

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXPRESSÃO DOS GENES PCA3 E PSA E SUA UTILIZAÇÃO COMO  
MARCADORES NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER PROSTÁTICO E  
HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA**

ORIENTADO: Fernanda Fonseca Coelho

ORIENTADOR: Profa. Dr<sup>a</sup>. Karina Braga Gomes Borges

BELO HORIZONTE

Julho – 2014

**FERNANDA FONSECA COELHO**

**EXPRESSÃO DOS GENES PCA3 E PSA E SUA UTILIZAÇÃO COMO  
MARCADORES NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER PROSTÁTICO E  
HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Braga Gomes  
Borges

BELO HORIZONTE

Julho – 2014

Coelho, Fernanda Fonseca.

Expressão dos genes PCA3 e PSA e sua utilização como marcadores no diagnóstico do câncer prostático e hiperplasia benigna da próstata [manuscrito]  
/ Fernanda Fonseca Coelho. - 2014.

82 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Karina Braga Gomes Borges.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Biologia Geral.

**Mestranda:** Fernanda Fonseca Coelho

**Orientadora:** Profa. Dr<sup>a</sup>. Karina Braga Gomes Borges

**Colaboradores:** Dr. Carlos Eduardo Corradi Fonseca

Dr. Lucas Mendes Nogueira e Nogueira

Dr. Walter Luiz Ribeiro Cabral

Farmacêutica Flávia Loli Guimarães

Farmacêutica Oriana Sabatina D'Alessandro Romano

**Linha de pesquisa**

Bases Moleculares de Patologias Humanas

**Área de conhecimento**

Genética

**Instituições participantes**

Instituto Hermes Pardini

Hospital das Clínicas de Minas Gerais

“O homem não teria alcançado o possível  
se inúmeras vezes não tivesse tentado  
atingir o impossível.”

(Max Weber)

Dedico esse trabalho  
À minha mãe,  
exemplo de força e dignidade.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde e coragem para atingir meus objetivos.

À minha mãe e meu pai pela eterna dedicação, muitas vezes abdicando dos seus sonhos para que eu realizasse os meus.

À minha irmã Renata pelas conversas e incentivo.

À minha Vó Márcia pelas orações e carinho. Peço desculpas pelos períodos de ausência que a vida me obrigou.

À Tia e madrinha Sandra pelo exemplo e por estar sempre disposta a ajudar.

Ao Leandro por me apoiar sempre, me tornando forte nos momentos difíceis.

À minha orientadora Karina cujos agradecimentos e admiração não podem ser expressos em poucas palavras. Proporcionou-me oportunidades únicas direcionando meu caminho pela profissão desde o início da faculdade. Agradeço a confiança, paciência e por estar sempre disposta a ensinar. Agradeço também as palavras de amizade e carinho.

Às alunas, hoje farmacêuticas, Flávia Loli Guimarães e Oriana Sabatina D'Alessandro Romano pelo auxílio nas coletas e nos procedimentos técnicos. Um futuro brilhante as espera.

Ao Instituto Hermes Pardini pelo apoio financeiro.

Aos colegas de trabalho pelo incentivo e amizade, especialmente à Vanessa Cristina Oliveira pela oportunidade e ao Elvis Mateo Cueva pelas sugestões durante a realização do projeto.

Aos funcionários do Departamento de Radiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais pelo auxílio e suporte nas coletas.

Aos pacientes pela confiança.

Ao médicos urologistas Dr. Carlos Eduardo Corradi Fonseca, Dr. Lucas Mendes Nogueira e Nogueira e Dr. Walter Luiz Ribeiro Cabral pela participação, críticas e auxílio nas coletas.

A toda família e amigos, especialmente Ana Carolina Chagas, Fernanda Valadares, Valquíria Arantes e grupo TXA pela amizade e por incentivarem a vontade de transpor limites.

E a todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE QUADROS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiii
RESUMO.....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	6
2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PRÓSTATA.....	7
2.2 PATOLOGIAS DA PRÓSTATA - epidemiologia, diagnóstico e tratamento .....	8
2.2.1 Prostatite .....	8
2.2.2 Hiperplasia nodular da próstata.....	9
2.2.3 Câncer de próstata .....	11
2.2.3.1 Aspectos patológicos .....	13
2.2.3.2 Diagnóstico .....	14
2.2.3.3 Marcadores Moleculares .....	25
2.2.3.4 Tratamento.....	29
3. OBJETIVOS .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 POPULAÇÃO.....	34
4.2 MASSAGEM PROSTÁTICA .....	34
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	35
4.3.1 Extração do RNA .....	35



