÇÃO - Procedimento

Avaliação clínica

Para os pacientes com menos de trinta anos do grupo controle, foi realizada apenas avaliação clínica geral com questionário e exame físico. Em seguida foram coletadas amostras de sangue periférico para análise da expressão do *LSP1*.

Os demais pacientes candidatos ao rastreamento de HPB e câncer de próstata ingressaram no hospital pela manhã e passaram por uma primeira etapa de avaliação em nível ambulatorial, constituída também de história e exame clínico, incluindo questionário específico e detalhado de sinais e sintomas, antecedentes clínicos, medicações em uso, cirurgias prévias, exame físico e toque digital retal. A confirmação de estado febril foi considerada quando temperatura axilar fosse superior a 37,5°C.

Foi também realizada avaliação laboratorial, incluindo dosagem de Antígeno Prostático Específico (PSA) no sangue, coleta de sangue para dosagem de *LSP1*, uroanálise e cultura de urina.

Todas as amostras de urina foram semeadas nos meios de cultura: ágar sangue e ágar Mac Conkey ou ágar eosina azul de metileno. Considerou-se infecção do trato urinário o crescimento de 10^5 colônias ou mais/ml. ou formação de colônias entre 10^3 e 10^5 colônias/ml (FONG et al, 1991).

Após preencherem os critérios de inclusão e exclusão do estudo, os pacientes retornaram ao setor de Urologia onde era agendada a biópsia transretal. Nesse momento, eram explicados aos pacientes todos os detalhes, riscos e benefícios do procedimento. Eles somente eram submetidos à biópsia mediante consentir e permitir realizar procedimentos cirúrgicos (termo de consentimento em anexo I).

Todos os pacientes do grupo controle e os demais com critérios de inclusão para o estudo concordaram em participar e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido deste estudo, aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa (CEP), da UFU.

Biópsias transretais

As biópsias foram realizadas no Centro Cirúrgico, pelos médicos do Serviço de Urologia do HC, UFU. O paciente era sempre posicionado em litotomia clássica, sendo realizada anestesia local com gel de Lidocaína a 2%.

O procedimento foi sempre realizado por via transretal, e os pacientes iniciavam o uso do antibiótico 24 horas antes da biópsia. Foram retirados, pelo

menos, seis fragmentos de cada lobo prostático, sendo estes acondicionados em 2 frascos com formol a 10% e enviados para estudo anátomo-patológico.

Posteriormente, e já com o diagnóstico final de anatomia patológica, os pacientes eram encaminhados para o tratamento cirúrgico definitivo. Respeitando a técnica e as indicações de cada patologia urológica individualmente. Ou seja, prostatectomia radical, para o câncer de próstata, e prostatectomia transvesical ou ressecção endoscópica da próstata, para hiperplasia prostática benigna.

Para estudo em tecidos, as peças cirúrgicas foram analisadas a fresco em cortes finos e confirmada a presença de HPB ou câncer de próstata. Após isto, fragmentos de tecidos foram imersos em tampão PBS e imediatamente processados para a extração do RNA total e análise do *LSP1*.

Estudo de anatomia patológica

A análise final de anatomia patológica das biópsias e das peças cirúrgicas foi considerada “Gold Standard” no diagnóstico das patologias prostáticas. As lâminas dos exames e peças foram analisadas pelos médicos do Departamento de Patologia do HC da UFU, sem conhecimento do quadro clínico ou dos valores de PSA dos pacientes.

Nos casos de câncer prostático, o grau tumoral foi definido de acordo com a escala de Gleason (1997, anexo IV), e o estágio clínico de acordo com a classificação TNM 92 (anexo III), estabelecida pela União Internacional Contra o Câncer – 1992 (SCHRÖDER et al 1992).

Coleta de amostras e extração de RNA

As amostras de sangue foram coletadas em cinco tubos tipo *vacutainer*TM contendo K₂EDTA 7,2 mg. Após a coleta, três tubos foram levados para o Laboratório de Genética Molecular, INGEB/UFU, e armazenados a 4°C para posterior processamento e extração de RNA.

Outros dois tubos 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**, para o PSA total.

O RNA total foi extraído segundo procedimentos descritos por Chomczynski and Sacchi (1987), com algumas modificações (anexo II).

O padrão do RNA foi verificado em gel de agarose 2% por 50 minutos a 110 volts em tampão TBE (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0) 0,5X, corado com 0,5 mg/ ml de brometo de etídio e, em seguida, visualizado no sistema de videodocumentação *Image Master* - VDS (Amersham Biosciences). A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro Ultrospech 1000 de luz ultravioleta (Amersham Biosciences) a um comprimento de onda de 260 nm. A qualidade do RNA extraído foi também verificada por meio da relação entre as leituras espectrofotométricas 260/280 nm. Em seguida, o material foi armazenado a -80°C.

RT (Transcrição Reversa)

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 2 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 Inc.) 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 -20°C para posterior amplificação.

PCR Multiplex Semi-quantitativa

O produto da transcrição reversa (cDNA) foi co-amplificado, em duplicata para cada amostra, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando-se dois diferentes pares de *primers*, um desenhado para hibridar com o gene *LSP1* e o outro com o gene constitutivo, que codifica para a β -2-microglobulina (*B2M*), que foi usado como controle interno da reação para caracterizar a qualidade do RNA e normalizar os níveis de expressão do gene alvo.

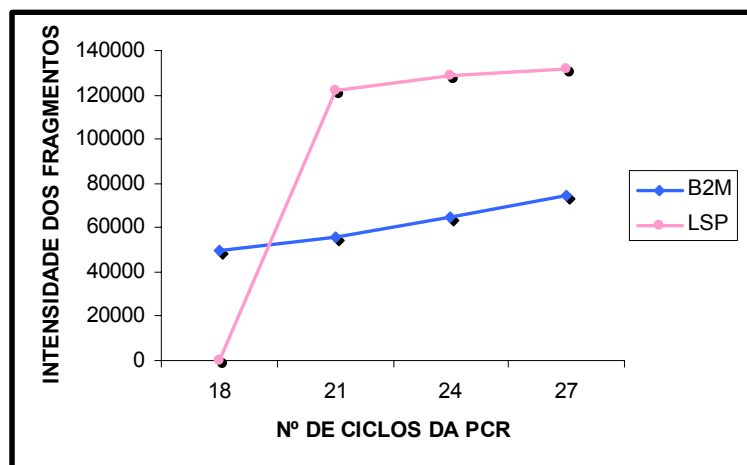
Os *primers* para o gene *LSP1* foram desenhados empregando-se o *software* Primer Designer, versão 2.0 e do *software* Oligotech, versão 1.0. As seqüências são as seguintes: senso: 5'-GAGAAGGTGCTTGTGGAAGG-3' e reverso: 5'-AAGGGCAGAGAGGCTAAAGG-3'.

Os *primers* para o gene *B2M*, anteriormente, descritos por Bussemakers et al. (1999), contêm as seguintes seqüências: senso: 5'-ACG AGA GAA TGG AAA GTC AAA-3', reverso: 5'-TGT TGA TGT TGG ATA AGA GAA-3'.

Em fases de otimização, a PCR foi realizada para cada gene separadamente, com o intuito de verificar o nível de competição entre os pares de *primers*.

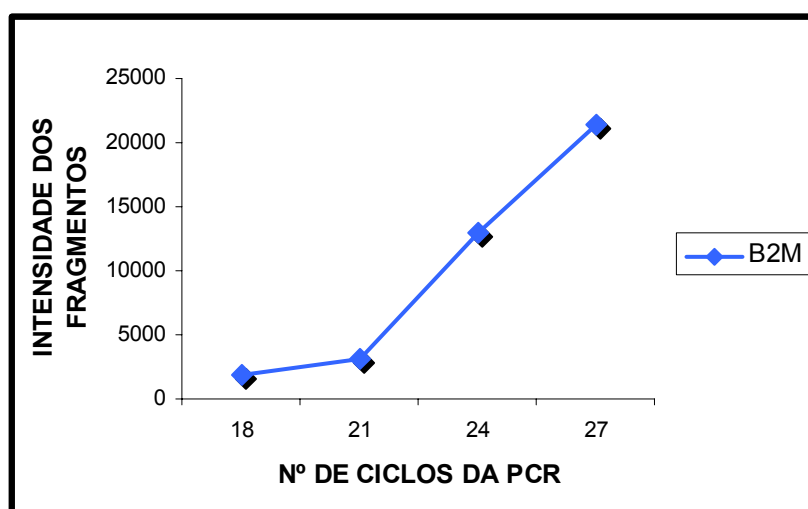
Para a realização das análises semi-quantitativas, foi também necessária a determinação do número ideal de ciclos de PCR, para que a co-amplificação estivesse na fase exponencial e não na fase de platô. Para isso, foram efetuadas reações de PCR com 18,21,24 e 27 ciclos nas amostras de sangue (**Quadro I**).