4.3.2 Tratamento com DNase.....	36
4.3.3 Quantificação absoluta dos genes <i>PCA3</i> e <i>PSA</i> .....	36
4.4 Análise Estatística .....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS GRUPOS .....	42
5.2 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>PCA3</i> E <i>PSA</i> , E DOS NÍVEIS DO PSA SÉRICO TOTAL ENTRE OS GRUPOS .....	43
5.3 VALIDADE DOS MARCADORES COMO TESTES DE DIAGNÓSTICO .....	47
5.4 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DO TUMOR .....	53
6. DISCUSSÃO.....	56
6.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS GRUPOS .....	57
6.2 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>PCA3</i> E <i>PSA</i> , E DOS NÍVEIS SÉRICOS DO PSA TOTAL ENTRE OS GRUPOS.....	57
6.3 VALIDADE DOS MARCADORES COMO TESTES DE DIAGNÓSTICO .....	61
6.4 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DO TUMOR .....	64
6.5 UTILIZAÇÃO DO TESTE DE DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>PCA3</i> .....	65
7. CONCLUSÕES .....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – COEP/UFMG.....	76
ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – DEPE/HC-UFMG .....	77
APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	78
APÊNDICE 2 - FICHA CLÍNICA .....	80
APÊNDICE 3 - RESUMOs ACEITOS PARA APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO .....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia da próstata .....	7
Figura 2: Próstata normal e Hiperplasia nodular da próstata .....	9
Figura 3: Incidência de câncer na população brasileira estimada para 2014, exceto pele não melanoma .....	12
Figura 4: Progressão do Câncer de Próstata .....	13
Figura 5: Exame do toque retal .....	15
Figura 6: Biossíntese do PSA.....	18
Figura 7: Classificação de Gleason.....	21
Figura 8: Progressão do câncer de próstata de acordo com os estágios .....	25
Figura 9: Esquema da unidade de transcrição do gene <i>PCA3</i> .....	26
Figura 10: Esquema dos métodos de tratamento mais utilizados para o câncer de próstata. ....	30
Figura 11: Instruções para a execução da massagem prostática .....	35
Figura 12: Procedimentos laboratoriais. ....	40
Figura 13: Número de cópias do gene <i>PCA3</i> normalizado entre os grupos CaP e HBP. ....	45
Figura 14: Número de cópias do gene <i>PSA</i> normalizado entre os grupos CaP e HBP. ..	45
Figura 15: Relação <i>PCA3/PSA</i> (número de cópias) entre os grupos de CaP e HBP. ....	46
Figura 16: Níveis de PSA sérico total entre os grupos de CaP, HBP e controle.....	46
Figura 17: Curva ROC para o número de cópias dos genes <i>PCA3</i> , <i>PSA</i> e relação <i>PCA3/PSA</i> .....	48
Figura 18: Curva ROC para os níveis séricos de PSA total. ....	49
Figura 19: Curva ROC para os níveis séricos de PSA total considerando o grupo controle versus o grupo de CaP + HBP.....	51

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Características clínicas e demográficas entre os grupos estudados. ....	42
Tabela 2: Número de cópias dos genes <i>PCA3</i> e <i>PSA</i> normalizados e níveis séricos de <i>PSA</i> total entre os grupos estudados. ....	44
Tabela 3: Frequência das variáveis <i>PCA3</i> , <i>PSA</i> (expressão) e <i>PSA</i> sérico total categorizadas nos grupos estudados. ....	47
Tabela 4: Valores dos pontos de corte ( <i>cut off</i> ) determinados para as variáveis estudadas.....	50
Tabela 5: Número de indivíduos com valores maiores e menores que o <i>cut off</i> para cada variável considerando apenas indivíduos com CaP e HBP. ....	50
Tabela 6: Valor dos pontos de corte ( <i>cut off</i> ) determinado para o <i>PSA</i> sérico total. ....	52
Tabela 7: Número de indivíduos com valores maiores e menores que o <i>cut off</i> para a variável <i>PSA</i> total entre dois grupos. ....	52
Tabela 8: Desempenho do teste de detecção da expressão do gene <i>PCA3</i> no diagnóstico do Adenocarcinoma Prostático.....	53
Tabela 9: Número de cópias dos genes <i>PCA3</i> e <i>PSA</i> normalizados, razão <i>PCA3/PSA</i> e níveis séricos de <i>PSA</i> total de acordo com a Classificação de Gleason.....	54
Tabela 10: Valores de coeficiente de correlação para as variáveis estudadas no grupo CaP.....	55

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Frequência de complicações pós-biópsia da próstata. ....	19
Quadro 2: Sistema TNM de Classificação. ....	23
Quadro 3: Classificação por estágios. ....	24
Quadro 4: Sequências do padrão sintetizado para construção das curvas padrão do <i>PSA</i> e <i>PCA3</i> . ....	37
Quadro 5: Reagentes utilizados no preparo da reação para as amostras. ....	38
Quadro 6: Reagentes utilizados no preparo da reação para as curvas padrão. ....	38
Quadro 7: Identificação das sondas utilizadas. ....	39
Quadro 8: Condições da reação de PCR. ....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ACTB	Gene referência $\beta$ -actina
ANOVA	Analysis of variance
ASC	Área sob a curva
AUA-SI	American Urological Association Symptom Index
BPSA	PSA benigno
CaP	Câncer de próstata
cDNA	DNA complementar
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
COEP-UFMG	Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
cPSA	PSA complexado
cq	Ciclo <i>quantification</i>
ct	Ciclo <i>threshold</i>
<i>Cut off</i>	Valor de corte
DD3	Differential Display Clone 3
DEPE	Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRE	Exame digital retal ou toque retal
EPCA	Prostate cancer antigen ou antígeno do câncer de próstata
<i>Et al.</i>	E outros
FDA	Food and Drug Administration
fPSA	PSA livre ou free-PSA
g	Força gravitacional
GWAS	Genome-wide association studies
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HBP	Hiperplasia Benigna da Próstata ou Hiperplasia Nodular da Próstata
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iPSA	PSA inativo
IPSS	International Prostate Symptom Score
Kb	Kilobases

LHRH	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
miRNAs	micro RNAs
mL	Mililitros
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanogramas
NIH	National Institutes of Health
NIP	Neoplasia intra-epitelial da próstata
nm	Nanômetros
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCA3	Gene 3 do câncer de próstata
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSA	Antígeno Prostático Específico
PSAD	Densidade do PSA
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
RNA	Ácido ribonucléico
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RTU	Ressecção transuretral
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TMPRSS2:ERG	Fusão do gene TMPRSS2 com o gene ERG
tPSA	PSA total
UICC	União Internacional Contra o Câncer
uL	Microlitros

## RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens em todo o mundo. Devido ao número crescente de casos, é importante o desenvolvimento de um teste não invasivo para o diagnóstico diferencial do CaP e outras alterações prostáticas. Estudos mostraram que o gene 3 do câncer de próstata (*PCA3*) apresenta elevados níveis de expressão no tecido tumoral, o que estaria associado a um aumento da probabilidade de biópsia positiva. Este trabalho objetivou avaliar a expressão dos genes *PCA3* e *PSA* na urina de pacientes com hiperplasia nodular (HBP) ou CaP do tipo adenocarcinoma, comparados a um grupo de indivíduos hígidos. Participaram do estudo 59 homens atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) para realização de biópsia prostática, sendo 22 pacientes com CaP, 26 com HBP e 11 indivíduos hígidos (controle). Foi coletada urina pós-massagem prostática da qual foi obtido o RNA. Após esse procedimento, prosseguiu-se à quantificação absoluta por PCR em Tempo Real da expressão dos genes *PCA3* e *PSA*, além da obtenção dos valores de PSA sérico total. Entre os indivíduos com detecção de expressão do *PCA3*, 16 apresentaram biópsia positiva e apenas 4 apresentaram biópsia negativa. Entre os indivíduos do grupo com HBP, 4 apresentaram níveis detectáveis de *PCA3*, enquanto no grupo controle, nenhum indivíduo apresentou detecção da expressão deste gene. Não foi observada diferença significativa na média do número de cópias dos genes *PCA3*, *PSA*, da relação *PCA3/PSA* e nos níveis de PSA total quando comparados os grupos de pacientes com CaP e HBP, mas um maior número de indivíduos com CaP e expressão de *PCA3* e *PSA* positiva, bem como níveis de PSA total  $\geq 4\text{ng/mL}$ , foi observado quando comparado aos outros grupos. A área obtida sob a curva ROC foi 0,625; 0,596; 0,559 e 0,503, respectivamente para as variáveis acima citadas. A sensibilidade e a especificidade do teste para o *PCA3* foram 73% e 85%, respectivamente. Considerando-se os valores de *cut off* estimados (0,2219 para o *PCA3* e 0,5007 para a relação *PCA3/PSA*), foi possível observar uma diferença significativa entre o número de indivíduos com valores acima destes no grupo CaP quando comparado ao grupo com HBP. Conclui-se que o teste qualitativo de expressão do *PCA3* aponta ser um biomarcador útil na diferenciação do indivíduo com CaP ou HBP daqueles sem alterações prostáticas, mas o teste quantitativo do número de cópias de *PCA3* e *PSA* não foi capaz de discriminar os indivíduos com CaP ou HBP, sendo necessários mais estudos com um grupo amostral maior para confirmar estes achados.

**Palavras-chave:** câncer de próstata, hiperplasia nodular, *PCA3*, *PSA*, expressão gênica.

## ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer in men worldwide. Due to the increased number of cases, it is important to develop a non-invasive test for the differential diagnosis of PCa and other prostatic alterations. Studies have shown that the gene 3 of prostate cancer (*PCA3*) shows high levels of expression in tumor tissue, which would be associated with increased probability of a positive biopsy. This study evaluated the expression of *PCA3* and *PSA* genes in urine from patients with nodular prostatic hyperplasia (BPH) or PCa adenocarcinoma type, compared to a group of healthy individuals. The study included 59 men treated at the Clinical Hospital of the Federal University of Minas Gerais (HC-UFMG) to perform prostate biopsy, 22 patients with PCa, 26 BPH and 11 healthy subjects (controls). Post-prostatic massage urine was collected which the RNA was obtained. Real Time PCR performed the absolute quantification of the *PCA3* and *PSA* genes expression. In addition, we obtained the values of total serum PSA. Among subjects with detection of *PCA3* expression, 16 presented positive biopsy and only 4 had negative biopsy. Among subjects with BPH, 4 showed detectable levels of *PCA3*, while in the control group, no individual revealed detection of this gene expression. No significant difference was observed in the mean number of copies of *PCA3* and *PSA* genes, *PCA3/PSA* ratio and total PSA levels when the groups of patients with PCa and BPH were compared, but a higher number of individuals with CaP and positive expression of *PCA3* and *PSA* and total PSA levels  $\geq 4\text{ng/mL}$  was observed when compared to the other groups. The area under the ROC curve was 0.625; 0.596; 0.559 and 0.503, respectively for the variables mentioned above. The sensitivity and specificity of the *PCA3* test were 73% and 85%, respectively. Considering the estimated cutoff values (0.2219 and 0.5007 for the *PCA3* and *PCA3/PSA* relation), we observed a significant difference between the number of individuals with values above these in PCa group compared to the BPH. We conclude that the qualitative expression of *PCA3* test could be applied in the initial screening for differentiation of the individual with CaP or BPH from those without prostate changes. However, the quantitative test for the *PCA3* and *PSA* number of copies was not able to discriminate individuals with CaP or BPH, and further studies with a larger sample group should be conducted in order to confirm these findings.

**Keywords:** prostate cancer, nodular hyperplasia, *PCA3*, *PSA*, gene expression.



**1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

O Câncer de Próstata (CaP) do tipo adenocarcinoma é uma doença complexa que envolve fatores genéticos, epigenéticos, hormonais e ambientais, sendo o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens no Brasil para o qual observa-se uma crescente taxa de incidência. O CaP consiste em uma alteração maligna nas células prostáticas que pode atingir outros tecidos e levar à morte se não diagnosticada e tratada de maneira adequada enquanto confinada ao órgão.