Quadro I: Reações de PCR com 18,21,24 e 27 ciclos nas amostras de sangue

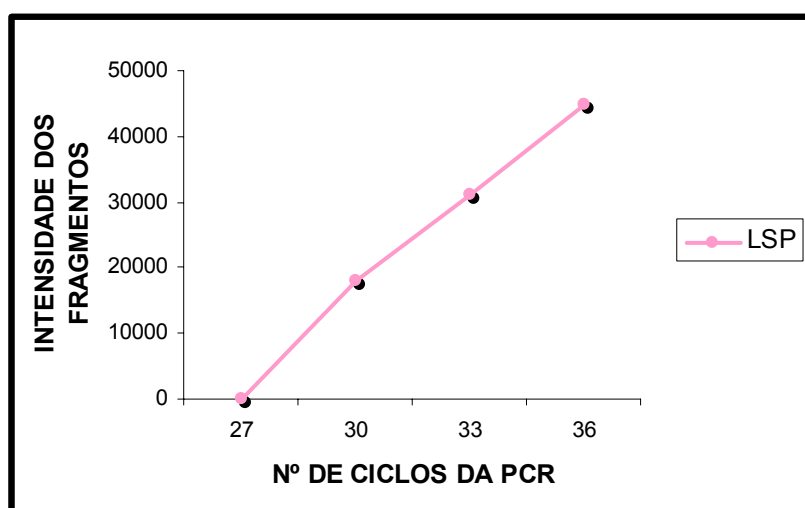


Nas amostras de tecido, foram feitas reações de PCR com 18,21,24 e 27 ciclos para o gene *B2M* e com 27,30,33 e 36 ciclos para o gene *LSP1* (**Quadros II e III**). O ciclo térmico constituiu-se de uma desnaturação inicial de 95°C por 4 min, seguida de ciclos a 94°C por 40 s, 59°C por 40 s e 72°C por 50 s. Os tubos foram, gradativamente, retirados a cada ciclo de interesse e, terminado o último ciclo, todos os tubos foram recolocados no termociclador para uma extensão final a 72°C por 5 min.

Quadro II: Reações de PCR com 18,21,24 e 27 ciclos para o gene *B2M*



Quadro III: Reações de PCR com 27,30,33 e 36 ciclos para o gene *LSP1*



Foram feitas reações separadas para o gene *LSP1* e *B2M* no sangue e no tecido.

Para o *LSP1* no sangue: foram utilizados em cada reação de PCR, 2 µL de cada cDNA sintetizados na transcrição reversa. Estes foram adicionados como molde até um volume final de 25 µL, contendo 200 µM de dNTPs; 3 pmoles de cada *primer LSP1*; 2,0 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e 1X do tampão da Taq (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3). O volume final foi completado com água ultrapura.

No tecido: foram utilizados 4 µL de cada cDNA sintetizados na transcrição reversa. Estes foram adicionados como molde em um volume final de 25 µL contendo 200 µM de dNTPs; 5 pmoles de cada *primer LSP1*; 2,0 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e 1X do tampão da Taq (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3). O volume final foi completado com água ultrapura.

Para o *B2M* no sangue, foi utilizado em cada reação de PCR, 2 µL de cada cDNA, sintetizados na transcrição reversa. Estes foram adicionados como molde em um volume final de 20 µL contendo 200 µM de dNTPs; 5 pmoles de cada *primer B2M*; 2,0 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e 1X do tampão da Taq (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3). O volume final foi completado com água ultrapura. No tecido, foram utilizados 2 µL de cada cDNA, sintetizados na transcrição reversa, sendo adicionados como molde em um volume final de 20 µL contendo 200 µM de dNTPs; 5 pmoles de cada *primer B2M*; 2,0 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e 1X do tampão da Taq (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3). O volume final foi completado com água ultrapura.

Para cada 10 µL do produto amplificado, foram adicionados 2 µL *loading dye* (12,5 mg de azul de xileno cianol; 4,0 g de sacarose e 5,0 mL de água) e, em seguida, foram analisados, por eletroforese, em gel de agarose 2% por 50 minutos a 110 volts em tampão TBE 0,5X (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados com 0,5 mg/mL de brometo de etídio e, posteriormente, visualizados e fotografados pelo sistema de vídeo documentação *Image Master* - VDS (Amersham Biosciences). O fragmento esperado para o gene *LSP1* é de 238 pb.

Análise por Densitometria Óptica

Os produtos de amplificação obtidos com base nas amostras de adenocarcinoma e de HPB, tanto para o gene *LSP1* como para o gene *B2M*, foram analisados e quantificados quanto às suas densidades óticas no programa *Image Master VDS Software*, versão 2.0 e as leituras foram submetidas à razão de RNAm *LSP1* / RNAm β -2-microglobulina para se obter a abundância relativa do gene *LSP1* nas amostras analisadas.

Local dos exames

Os exames laboratoriais, radiológicos, anátomo-patológicos e moleculares (RT-PCR semi-quantitativa) foram realizados respectivamente por: Laboratório de Análises Clínicas, Departamento de Radiologia, Departamento de Patologia e Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica, da UFU, de maneira cega, com metodologias e técnicas habituais.

Os exames de Medicina Nuclear, quando necessários, foram realizados em instituições privadas.

Aprovação no CEP

Este projeto faz parte de linha de pesquisa sobre marcadores moleculares no câncer de próstata, do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU. Foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade sob nº 05/2001 e segue normas do Código Brasileiro de Ética Médica, do Ministério de Saúde (MS) em Conselho Nacional de Saúde (CNS), nº 156/96.

3.6 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

Dentre os primeiros setenta e cinco pacientes consecutivos, foram definidos três grupos de estudo. Sendo um grupo controle e outros dois conforme o diagnóstico final de anatomia patológica (Quadro I). Nos três grupos, foi analisada a expressão do *LSP1* apenas no sangue periférico. A análise da expressão do *LSP1* em amostras de tecidos dos outros vinte e três pacientes, foi realizada posteriormente, em uma segunda etapa do estudo.

QUADRO I – Grupos de estudo de acordo com o diagnóstico final do Anátomo-patológico.

Grupos	Diagnóstico do anátomo-patológico	Número de pacientes
Grupo 1	Controle negativo	25
Grupo 2	Hiperplasia prostática benigna (HPB)	26
Grupo 3	Câncer de próstata (CAP)	24

A comparação entre os grupos de estudo foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros:

1. Idade;
2. PSA pré-biópsia;
3. Expressão do *LSP1* no sangue periférico;
4. Estádio T (TNM 1992), nos casos de biópsia com adenocarcinoma;
5. Escore de Gleason, nos casos de biópsia com adenocarcinoma

A análise da expressão do *LSP1*, em tecidos prostáticos de biópsias, foi realizada após essa primeira etapa, para verificar o parâmetro de expressão diretamente no tecido prostático, e será analisada separadamente.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo *software* Statística versão 5.5A (STATISTICA, 1999). A regressão logística foi aplicada para os níveis relativos de mRNA do *LSP1*, no sangue periférico, para determinar se esse gene é capaz de discriminar pacientes com câncer de próstata e hiperplasia benigna. Intervalos foram definidos de acordo com a expressão semi-quantitativa do *LSP1* para análise das curvas de tendência entre os grupos de estudo. Sendo estes <0.5 ; de 0.5 a 1.0 e ≥ 1 .

O odds ratio da concentração relativa de mRNA no sangue periférico foi calculado para determinar a chance de um indivíduo apresentar HPB e CaP. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos, segundo Siegel (1975), Beiguelman (1996), Dowing & Clarck (1998).

4. RESULTADOS

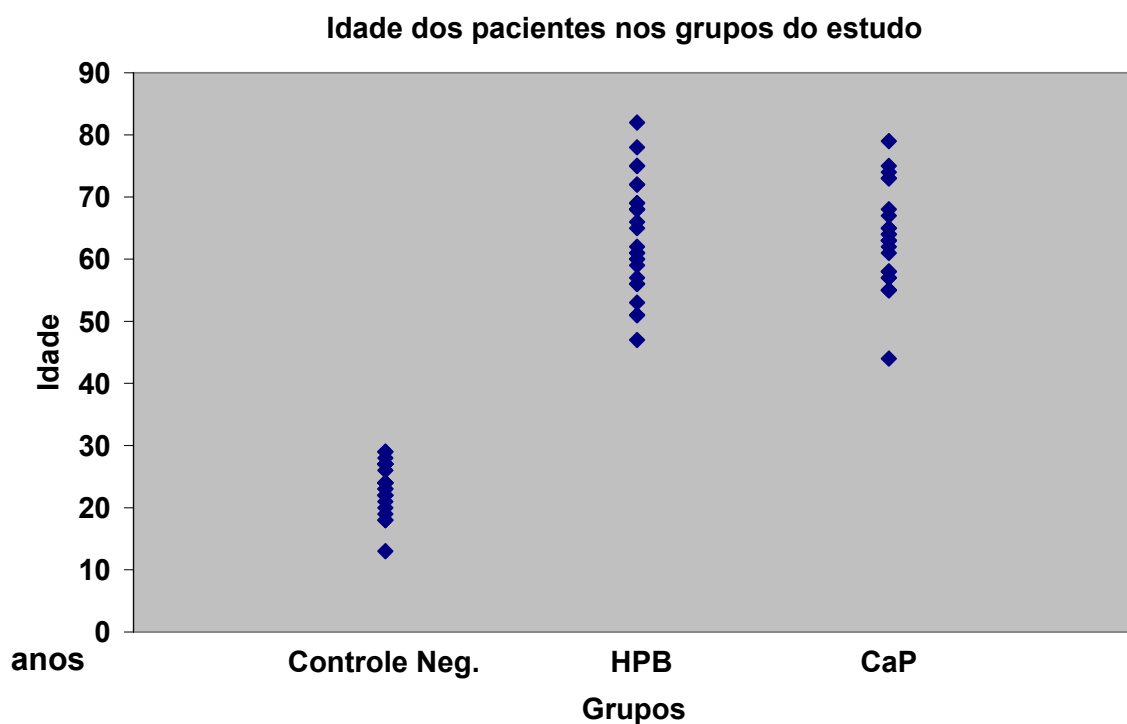
Os valores referentes às variáveis do estudo foram obtidos por meio de levantamento de prontuários dos pacientes; após os resultados laboratoriais e de anatomia-patológica, e estão discriminados no Apêndice.

Os resultados serão apresentados de acordo com os critérios definidos na metodologia do estudo.