Atualmente, o rastreamento do CaP é realizado pela dosagem de PSA (Antígeno Prostático Específico) no sangue, combinado com o exame clínico (toque retal). Quando estes exames preliminares sugerem a existência da doença, é indicada a biópsia prostática transretal. O diagnóstico confirmatório é feito pelo estudo histopatológico do tecido obtido na biópsia.

A detecção sérica do PSA, glicoproteína secretada no fluido prostático, surgiu como um marcador promissor do CaP e ainda é muito utilizada no rastreamento da doença. Mas seus níveis aumentam no câncer e em alterações benignas da próstata, por isso é um marcador pouco específico para o diagnóstico de CaP. Desta maneira, quando há alteração nos níveis de PSA ou presença de nódulos, a biópsia prostática é indicada, sendo esta um processo invasivo e muitas vezes desnecessário.

A utilização de marcadores moleculares é uma nova ferramenta que mostra-se promissora no diagnóstico do CaP. Além de serem mais específicos, possibilitam diagnóstico precoce e não invasivo. Desta forma, um grande número de marcadores para o diagnóstico do CaP têm sido estudados, mas um deles, a expressão do gene 3 do Câncer de Próstata (*PCA3*), tem apresentado resultados relevantes no que diz respeito ao seu valor para o diagnóstico.

O gene *PCA3* ou *DD3* (Differential Display Clone 3) foi identificado em 1999 por Bussemakers e colaboradores em um estudo de expressão gênica apresentando níveis altos de expressão no tecido tumoral comparado com os níveis de expressão no tecido normal adjacente. A superexpressão do gene *PCA3* foi observada em 95% das amostras de CaP e não foi detectada expressão do gene em nenhum outro tecido tumoral ou normal de vários órgãos, nem mesmo em leucócitos, presente nos fluidos corporais. Em tecidos não tumorais ou na presença de alterações benignas da

próstata, foram detectados níveis muito baixos de expressão do gene. Em 2003, Hessels e colaboradores demonstraram que é possível detectar a expressão do gene na primeira urina após massagem prostática quando há apenas 10% de células tumorais em meio às células prostáticas normais. A forte associação entre a superexpressão do gene *PCA3* e as alterações malignas na próstata têm atribuído ao gene um importante papel como marcador no diagnóstico do CaP.

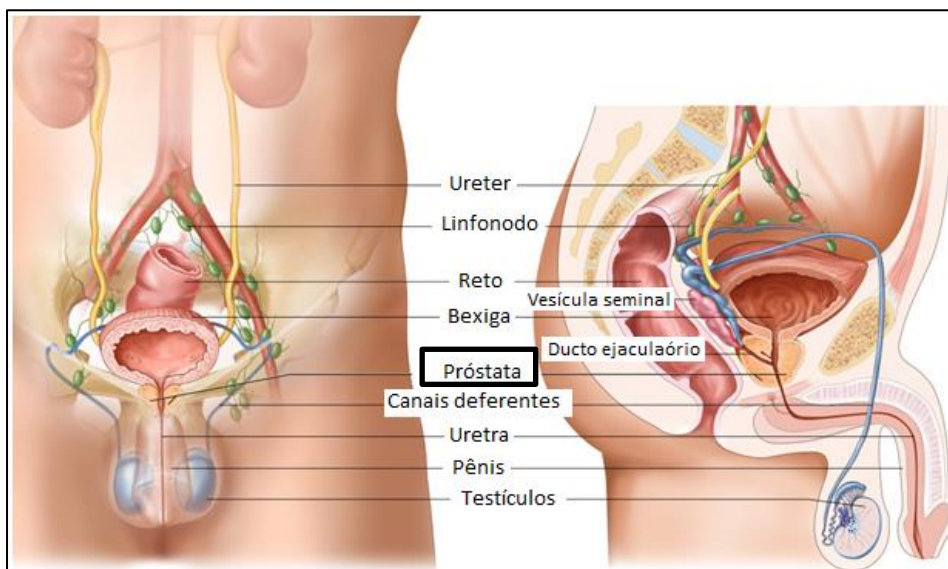
Com o aumento do número de casos de pacientes com alterações na próstata, é de extrema importância a existência de um teste de diagnóstico precoce, não invasivo, de alta especificidade e sensibilidade. Assim, no sentido de melhorar o diagnóstico de alterações na próstata, diferenciando precocemente processos benignos e malignos através de testes não invasivos, este estudo propõe a avaliação da expressão do gene *PCA3* em indivíduos sem alterações prostáticas e pacientes com hiperplasia nodular prostática ou CaP.

Uma vez determinada esta relação, os resultados poderão contribuir para a padronização de um marcador que permita detectar formas precoces do CaP em indivíduos assintomáticos, possibilitando intervenções imediatas e o tratamento da doença. Indivíduos com alterações benignas também podem ser beneficiados, pois será possível evitar biópsias repetitivas quando não for detectada expressão relevante dos genes.