Os três grupos de estudo Hiperplasia Prostática (**HPB**), Câncer de Próstata (**CAP**) e controle foram comparados entre si de acordo com:

4.1. Idade dos pacientes

Figura I

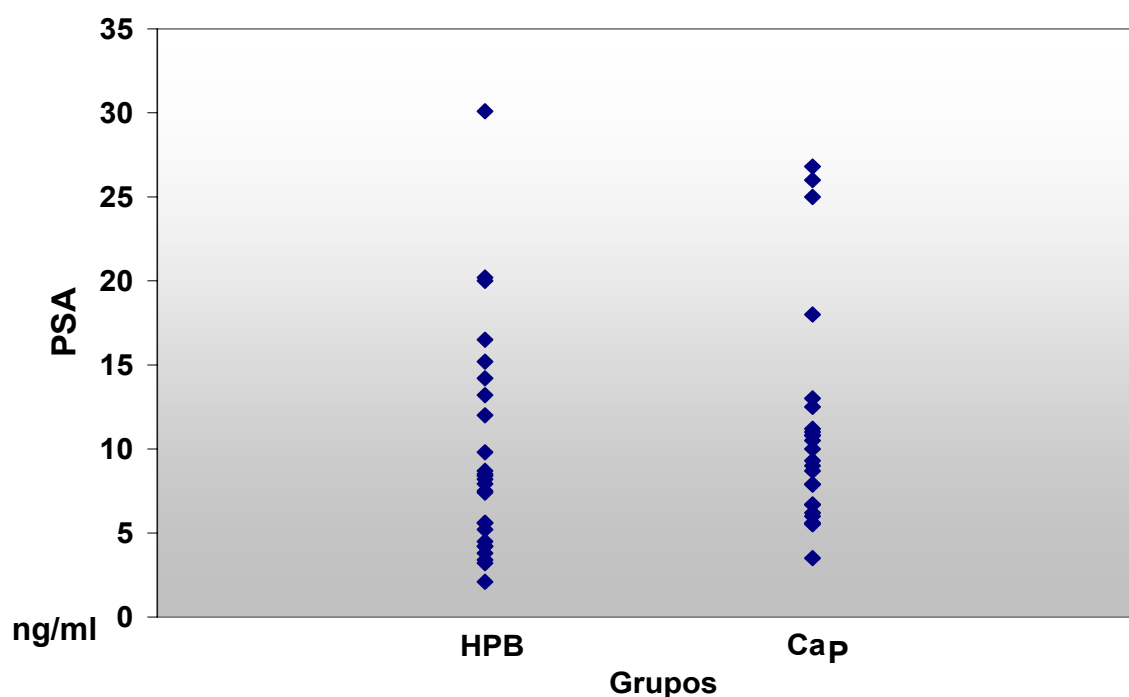


Conforme a **figura I**, foi confirmado que a idade (anos) dos pacientes com HPB e CAP foi estatisticamente semelhante. O grupo controle possuía idades sempre inferiores a 30 anos como idealizado na metodologia.

4.2. Valores do PSA Pré-Biópsia

Figura II

Valores do PSA em HPB e CaP



Observou-se, como mostra a **figura II**, que não existe diferença significativa entre os níveis de PSA pré-biópsia para os grupos de HPB e CAP. A dosagem não foi realizada no grupo controle, por não estar indicada no rastreamento, antes dos 40 anos de idade.

4.3. Análise da expressão do gene *LSP1* em sangue periférico

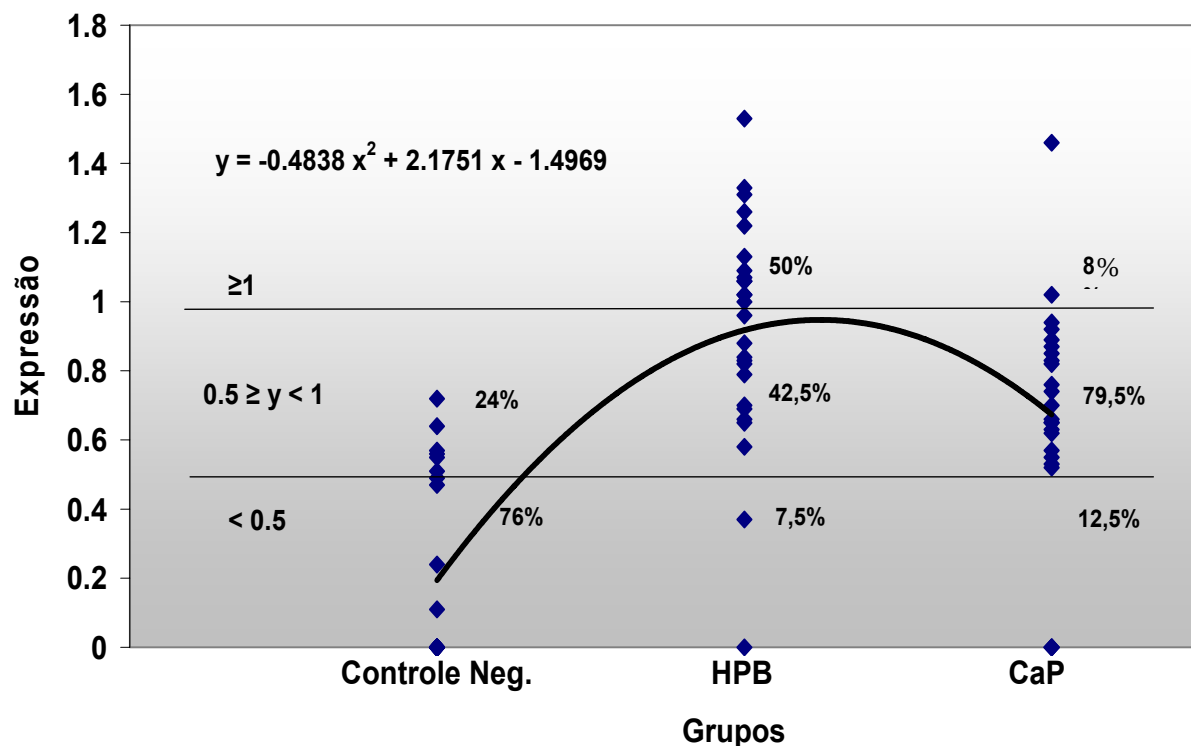
Foto demonstrativa da análise da expressão do *LSP1* em gel de agarose após extração por RT-PCR.



FIGURA III: RT-PCR multiplex semi-quantitativa para análise da expressão do gene *LSP1* em amostras de sangue periférico. A) Em pacientes com câncer de próstata. B) Em pacientes com hiperplasia prostática benigna. C) Em pacientes normais (grupo controle). M – Marcador constitutivo 100 pb.

Figura IV

Expressão no sangue periférico para os grupos de estudo



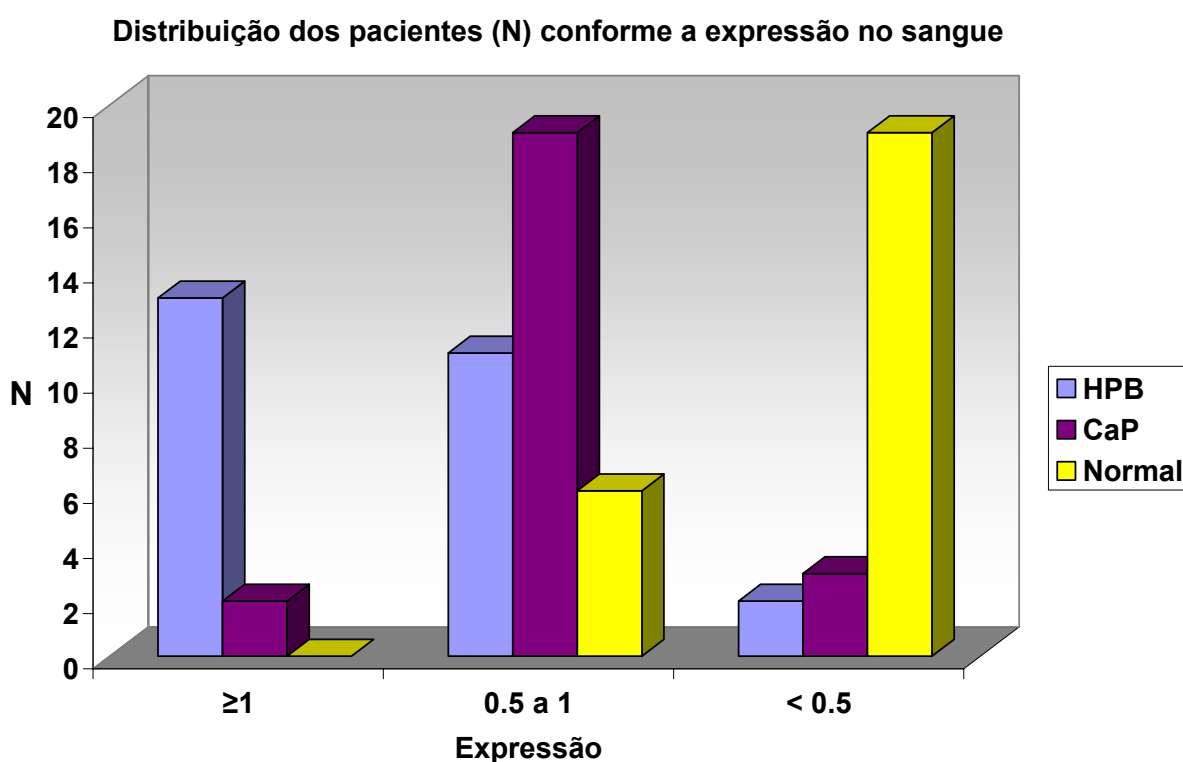
Como mostra a **figura IV**, apesar de o *LSP1* não ser específico para uma só patologia, existe diferença estatisticamente significativa, quando se comparam os intervalos de expressão dentre os grupos do estudo. Foram observados, de acordo com a curva de tendência, valores mais elevados de expressão para **HPB**, valores intermediários para **CAP** e valores menores para o controle negativo.

Tabela I – Distribuição dos pacientes por intervalo de expressão de acordo com o grupo de estudo.