**2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 ANATOMIA E FISILOGIA DA PRÓSTATA

A próstata é uma glândula do sistema urinário masculino localizada abaixo da bexiga e anterior ao reto (Figura 1). É classicamente descrita como uma glândula “em forma de noz” com peso médio de 20 gramas e envolve a uretra imediatamente abaixo da bexiga. É composta por uma base, ápice, superfícies anterior, posterior e lateral inferior. A superfície posterior é voltada para o reto. (Lee, Akin-Olugbade et al. 2011)



**Figura 1: Anatomia da próstata. Adaptado de: Cancer library – The University of Chicago Medicine. (2013)**

A próstata é composta por elementos glandulares e estromais envolvidos por um espessamento de fibras musculares. Sua função é produzir e secretar o líquido prostático, líquido que propicia a locomoção dos espermatozoides. O líquido seminal constitui o sêmen ao se juntar às secreções oriundas das vesículas seminais e testículos na uretra. (Lee, Akin-Olugbade et al. 2011)

O desenvolvimento da próstata é controlado por hormônios esteroides. Sua função secretora é dependente de estimulação direta das células epiteliais prostáticas por andrógenos. O controle proliferativo depende também de interações célula-célula, o que ainda é pouco compreendido. (Hayward and Cunha 2000; ACS 2012)

## **2.2 PATOLOGIAS DA PRÓSTATA - EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO**

### **2.2.1 PROSTATITE**

A Prostatite se refere a um conjunto de sinais e sintomas que ocorrem na próstata como resultado de uma inflamação da glândula. Existem muitas causas para a prostatite como, por exemplo, a infecção bacteriana, mas sua etiologia ainda não é exatamente conhecida. A prostatite pode acometer homens de qualquer idade, sendo mais frequente em idosos. (Schiller and Parikh 2011)

Pacientes com prostatite bacteriana apresentam sintomas de uma infecção aguda como febre, calafrios e mal estar. Também podem ocorrer disúria, aumento da frequência de micção e sensação de esvaziamento incompleto. (Schiller and Parikh 2011)

A prostatite foi recentemente dividida em 4 categorias principais, segundo sugerido pelo National Institutes of Health (NIH) nos Estados Unidos:

- 1) Tipo I ou Prostatite bacteriana aguda: é caracterizada pela presença de sintomas agudos relacionados à infecção bacteriana da glândula.
- 2) Tipo II ou Prostatite bacteriana crônica: presença de infecção recorrente do trato urinário.
- 3) Tipo III ou Síndrome de dor pélvica: podendo ser inflamatória (Tipo IIIA) ou não inflamatória (Tipo IIIB): quando o paciente relata dor inflamatória duradoura devido a causas não bacterianas.
- 4) Tipo IV ou Prostatite inflamatória assintomática: refere-se a pacientes que não têm um histórico de complicações no trato urinário, mas acidentalmente é detectada uma inflamação na próstata.

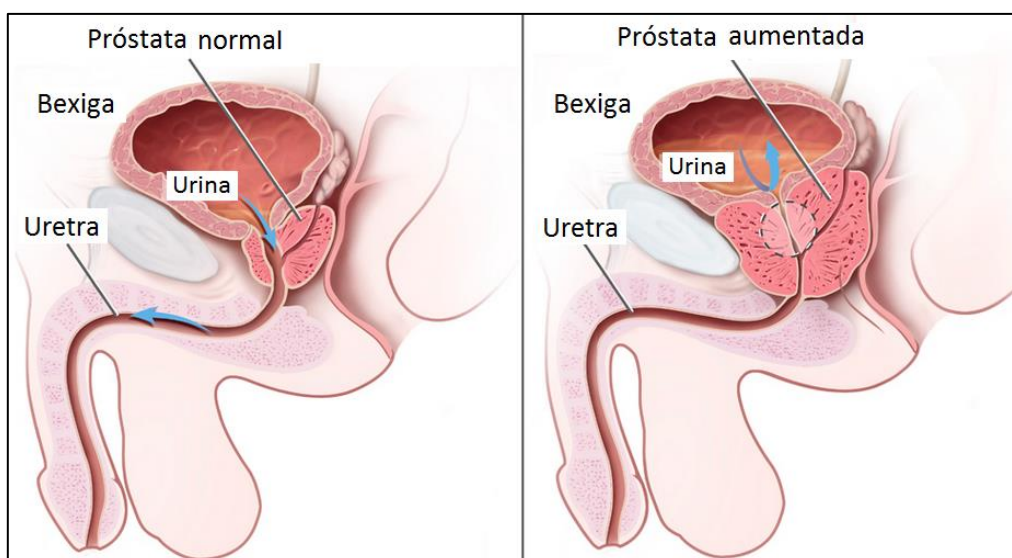
O diagnóstico é baseado no histórico do paciente, exames médicos e laboratoriais. O exame de urina rotina pode acusar bacteriúria e a urocultura pode identificar o microrganismo. Exames complementares podem ainda ser solicitados, como a biópsia prostática, para exclusão de outras patologias. (Schiller and Parikh 2011; Alshahrani, McGill et al. 2013)

Para uma correta caracterização dos tipos de prostatite, os pacientes deveriam ser submetidos à coleta de secreções prostáticas após massagem prostática, sendo analisadas as secreções e a urina coletada após esta massagem. Na prática clínica, no entanto, nem sempre se realiza este procedimento, o que dificulta a correta classificação do caso. (Schiller and Parikh 2011; Alshahrani, McGill et al. 2013)

Um tratamento efetivo depende da identificação da causa, mas um microrganismo nem sempre é detectado, principalmente em casos de prostatite crônica. Geralmente recorre-se aos antibióticos da classe das fluoroquinolonas, que têm demonstrado bons resultados mesmo quando não é identificado o patógeno. O uso de anti-inflamatórios pode ser necessário em combinação ou depois do tratamento com antibiótico. (Schiller and Parikh 2011; Alshahrani, McGill et al. 2013)

### 2.2.2 HIPERPLASIA NODULAR DA PRÓSTATA

A hiperplasia nodular da próstata, também conhecida como hiperplasia benigna da próstata (HBP) é caracterizada histologicamente pela presença de nódulos na zona periuretral da próstata com hiperplasia da glândula e aparecimento de sintomas obstrutivos e irritativos devido à compressão da uretra (Figura 2). (Srougi 2013)



**Figura 2: Próstata normal e Hiperplasia nodular da próstata. Adaptado de: Cancer library – The University of Chicago Medicine. (2013)**

A prevalência da HBP aumenta com a idade, sendo 20% em homens acima de 40 anos e chegando a 90% em homens acima de 70 anos. Entre os sintomas típicos incluem

dificuldade para urinar, diminuição do fluxo urinário, noctúria, incontinência e infecções recorrentes do trato urinário, podendo levar à distensão da bexiga, embora sintomas agudos com completa incapacidade de esvaziamento da bexiga são raros e requerem cateterização imediata. (Edwards 2008; McVary 2010)

O rastreamento é realizado através do exame de toque retal, dosagem de PSA sérico e história clínica do paciente. Posteriormente são realizados exames para exclusão do diagnóstico, como a biópsia prostática, ou pesquisa de outras patologias como a prostatite, câncer de próstata ou de bexiga. (Edwards 2008; McVary 2010)

Para tratamento dos sintomas, recorre-se a medicamentos ou intervenções cirúrgicas. A utilização de bloqueadores alfa adrenérgicos auxilia no alívio dos sintomas relativamente rápido. Estes medicamentos promovem o relaxamento do músculo liso ao bloquearem os receptores alfa adrenérgicos que, sem bloqueio, promovem então a contração da uretra. O início de ação é lento, mas diminui os sintomas obstrutivos. (Edwards 2008; McVary 2010)

O crescimento da próstata é estimulado por hormônios androgênicos, principalmente a dihidrotestosterona. Baseado neste mecanismo, outra classe de medicamentos, os inibidores de 5-alfa redutase, como a Finasterida, são utilizados no tratamento do HBP, pois inibem a conversão de testosterona em dihidrotestosterona, suprimindo o crescimento da glândula. A eficácia é maior em pacientes com volume prostático maior que 40 mL e/ou PSA sérico maior que 1,6 ng/mL. (Edwards 2008; McVary 2010; Srougi 2013)

Desde a última década, algumas intervenções cirúrgicas têm sido utilizadas para aliviar os sintomas da HBP. Já a ressecção transuretral (RTU), cirurgia para remoção de parte do tecido prostático via uretra, promove alívio permanente dos sintomas e é considerada como o procedimento mais eficiente para HBP. Novas técnicas cirúrgicas à laser têm eficiência comparável a RTU e com menor morbidade, mas o alívio dos sintomas pode ser menos duradouro. (Edwards 2008; McVary 2010)



### **2.2.3 CÂNCER DE PRÓSTATA**

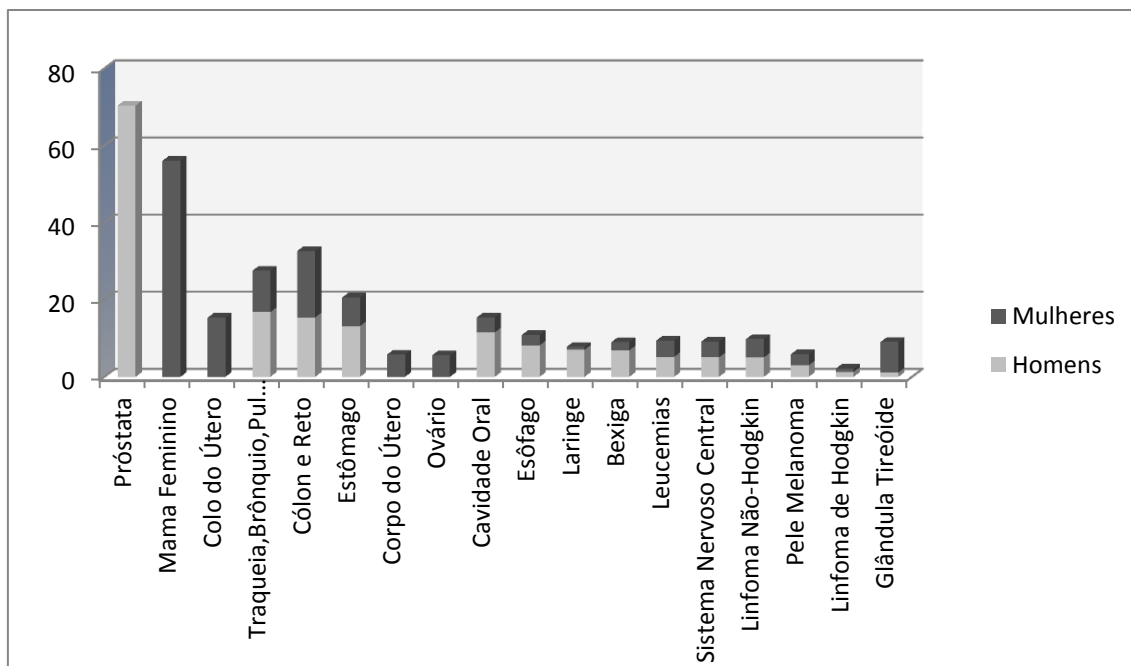
No Brasil, a estimativa para o ano de 2014 aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, sendo o câncer de pele não melanoma o mais prevalente em ambos os sexos. (MS/INCA 2013)

O câncer, ou tumor maligno, é um agregado de células com capacidade de invadir outros tecidos. Sabe-se que alterações no DNA destas células são responsáveis por mudanças em seu fenótipo levando a características neoplásicas de multiplicação e invasão.