Grupos	HPB	CAP	Controle Negativo
≥ 1	13 (50%)	2 (8%)	0
0.5 a 1.0	11 (42,5%)	19 (79,5%)	6 (24%)
< 0.5	2 (7,5%)	3 (12,5%)	19 (76%)
Total	26	24	25

Quando analisada a incidência dos intervalos de expressão dentro de cada grupo independente, notou-se que 76% dos controles negativos apresentam expressão inferior a 0,5; cerca de 80% dos CAP apresentam expressão intermediária entre 0.5 e 1; e metade dos portadores de HPB apresenta expressão igual ou superior a 1.0 (**Tabela I**).

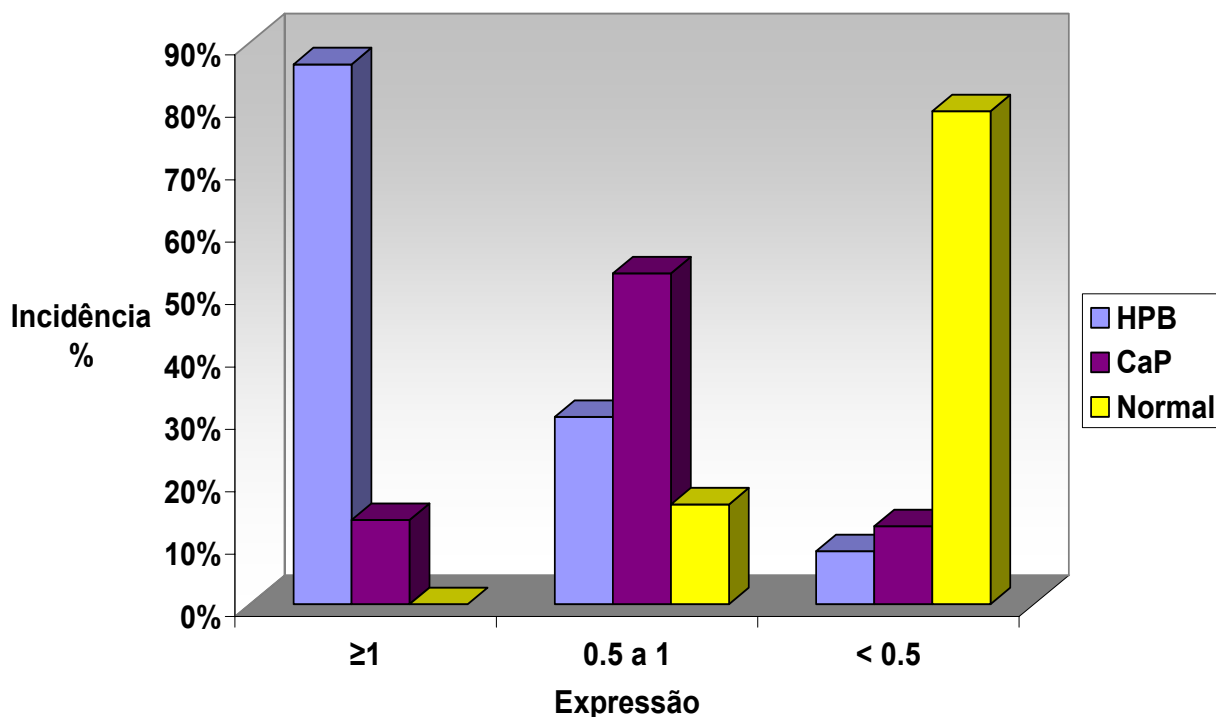
Figura V



Quando analisada a incidência relativa por patologia dentro de cada intervalo de expressão, observou-se a chance de cada patologia incidir, considerando-se o intervalo de expressão como fator determinante. A **figura V** descreve a amostra em valores absolutos por número de pacientes e a **figura VI** em valores percentuais.

Figura VI

Incidência das patologias conforme a expressão no sangue



No intervalo de expressão ≥ 1 , a incidência de HPB foi de 86%. Pacientes com expressão < 0.5 eram normais em 79% das vezes (**Tabela II**).

Para pacientes com intervalo de expressão entre 0.5 e 1.0, notaram-se 53% de CAP; 31% de HPB e 16% normais (**Tabela II**).

Tabela II – Distribuição dos pacientes por patologia de acordo com o intervalo de expressão semi-quantitativa do *LSP1* no sangue.

Intervalos	≥ 1	0.5 a 1.0	< 0.5
HPB	13 (86,5%)	11 (31%)	2 (8,5%)
CAP	2 (13,5%)	9 (53%)	3 (13%)
Normal (Controle negativo)	0	6 (16%)	19 (79,5%)
Total	15	36	24

Foi, então, realizada análise por meio de regressão logística, para avaliar a capacidade de discriminação entre hiperplasia benigna, câncer de próstata, e pacientes normais, considerando apenas a amplificação do marcador *LSP1* em sangue periférico e cálculo do odds ratio. Foi demonstrado como **significativo** o método em questão para intervalos superiores ou iguais a 1 e inferiores a 0.5.

Tabela III – Cálculo do “odds ratio” para os níveis de expressão do gene *LSP1* ≥ 1 , por regressão logística.

	Constante B0	<i>LSP1</i> Sangue
Parâmetros	2,445	63,964
Odds ratio		11.0

IC = 0,95 ; **p = 0,0021**

Quando aplicado o teste estatístico de odds ratio, observou-se uma chance 11 vezes maior do paciente ter HPB em relação a CAP, quando analisado o intervalo de expressão ≥ 1 como fator determinante isolado. Da mesma forma, para intervalo de expressão < 0.5 , existe uma chance nove vezes maior de o paciente ser normal em relação à HPB e cinco vezes maior em relação ao CAP.

4.4. Estádio T (TNM 1992), e escore de Gleason nos casos de biópsia com adenocarcinoma

Como demonstrado a seguir nas **figuras VII e VIII**, os intervalos de expressão do *LSP1* não diferiram entre os estádios T (TNM) ou mesmo nos diferentes graus de Gleason. Portanto, não representam expressão de alterações de agressividade ou mesmo alterações de estadiamento tumorais. Independentemente do estágio ou grau de diferenciação tumoral, os níveis de expressão mantiveram-se dentro do mesmo intervalo.

Figura VII
Estadio T (TNM) e expressão no sangue de pacientes com CaP

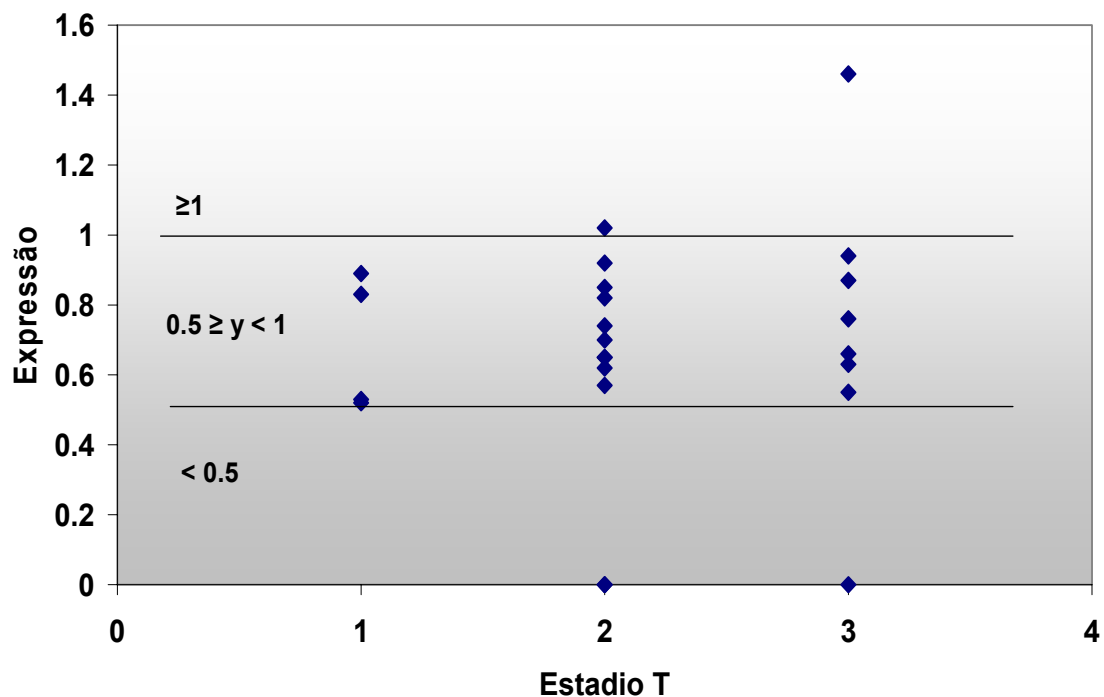
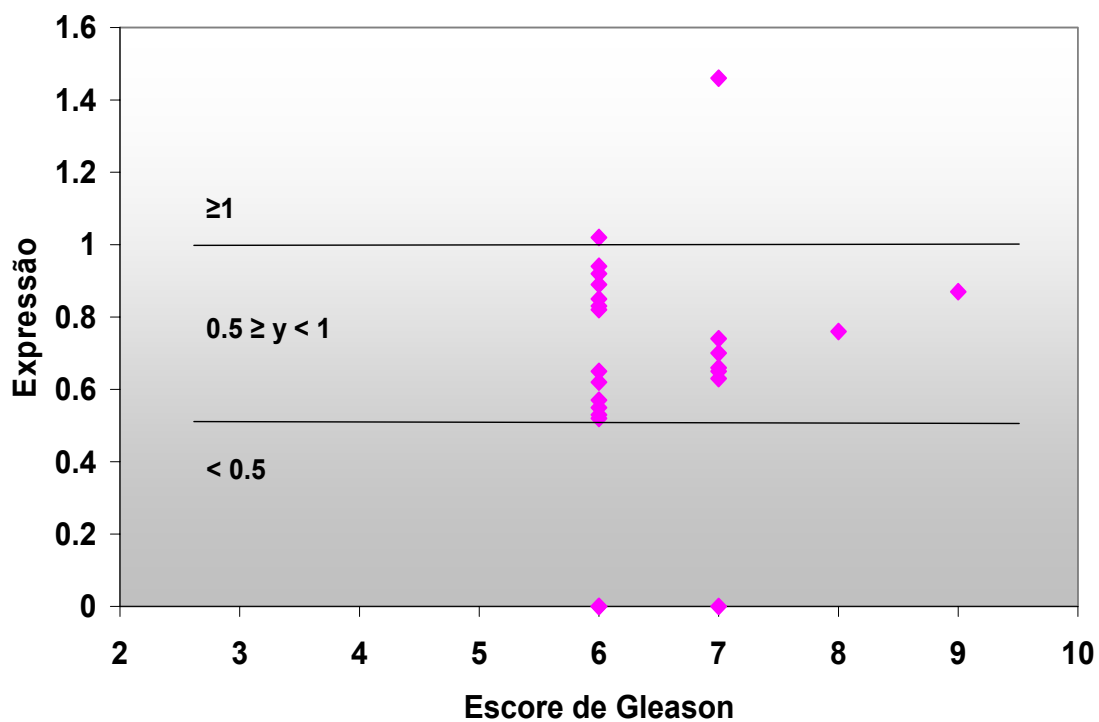


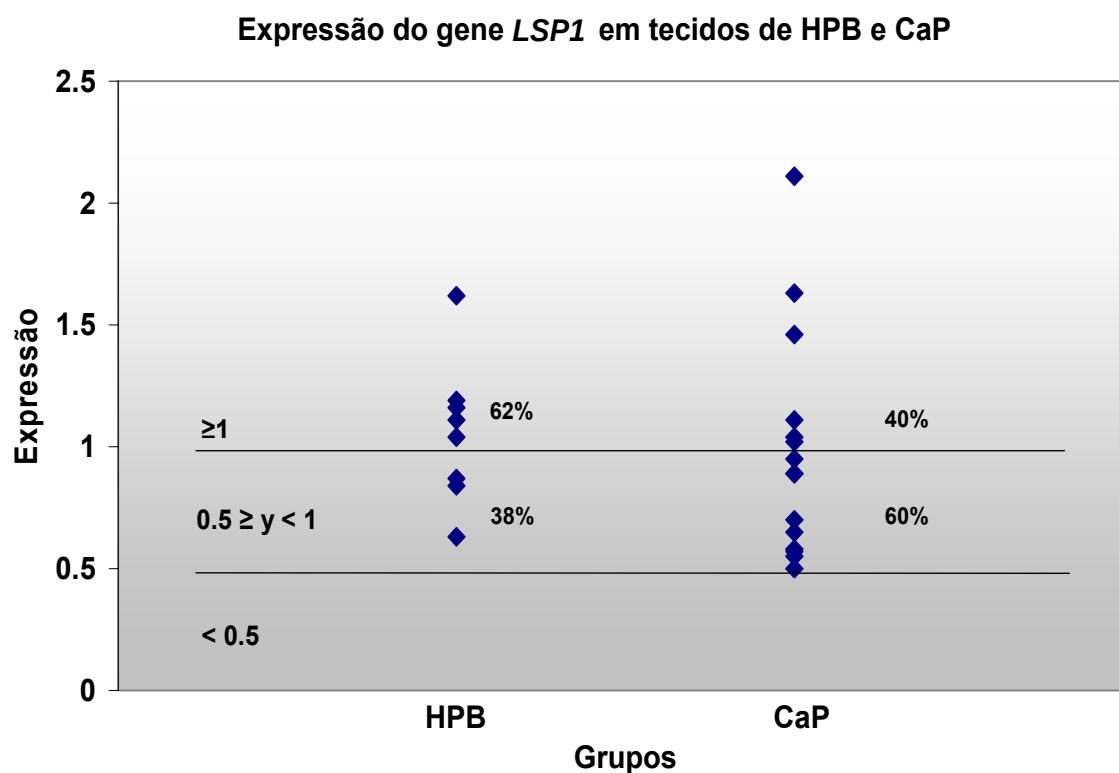
Figura VIII
Escore de gleason e a expressão no sangue de paciente com CaP



4.5. Análise da expressão do gene *LSP1* em tecidos prostáticos

Segunda etapa de análise em vinte e três pacientes distintos.

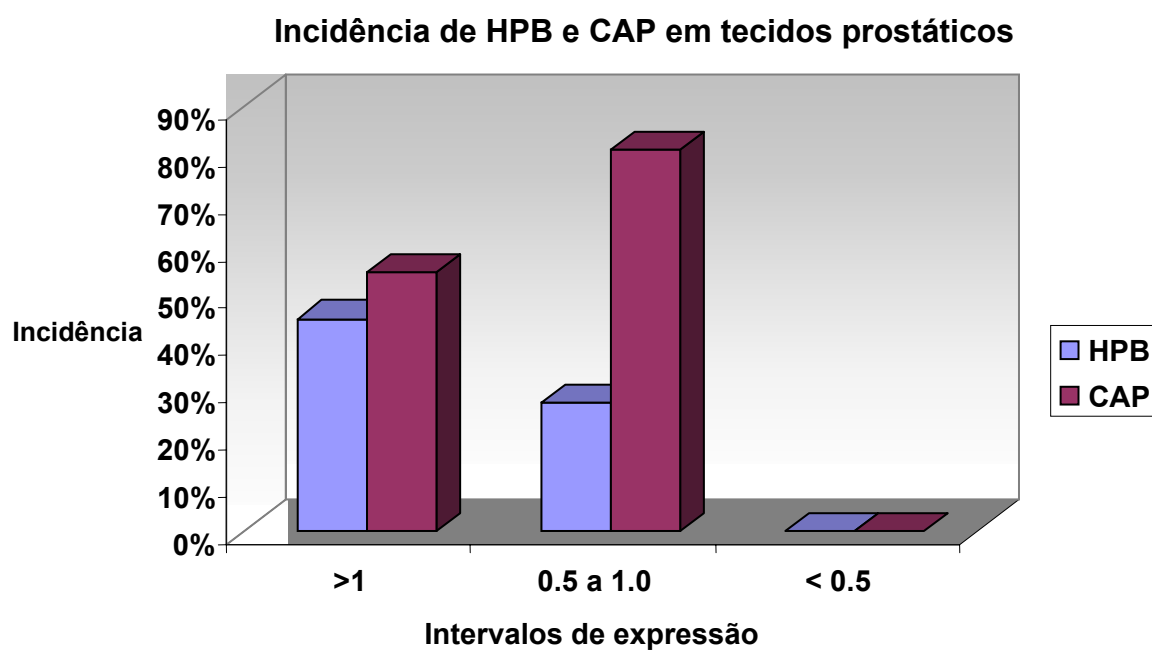
Figura IX



Os resultados obtidos em análise de amostras de tecidos demonstraram um comportamento semelhante ao padrão observado para HPB, no sangue periférico. Contudo um padrão diferente para CAP, que apresentou maior expressão no intervalo ≥ 1.0 em comparação ao sangue periférico. Nenhum paciente apresentou expressão inferior a 0.5 (**Figura IX**).

Desta forma, em amostras de tecidos prostáticos, a expressão do gene *LSP1* pouco diferiu entre os grupos de HPB e CAP para valores superiores a 1.0. O câncer de próstata continua a ser mais expresso no intervalo de 0.5 a 1.0 (**Figura X**).

Figura X



Como demonstrado pela **figura X**, a incidência de câncer de próstata para expressões teciduais do *LSP1* superiores a 1.0, foi maior que aquela observada no sangue periférico.

5. DISCUSSÃO

O câncer de próstata permanece como um desafio importante para o médico e para o pesquisador. Trata-se do tumor maligno mais freqüente e mais estudado no homem. A hipertrofia prostática benigna representa a patologia benigna mais freqüente da próstata. Com prognósticos diferentes e complicações sérias, essas patologias incidem na mesma faixa etária e podem passar despercebidas por vários anos. Apesar dos esforços mediante melhorias no diagnóstico e tratamento alcançados na última década, a incidência dessas duas patologias continua a aumentar juntamente com a sobrevida global do homem. (BRUNINI et al, 1992; BOYLE; SEVERI; GILLES, 2003; SCHRÖDER, 2003).

Atualmente, existe grande dificuldade na diferenciação clínica entre a hiperplasia benigna e o câncer de próstata inicial. Vale enfatizar o grande avanço representado pela introdução do PSA na rotina clínica após a década de 1980, bem como a melhoria das condições de biópsia transretal, hoje, bastante segura com índices baixíssimos de complicações (SCHRÖDER & KRANSE, 2003; DJAVAN; REMZI; MARBERGER, 2003).

Nota-se um grande ganho de qualidade e opções de tratamento mais eficientes (KUPELIAN & KLEIN, 2003; LEPOR, 2003). Mesmo assim, ainda existem vários casos duvidosos, em que o diagnóstico seguro não pode ser dado mesmo pela biópsia (DJAVAN; REMZI; MARBERGER, 2003).

Diversas propostas de melhoria no diagnóstico foram introduzidas, como a relação do PSA livre/total, a densidade e velocidade de subida do PSA, a ressonância nuclear magnética com estudo metabólico dirigindo a biópsia e alguns outros (DJAVAN et al., 2000; CANTO; SHARIAT; SLAWIN, 2003; CATALONA et al, 2003; KATTAN & SCARDINO, 2003; D'AMICO et al, 2004). Contudo, ainda temos

pacientes com PSA bastante alterado e, diversas vezes, com biópsias negativas. Fato responsável por grande estresse por parte do paciente e do urologista, que se vê impotente em dar um diagnóstico final seguro (DJAVAN; REMZI; MARBERGER, 2003).