No câncer somático uma série de mutações específicas se acumula na célula precursora. Estas mutações alteram a atividade gênica, aumentando a habilidade da célula em proliferar e diminuindo sua susceptibilidade à via de apoptose, ou ainda aumentam a taxa de mutação, ou seja, aumentam a probabilidade de que novas mutações ocorram. Dessa forma, ocorre uma desregulação nos processos de replicação e morte celular favorecendo o crescimento das células alteradas. (Pierce 2008; Griffiths 2009)

A incidência do CaP aumenta com a idade, acometendo principalmente homens com mais de 50 anos, resultando em grandes impactos nos sistemas de saúde, com tendência ao crescimento devido à crescente exposição da população a fatores de risco, ao aumento da expectativa de vida, a melhoria e evolução dos métodos diagnósticos e da qualidade dos sistemas de informação, além da disseminação do rastreamento através da dosagem do PSA e do exame de toque retal. (MS/INCA 2013)

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de mortes em 2011 devido ao CaP chegou a 13.129 casos. E a estimativa de novos casos para 2014 chega a 69 mil casos, atingindo 22,8% dos homens no Brasil. (Figura 3). (MS/INCA 2013)



**Figura 3: Incidência de câncer na população brasileira estimada para 2014, exceto pele não melanoma. Adaptado de: MS/INCA Estimativa de Câncer no Brasil, 2013. (MS/INCA 2013)**

Além da idade, a etnia e a história familiar da doença também são consideradas fatores de risco. O CaP é aproximadamente duas vezes mais comum em homens negros se comparados aos brancos, o que pode ser atribuído à hereditariedade, ao estilo de vida ou a fatores associados à detecção da doença. (De Marzo, DeWeese et al. 2004; Nelson, De Marzo et al. 2004; Ishak and Giri 2011; MS/INCA 2013)

A alimentação também é um importante fator de risco. Dietas com base em gordura animal, carne vermelha, embutidos e cálcio têm sido associadas ao aumento no risco de desenvolver câncer na próstata. Além disso, a obesidade também é apontada no aumento do risco de desenvolver essa neoplasia. Em contrapartida, é possível que dietas ricas em vegetais, vitaminas D e E, licopeno e ômega-3 sejam capazes de conferir algum efeito protetor contra o CaP. (De Marzo, DeWeese et al. 2004; Nelson, De Marzo et al. 2004; Ishak and Giri 2011)

O diagnóstico é tardio em muitos casos, o que ocorre devido à baixa sensibilidade e especificidade das técnicas disponíveis e também à restrição masculina de realizar o exame de toque retal rotineiramente. A mortalidade apresenta um perfil ascendente semelhante ao da incidência no Brasil, embora sua abrangência seja mais baixa. Pode ser considerado de bom prognóstico se diagnosticado e tratado precocemente,

apresentando uma sobrevida aproximada de 80%. (De Marzo, DeWeese et al. 2004; Nelson, De Marzo et al. 2004; Ishak and Giri 2011)

### 2.2.3.1 ASPECTOS PATOLÓGICOS

O CaP é uma doença complexa e sabe-se que os fatores genéticos contribuem para o desenvolvimento do câncer, mas as variantes envolvidas ainda são desconhecidas. O CaP mais comum é o adenocarcinoma ou câncer glandular, acometendo em especial a zona periférica. (Abate-Shen and Shen 2000; De Marzo, DeWeese et al. 2004; Nelson, De Marzo et al. 2004)

Sugere-se que inflamações/infecções da próstata contribuem para a carcinogênese na próstata, uma vez que a inflamação crônica subclínica provoca danos oxidativos nas células danificando o material genético e propiciando a replicação celular, angiogênese e invasão. (Abate-Shen and Shen 2000; De Marzo, DeWeese et al. 2004; Nelson, De Marzo et al. 2004)

O processo geralmente inicia-se com uma neoplasia intra-epitelial da próstata (NIP), que é caracterizada por formas celulares variadas, além de aumento no tamanho do núcleo das células e perda na arquitetura da glândula. Consequentemente, pode ocorrer metástase quando há invasão do estroma e outros tecidos. Sugere-se que estas alterações estejam relacionadas a regiões cromossômicas específicas e à inativação de genes supressores tumorais, tais como o *p53*. (Figura 4). (Abate-Shen and Shen 2000; De Marzo, DeWeese et al. 2004; Nelson, De Marzo et al. 2004)

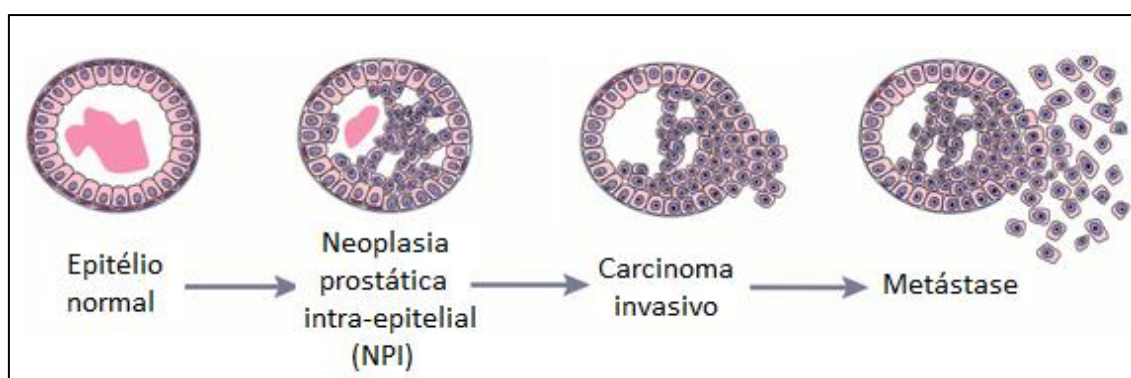


Figura 4: Progressão do Câncer de Próstata. Adaptado de: Abate-Shen and Shen (2000).