Após a conclusão do programa genoma, bem como o aparecimento de várias propostas de diagnóstico em nível molecular, um novo campo de estudo se abriu, pelo qual muitas respostas ainda não obtidas poderiam ser sanadas (SAIKI et al, 1985; SMITH et al, 1991; MATANO; MOSS; EMERSON, 1992; MORENO et al, 1992; KATTAN & SCARDINO, 2003).

O gene *LSP1* foi identificado como responsável por diversas interações citoplasmáticas em leucócitos humanos (JONGSTRA, TIDMARSH et al. 1988; KLEIN, JONGSTRA-BILEN et al. 1989; JONGSTRA-BILEN et al, 1999). Responsável pela produção de uma proteína citoplasmática de 52kDa com diversas ações no sistema imune, sobretudo em células B. (KLEIN, GALEA et al. 1990; JONGSTRA-BILEN, JANMEY et al. 1992; JONGSTRA, ITTEL et al. 1994; JONGSTRA-BILEN, WIELOWIEYSKI et al. 1999; WONG, MALAPITAN et al. 2003).

Contudo, somente estudos mais recentes descreveram seu potencial como marcador em neoplasias do sistema imune. (WONG, MALAPITAN et al. 2003; MARAFIOTI, JABRI et al. 2003). Ao contrário do que se imaginava inicialmente, o *LSP1* foi identificado em sítios fora dos leucócitos humanos. Ainda que intimamente relacionados à resposta imune, ele foi descrito no endotélio de capilares sangüíneos e no peritônio. (JONGSTRA-BILEN, MISENER et al. 2000; LIU, CARA et al. 2005)

Oliveira Jr. et al. (2003) em estudo inovador, descreveu pela primeira vez a presença do *LSP1* no sangue periférico de pacientes portadores de HPB e câncer de próstata. Relatando uma incidência maior em pacientes portadores de hipertrofia benigna. Este estudo foi inicial e não avaliou a expressão em pacientes normais, mas abriu um novo campo de estudo relacionado ao gene *LSP1*.

Fato que motivou a realização de estudo mais aprofundado e capaz de determinar o padrão de expressão do *LSP1* em hiperplasia prostática benigna, câncer de próstata e pacientes normais.

Neste estudo, analisou-se inicialmente, a sua expressão em sangue periférico, uma vez que se trata de um gene expresso em células de defesa do

organismo. Para tanto, levou-se em consideração a expressão em um grupo controle, formado por indivíduos saudáveis com menos de trinta anos e que, portanto, não possuíam HPB ou câncer de próstata. Os resultados mostraram, claramente, que os níveis de expressão, nesse grupo, são bastante baixos, muitas vezes, ausentes.

Os pacientes portadores de HPB apresentaram os maiores níveis de expressão do *LSP1*. Já os pacientes portadores de câncer situaram-se, em sua maioria, em um patamar intermediário de expressão semi-quantitativa. Este achado sugere que a resposta imune parece atuar de forma mais eficiente em pacientes com HPB do que em portadores de câncer de próstata.

Apesar dos pacientes do grupo controle ser avaliados clinicamente, a fim de se definir uma amostra saudável evitando viés no estudo. É possível, que algum paciente pudesse estar passando por um quadro inflamatório não detectado. Podendo representar as poucas alterações observadas em expressão do *LSP1* acima de zero. Contudo, vale ressaltar que estes foram poucos casos e sempre com expressões inferiores a 1.0.

A homogeneidade dos grupos de HPB e câncer de próstata com relação a idade e valores de PSA, são importantes (figuras I e II). Estão de acordo com a literatura e não poderiam diferir, pois se partiu do pressuposto de que a avaliação clínica, por si, não seria capaz de diferir os grupos, somente o estudo de anatomia patológica final.

Um fato extremamente interessante foi o comportamento quase antagônico da expressão entre pacientes normais e “hiperplásicos”, quando observados os intervalos de expressão. Muitas vezes, o paciente com hiperplasia prostática possui algum grau de prostatite inflamatória crônica, que também eleva lentamente o PSA (STAMEY; YANG; HAY, 1987; STAMEY et al, 2004) e pode ser responsável pelo achado. Já o paciente normal não possui, em teoria, patologia a qual deve combater.

O padrão intermediário de expressão observado no câncer de próstata pode traduzir uma queda de atividade do sistema imune em sua vigilância, permitindo à célula tumoral desenvolver-se.

Esses fatos compõem um raciocínio lógico, mas que necessita de comprovações. Não foram estudados pacientes portadores de infecções prostáticas

agudas ou mesmo pacientes com lesões crônicas inflamatórias não neoplásicas. Mas, os achados foram estatisticamente significantes.

É sabido que o *LSP1* participa da vigilância imunológica do organismo, induzindo apoptose em células do sistema imune que estejam alteradas ou imaturas (JONGSTRA-BILEN, WIELOWIEYSKI et al. 1999), e que está bastante expresso em reações inflamatórias. Um passo seguinte seria a realização de um novo estudo com anticorpos monoclonais específicos para analisar a resposta contra o câncer de próstata.

Quando analisados parâmetros como estadiamento T (TNM) e escore de gleason, dentro do grupo de câncer prostático, observou-se que a expressão do *LSP1* não reflete maior agressividade celular ou alterações de estágio, sugerindo, mais uma vez, que este não estaria relacionado de forma específica com a neoplasia.

Ao analisar os outros vinte e três pacientes com amostras de tecidos de peças cirúrgicas, a diferença de níveis de expressão entre HPB e câncer foi menor dentro dos intervalos. Ou seja, em pacientes com câncer de próstata, notou-se maior nível de expressão no tecido em relação ao sangue. Para hiperplasia o padrão de expressão se manteve semelhante entre tecido e sangue. Este achado necessita de melhor elucidação mas, pode representar a falha do organismo em combater a célula tumoral.

O estudo se deu em duas fases, com amostras de pacientes diferentes para sangue e tecidos. Apenas seis pacientes obtiveram dosagens simultâneas em sangue e tecidos. Nestes casos a expressão foi semelhante em ambos. Este fato ocorreu devido à dificuldade de análise e coleta de material (peças) a fresco. E também pelo fato de nem todos pacientes serem candidatos a cirurgia. A análise somente em fragmentos de biópsias é questionável uma vez que se pode não atingir o tumor e sim uma área de hiperplasia no momento da retirada do fragmento. Portanto, os resultados deverão ser validados em uma só vez, com amostras de sangue e tecidos de pacientes operados a fim de confirmar os achados nos te 45
Contudo, os achados iniciais corroboram o raciocínio desenvolvido até o momento.

O gene *LSP1* não é específico da hiperplasia prostática benigna ou do câncer de próstata. Ele está pouco expresso, mas, presente, mesmo em pacientes normais.

No entanto, o *LSP1* apresenta um padrão nítido e particularizado de expressão em cada situação clínica.

O estudo se propôs a definir e elucidar a expressão desse gene nessas patologias, confrontando com achados de pacientes normais. Futuros estudos deverão elucidar o papel, até aqui promissor, da utilização do gene *LSP1* como auxiliar aos métodos de avaliação clínica habituais.

6. CONCLUSÕES

Em relação à expressão do gene *LSP1* em hiperplasia prostática benigna e no câncer de próstata, nas condições do presente trabalho, pode-se afirmar que:

1. Para níveis de expressão do *LSP1* superiores ou iguais a 1.0 no sangue periférico, existe uma chance onze vezes maior na incidência de hiperplasia benigna em relação ao câncer de próstata.
2. Para níveis de expressão do gene *LSP1* inferiores a 0.5 no sangue periférico, existem chances 9 e 5 vezes maiores da presença de pacientes normais em relação a hiperplasia benigna e câncer de próstata, respectivamente.
3. O gene *LSP1* não é específico para hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata. Ele está pouco expresso, ou ausente em pacientes normais. Mas, representa um potencial biomarcador auxiliar ao PSA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEIGUELMAN, B. Curso Prático de Bioestatística. Ribeirão Preto – SP; **Revista Brasileira de Genética**, 1996.

BOYLE, P.; SEVERI, G.; GILLES, G.G. THE EPIDEMIOLOGY OF PROSTATE CANCER, IN **LOCALIZED PROSTATE CANCER. THE UROLOGICAL CLINICS OF NORTH AMERICA** v **30**, p **209-217**, MAY, 2003.

BRUNINI, R.; TORLONI, H.; HENSON, D. E.; GLOTIEB, S. L. D.; SOUZA, J. M. P. **Câncer no Brasil**. Dados histopatológicos 1976-1980. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1992, 198 p.

BUSSEMAKERS, M. J. Changes in gene expression and targets for therapy. **European Urology** v 35, n (5-6), p 408-412, 1999.

BUSSEMAKERS, M. J.; VON BOKHOVEN, A. et al. DD3: a new prostate-specific gene highly overexpressed in prostate cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v 59, n 23, p 5.975-5.979, 1999.

CANTO, E.I.; SHARIAT, F.S.; SLAWIN, K.M. Biochemical staging of prostate cancer, in Localized Prostate Cancer. **The Urological Clinics of North America**, Philadelphia, v 30, n 2, p 263-277, may, 2003.

CATALONA, W. J.; ANTENOR, J. A. ET AL. **SCREENING FOR PROSTATE CANCER IN HIGH RISK POPULATIONS.** THE JOURNAL OF UROLOGY, **BALTIMORE**, V **168**, N **5**, P **1.980-1.984**, **2002**.

CATALONA, W. J.; BARTSCH, G. ET AL. **SERUM PRO PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN IMPROVES CANCER DETECTION COMPARED TO FREE AND COMPLEXED PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN IN MEN WITH PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN 2 TO 4 NG/ML.** THE JOURNAL OF UROLOGY, **BALTIMORE**, V **170**, N **6** , P **2.181-2.185**, **2003**.

CATALONA, W. J. **PROSTATE CANCER SCREENING.** BJU INT , V **94**, N **7** , P **964-966**, **2004**.

CHOMCZYNSKI, P. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. **Nucleic Acids Research**, v 20, p 3.791 – 3.792, 1992.

D'AMICO, A. V. ; CHEN, M. H. et al. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v 351, n 2, p 125-135, 2004.

DJAVAN, B. ; ZLOTTA, A. et al. "Optimal predictors of prostate cancer on repeat prostate biopsy: a prospective study of 1,051 men." **The Journal of Urology**, Baltimore, v 163, n 4, p 1.144-1.149, 2000.

DJAVAN, B.; REMZI, M.; MARBERGER, M. **WHEN TO BIOPSY AND WHEN TO STOP BIOPSYING? IN LOCALIZED PROSTATE CANCER.** THE UROLOGICAL CLINICS OF NORTH AMERICA, V **30**, P **253-262**, MAY, **2003**.

DOWING, D.; CLARK, J. **Estatística Aplicada**; tradução de Alfredo Alves de Farias. São Paulo – SP, Editora Saraiva, 1998.

FONG, I. W. ; STRUTHERS, N. et al. A randomized comparative study of the prophylactic use of trimethoprim-sulfamethoxazole versus netilmycin-metronidazole in transrectal prostatic biopsy. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 146, n 3, p 794-797, 1991.

GLEASON, D. F. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum, M (Ed). **Urologic Pathology**: The prostate. Philadelphia: Lea e Febiger, 1977, 121 p.

HYROYOSHI, S.; AKAKURA, K.; IGARASHI, T. et al, Clinical usefulness of serum Anti-p53 antibodies for prostate cancer detection: A comparative study with prostate specific antigen parameters. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 171, n 1, p 182-186, 2004.

JONGSTRA, J., M. E. ITTEL, et al. "The LSP1 gene is expressed in cultured normal and transformed mouse macrophages." **Molecular Immunology** 31(15): 1125-31, 1994.

JONGSTRA, J., G. F. TIDMARSH, et al. "A new lymphocyte-specific gene which encodes a putative Ca^{2+} -binding protein is not expressed in transformed T lymphocyte lines." **The Journal of Immunology** 141(11): 3999-4004, 1988.

JONGSTRA-BILEN, J., P. A. JANMEY, et al. "The lymphocyte-specific protein LSP1 binds to F-actin and to the cytoskeleton through its COOH-terminal basic domain." **The Journal of Cell Biology** 118(6): 1443-53, 1992.

JONGSTRA-BILEN, J., V. L. MISENER, et al. "LSP1 modulates leukocyte populations in resting and inflamed peritoneum." **Blood** 96(5): 1827-35, 2000.

JONGSTRA-BILEN, J., A. WIELOWIEYSKI, et al. "LSP1 regulates anti-IgM induced apoptosis in WEHI-231 cells and normal immature B-cells." **Molecular Immunology** 36(6): 349-59, 1999.

KATTAN, M.W.; SCARDINO, P. T. Markers and meaning of primary treatment failure in Localized Prostate Cancer. **The Urological Clinics of North America**, Philadelphia, v 30, p 377-401, may, 2003.

KLEIN, D. P., S. GALEA, et al. "The lymphocyte-specific protein LSP1 is associated with the cytoskeleton and co-caps with membrane IgM." **The Journal of Immunology** 145(9): 2967-73, 1990.

KLEIN, D. P., J. JONGSTRA-BILEN, et al. "Lymphocyte-specific Ca^{2+} -binding protein LSP1 is associated with the cytoplasmic face of the plasma membrane." **Molecular Cell Biology** 9(7): 3043-8, 1989.

KRUMHOLTZ, J. S.; CARVALHAL, G. F. et al. "Prostate specific antigen cutoff of 2.6 ng/ml for prostate cancer screening is associated with favorable pathologic tumor features." **Urology** v 60, n 3, p 469-474, 2002.

KUPELIAN, P.A.; KLEIN E.A. Localized prostate cancer: Radiation or Surgery? In Localized Prostate Cancer. **The Urological Clinics of North America**, Philadelphia, v 30, p 315-330, may, 2003.

LEPOR, H. Practical considerations in radical retro pubic prostatectomy in Localized Prostate Cancer. **The Urological Clinics of North America**, Philadelphia, v 30, p 363-368, may, 2003.

LIU, L., D. C. CARA, et al. "LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration." **J Exp Med** 201(3): 409-18, 2005.

MATTANO JR., L.A.; MOSS, T.J.; EMERSON, S.G. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Cancer Research**., Baltimore v 52, p 4.701-4.705, 1992.

MARAFIOTI, T., L. JABRI, et al. "Leukocyte-specific protein (LSP1) in malignant lymphoma and Hodgkin's disease." **British Journal of Hematology** 120(4): 671-8, 2003.

MORENO, J. G.; GRODE, C. M.; FISHER, R. et al. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v 53, p 6.110-6.112, 1992.

NEMAZEE, D. AND K. BUERKI. "Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras." **Proc Natl Acad Sci U S A** 86(20): 8039-43, 1989.

OLIVEIRA JR., W.P.; OLIVEIRA, D.D.J.; MEOLA, J.; NEVES, F.A. et al. Gene expression in tumors and hyperplasic prostatic tissues by differential display-RT-PCR. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 2003.

ORNSTEIN, D. K.; RAYFORD, V. A.; FUSARO, V. A. et al. III serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total specific antigen levels between 2.5 and 25 ng/ml. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 172, n 4, p 1.302-1.305, 2004

ROGERS, C.G.; YAN, G.; ZHA, S. et al. Prostate cancer detection un uroanalysis for α -methylacy coenzyme a racemase protein. **The Journal of Urology**, Baltimore, v 172, n 4, p 1.501-1.503, 2004.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J.; FACOONA, F. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v 230, p 1.350-1.354, 1985.

SCHRÖDER, F. H.; HERMANEK, P.; FAIR, W. R. et al. The TNM classification of prostate cancer. **Prostate**, New York, v 4, p 129-138, 1992.

SCHRÖDER, F. H. Screening for prostate cancer in Localized Prostate Cancer. **The Urological Clinics of North America**, Philadelphia, v 30, p 239-251, may, 2003.

SCHRÖDER, F. H.; KRANSE, R. Verification bias and the prostate – specific antigen test – is there a case for a lower threshold for biopsy?, **New England Journal of Medicine**, Waltham, v 349, p 393-395, 2003.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica** (para as ciências do comportamento). Trad. Alfredo Alves Farias. São Paulo , Mc. graw-Hill do Brasil, 1975.

SMITH, B.; SELBY, B.; SOUTHGATE, J. et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by by menas of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. **Lancet**, London, v 338, p 1.227-1.229, 1991.

STAMEY, T. A.; YANG, N.; HAY, A. R. Prostate specific antingen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v 317, p 909-916, 1987.

STAMEY, T. A. THE ERA OF SERUM PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN AS A MARKER FOR BIOPSY OF THE PROSTATE AND DETECTING PROSTATE CANCER IS NOW OVER IN THE USA. INTERNATIONAL BRITISH JOURNAL OF UROLOGY, **v 94, n 7, p 963-964, 2004.**

STAMEY, T. A.; CALDWELL, M. et al.. "The Prostate specific Antigen in the United States is over for Prostate cancer: what happened in the last 20 years?" **THE JOURNAL OF UROLOGY**, Baltimore, v 172, n 4 (pt 1), p 1.297-1.301, 2004.

UICC- Prostate carcinoma. In **Clinical TNM Classification and Staging**. American Joint Committee on Cancer (AJCC)/International Union Against Cancer (UICC), 1992.

WONG, M. J., I. A. MALAPITAN, et al. "A cell-free binding assay maps the LSP1 cytoskeletal binding site to the COOH-terminal 30 amino acids." **Biochim Biophys Acta** 1642(1-2): 17-24, 2003.

APÊNDICE I

Resultados obtidos para 75 pacientes em análise de sangue periférico.

Prontuário	Laudo A-P	Grupo	Expressão <i>LSP1</i>	Idade	PSA	Gleason	TNM	T
142973	CaP	3	0.94	75	11.2	6	T3CN0M0	3
814022	CaP	3	0	79	26.8	6	T3N0M0	3
39229	CaP	3	0.53	62	6	6	T1AN0M0	1
385616	CaP	3	0.65	63	6.68	6	T2BN0M0	2
628377	CaP	3	0.89	73	13	6	T1AN0M0	1
877240	CaP	3	0.52	64	5.52	6	T1AN0M0	1
494367	CaP	3	0.87	67	10.8	9	T3CN0M0	3
996872	CaP	3	0.92	57	6.2	6	T2BN0M0	2
1011359	CaP	3	0.85	63	7.9	6	T2CN0M0	2
871745	CaP	3	0	55	3.5	7	T2BN0M0	2
720391	CaP	3	0.7	65	7.9	7	T2CN0M0	2
609744	CaP	3	0.74	58	26	7	T2BN0M0	2
1027720	CaP	3	0.76	61	18	8	T3BN0M0	3
716976	CaP	3	0.63	58	9	7	T3BN0M0	3
929725	CaP	3	0.83	74	10.5	6	T1CN0M0	1
182848	CaP	3	0.65	55	5.6	7	T2CN0M0	2
17291	CaP	3	1.46	57	8.7	7	T3BN0M0	3
268645	CaP	3	0.66	65	10.8	7	T3AN0M0	3
676672	CaP	3	0.62	63	9.3	6	T2BN0M0	2
474312	CaP	3	0.55	64	25	6	T3N0M0	3
250615	CaP	3	1.02	44	12.5	6	T2CN0M0	2
245530	CaP	3	0.57	55	6.7	6	T2BN0M0	2
1030148	CaP	3	0.82	73	10	6	T2AN0M0	2
915057	CaP	3	0	68	11	6	T2CN0M0	2
618827	HPB	2	0.88	60	3.8			
507455	HPB	2	1.06	66	30.1			
93699	HPB	2	1.02	53	7.5			
12741	HPB	2	1.33	57	4.21			
987292	HPB	2	1.13	68	8.2			
757266	HPB	2	0.58	75	5.2			
555084	HPB	2	0.96	61	5.6			
375379	HPB	2	1.53	68	5.6			
309487	HPB	2	0.69	68	4.5			
534369	HPB	2	1.26	51	4.2			
306693	HPB	2	1.09	47	2.1			
674730	HPB	2	1.07	78	20.2			
287011	HPB	2	1.02	59	12			
376155	HPB	2	1.22	72	13.21			
173642	HPB	2	1	65	14.2			
412134	HPB	2	0.66	60	9.8			
419508	HPB	2	0.82	51	8.7			
274427	HPB	2	0.83	69	16.5			
760756	HPB	2	0.7	62	8.4			

Prontuário	Laudo A-P	Grupo	Expressão <i>LSP1</i>	Idade	PSA	Gleason	TNM	T
505286	HPB	2	0	75	20			
981010	HPB	2	0.65	69	7.92			
350453	HPB	2	0.79	61	15.2			
360659	HPB	2	1.06	56	8.5			
285871	HPB	2	0.37	82	3.4			
219709	HPB	2	1.31	56	7.4			
997814	HPB	2	0.84	72	3.2			
HAV	c.neg	1	0.11	23				
MSN	c.neg	1	0	27				
ICP	c.neg	1	0.24	26				
RAF	c.neg	1	0	22				
LMS	c.neg	1	0	18				
SAP	c.neg	1	0	27				
MS	c.neg	1	0	23				
MHS	c.neg	1	0	28				
NJL	c.neg	1	0	27				
CAN	c.neg	1	0	24				
AFA	c.neg	1	0	22				
FFO	c.neg	1	0.49	20				
FGLM	c.neg	1	0.51	24				
EJR	c.neg	1	0.47	13				
GSDL	c.neg	1	0	19				
AHS	c.neg	1	0	27				
DOF	c.neg	1	0	22				
LVS	c.neg	1	0	27				
EJTC	c.neg	1	0	18				
GRP	c.neg	1	0	24				
728	c.neg	1	0.56	24				
280	c.neg	1	0.64	21				
460	c.neg	1	0.72	29				
501	c.neg	1	0.55	29				
196	c.neg	1	0.57	27				

APÊNDICE II

Resultados obtidos para 23 pacientes em análise de tecidos prostáticos.

Prontuário	Laudo A-P	Grupo	Expressão <i>LSP1</i>	Idade	PSA	Gleason	TNM	T
1817	HPB	2	1.04	72	3.0			
761885	HPB	2	0.63	66	10.0			
106443	HPB	2	1.11	65	5.4			
456970	HPB	2	1.19	58	3.1			
351047	HPB	2	0.87	81	12.0			
786307	HPB	2	1.16	56	2.5			
172094	HPB	2	1.62	64	3.2			
997814	HPB	2	0.84	75	4.5			
103768	Cap	3	1.04	65	5.4	6	T1CN0M0	1
947268	Cap	3	1.63	64	7.5	7	T2N0M0	2
469088	Cap	3	0.5	59	6	7	T2N0M0	2
186024	Cap	3	0.58	78	6.3	6	T2N0M0	2
304288	Cap	3	0.95	72	8.9	5	T3N0M0	3
494577	CaP	3	2.11	68	4.5	6	T1CN0M0	1
507011	CaP	3	0.7	54	8.71	7	T1CN0M0	1
8564	CaP	3	0.89	77	11.1	6	T1CN0M0	1
83012	CaP	3	1.11	49	8.8	7	T1CN0M0	1
628377	CaP	3	0.89	73	13	6	T1AN0M0	1
182848	CaP	3	0.65	55	5.6	7	T2CN0M0	2
17291	CaP	3	1.46	57	8.7	7	T3BN0M0	3
474312	CaP	3	0.55	64	25	6	T3N0M0	3
250615	CaP	3	1.02	44	12.5	6	T2CN0M0	2
245530	CaP	3	0.57	55	6.7	6	T2BN0M0	2

Anexo I

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Termo de Consentimento

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

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

Para realização dos exames laboratoriais, serão necessárias a coleta de 15 mL de sangue periférico e biópsias de tecidos tumorais da próstata. Cabe ressaltar que todo o material utilizado será estéril e descartável, e, no caso das biópsias, serão realizadas juntamente com os procedimentos rotineiros do centro cirúrgico do Hospital de Clínicas, sem qualquer desconforto adicional ao paciente.

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

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

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

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

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

Pelos presentes termos apresentados por este documento, Eu, _____, concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura _____

Testemunhas _____

Anexo II: PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE SANGUE PERIFÉRICO

- 1- Colocar todo o sangue em um tubo limpo de 15 ml
- 2- Centrifugar o sangue por 10 min. a 2.500 rpm, à 4°C
- 3- Descartar o plasma e deixar no máximo 2,5 ml no tubo
- 4- Adicionar 9 partes de cloreto de amônio e 1 parte de bicarbonato de amônio (para 2,5 ml de sangue: 11,25 ml de cloreto e 1,25 ml de bicarbonato (fazer a solução antes de adicionar às células))
- 5- Inverter delicadamente para misturar
- 6- Incubar em gelo por 10 min.
- 7- Centrifugar por 15 min. a 3000 rpm a 4°C e desprezar o sobrenadante
- 8- Adicionar 1 ml de solução D
- 9- Adicionar 7,2 µl de β/2 mercaptoeptanol
- 10-Agitar levemente e mergulhar em gelo
- 11-Adicionar 100 µl de acetato de sódio 2M pH=4
- 12-Adicionar 1 ml de fenol saturado em água pH=4
- 13-Acrescentar 200 µl de clorofórmio – álcool isoamílico (49:1 – 196 µl clorofórmio : 4 µl isopropanol)
- 14-Agitar em vortex a suspensão por 10 s. e distribuir a mistura em microtubos de 2 ml.
- 15-Colocar em gelo por 15 min.
- 16-Centrifugar a amostra por 15 min a 12.000 g. a 4°C.
- 17-Transferir no máximo 1 ml da fase aquosa para outro microtubo e adicionar 1 ml de álcool isopropílico, mantenha a –20°C *overnight*
- 18-Centrifugar a 12.000 g por 15 min a 4°C e descartar o álcool com cuidado
- 19-Lavar o precipitado colocando primeiro 700 µl de álcool etílico absoluto e em seguida 300 µl de água DEPC
- 20-Centrifugar o precipitado a 12.000 por 10 min a 4°C
- 21-Deixar secar a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min e ressuspender em 50 µl de água tratada com DEPC

REAGENTES E SOLUÇÕES PARA O TAMPÃO DE LISE CELULAR

Solução de Trabalho	Estoque	Preparo Solução de Trabalho
320 mM de Sacarose	100%	43,13 g
10 mM Tris-HCl pH 7,5	1M	4,0 ml
5 mM MgCl ₂	1M	2,0 ml
Triton X-100	100%	4,0 ml
Água		Completar até 400 ml

MÁSTER MIX *

Solução de Trabalho	Estoque	Preparo Solução de Trabalho
10 mM Tris-HCl pH 7,5	1,0 M	2,0 ml
10 mM EDTA	0,5 M	4,0 ml
10 mM NaCl	3,0 M	667 µl
0,5 % SDS	10%	10,0 ml
Proteinase K	10 mg/ml	**
Água		Completar até 400 ml

* Pode ser armazenado à temperatura ambiente

** A proteinase K é adicionada na hora do uso, e assim que manipulada, deve ser recongelada a -20°C rapidamente

REAGENTES PARA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO D

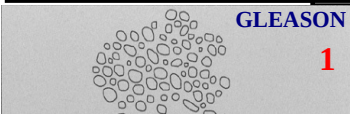
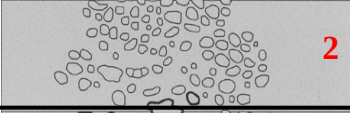
Reagente	Solução de Trabalho
Tiocianato de Guanidina	50 g
Citrato de Sódio 0,75 M, pH 7,0	3,52 ml
Sarcosil 10%	5,3 ml
Água DEPC	58,6 ml

**Anexo III: ESTADIAMENTO DOS ADENOCARCINOMAS DA PRÓSTATA,
CLASSIFICAÇÃO DE WHITMORE-JEWETT E TNM 1992**

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

Anexo IV

SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICO DE GLEASON

Escala de Gleason		GLÂNDULA		
	MARGENS	Padrão Glandular	Tamanho	Distribuição
 GLEASON 1	Bem definida	Simples Separadas Redondas	Médio	Pacote fechado
 2	Menos definida	Simples - Separadas Redondas Mais Variadas	Pequeno Médio Grande	Espaçamento médio de um diâmetro glandular
 3	Irregular Infiltrada	Simples, separadas, mais irregular Massas epiteliais redondas cribriformes ou papilar	Pequeno	Espaçamento médio de mais de um diâmetro glandular. Raramente em pacotes. Massas arredondadas c/
 4	Irregular Infiltrada	Massas glandulares fundidas do tipo hipernefróide	Pequeno	Massas epiteliais anaplásicas irregulares
 5	Mal definida	Poucos e pequenos lúmens envolvidos por massa epitelial sólida às vezes com necrose central	Pequeno	Massas irregulares ou cordões com contornos pouco definidos
Padrões Anatomopatológicos Adenocarcinoma da Próstata				

Fonte: Gleason (1977). **2 a 4 Diferenciado. 5 6 e 7 Moderadamente Dif. 8 a 10 Indif.**

* Como os adenocarcinomas da próstata apresentam mais de um padrão histológico, o diagnóstico final na escala Gleason é dado pela soma dos graus do padrão primário (predominante) e do padrão secundário (segunda menor área representada) (Stamey; McNeal 1992; Isaacs, 1997; Srougi, 1998).