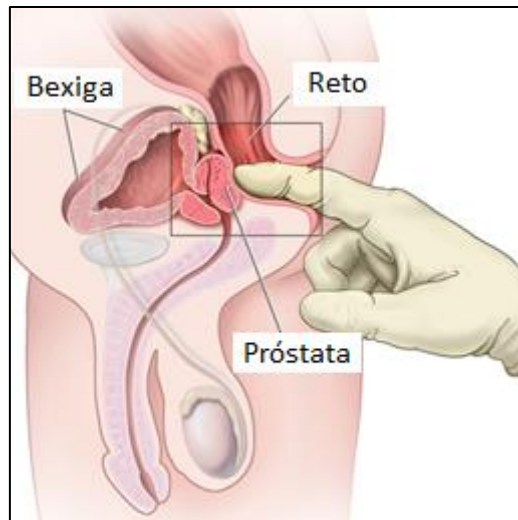
### 2.2.3.2 DIAGNÓSTICO

Os principais procedimentos utilizados para diagnóstico do CaP são o exame de toque retal, a determinação sérica de PSA e a biópsia prostática. (NICE 2008)

A idade de início de rastreio do CaP ainda é controversa. A *American Cancer Society* recomenda que os homens iniciem o rastreamento a partir dos 50 anos, exceto em homens de etnia negra ou quando existirem parentes de primeiro grau (pai, irmão) diagnosticados com CaP, os quais deveriam iniciar os exames com 45 anos. Já a *American Urological Association* e a *National Comprehensive Cancer Network* preconizam que o rastreio deve começar com 40 anos. Essa controvérsia existe pelo fato de que os casos de câncer entre 40 e 50 anos são raros, sendo considerado desnecessário o rastreamento, que muitas vezes provoca ansiedade. (Hayward and Cunha 2000; Lucia, Darke et al. 2008; Marco F. Dall'Oglio 2011; ACS 2012)

#### **Toque retal**

O exame do toque retal ou exame digital retal (DRE) é o método de rastreio mais utilizado para o CaP, apesar de ser considerado desconfortável e indesejado pelos homens (Figura 5). Neste procedimento, o médico verifica alguma anormalidade no tamanho e consistência da próstata através do reto do paciente. É um método de alta variabilidade entre examinadores e pode não detectar alterações confinadas ao órgão. Somente as porções posterior e lateral da próstata, que estão voltadas para o reto, são apalpadas durante o exame. No estudo de Sunanda e colaboradores (2014) o DRE apresentou sensibilidade de 60% na detecção do CaP, o que é considerando baixo, e a especificidade foi de 92,5%. O DRE é um método indispensável para rastreio do CaP, mas são necessários outros métodos complementares para auxiliar no diagnóstico. (Yamamoto, Ito et al. 2001; Sun, De et al. 2014)



**Figura 5: Exame do toque retal. Adaptado de: Cancer library – The University of Chicago Medicine. (2013)**

## PSA

O antígeno prostático específico (PSA) é uma glicoproteína da família das calicreínas secretada no fluido prostático que tem como função degradar proteínas de alto peso molecular a fim de aumentar a fluidez do sêmen. O gene que codifica o PSA localiza-se no braço longo do cromossomo 19 e é denominado de calicreína humana 3. (Riegman, Vlietstra et al. 1991; Balk, Ko et al. 2003; Riffenburgh and Amling 2003)

Os níveis de PSA aumentam no sangue quando há alguma alteração na próstata que ocasiona a perda da arquitetura normal da glândula e o PSA ganha a circulação periférica. Segundo Riegman e colaboradores (1991), a transcrição do gene do PSA é regulada positivamente pela interação de andrógenos aos seus receptores, então uma variação hormonal também poderia ser a causa de níveis aumentados da glicoproteína. O aumento dos níveis de PSA pode ocorrer no CaP como também em alterações benignas e em manipulações da glândula, como na ejaculação e exame do toque retal. (Riegman, Vlietstra et al. 1991; Balk, Ko et al. 2003; Riffenburgh and Amling 2003)

De acordo com as diretrizes para o CaP, o valor de referência aceito como normal para o PSA é menor que 4 ng/mL, mas existem casos de CaP em pacientes com níveis menores que 4 ng/mL e casos de alterações benignas em pacientes com níveis maiores que 4 ng/mL, considerando homens na faixa de idade de rastreio. Alguns

pesquisadores preconizam que o valor de referência seja 2,5 ng/mL, principalmente em homens abaixo de 60 anos. (Thompson, Pauler et al. 2004; Hessels and Schalken 2009; Marco F. Dall'Oglio 2011)

Segundo Hessels *et al* (2009), pacientes com níveis séricos de PSA entre 3 e 10 ng/mL, já considerado elevado, apresentam chance de 60 a 75% de apresentarem biópsia negativa. Já Thompson *et al.* (2004) demonstraram que o CaP pode ser encontrado em homens com níveis de PSA menores que 4 ng/mL. (Thompson, Pauler et al. 2004; Hessels and Schalken 2009)

O grande número de pacientes com níveis elevados de PSA e biópsia negativa é o grande problema clínico na abordagem atual. A detecção e quantificação de diferentes formas de PSA, como o PSA livre, têm sido utilizadas para tentar melhorar o uso do PSA como um marcador do CaP, mas ainda existem limitações. Cabe ao médico avaliar o valor de corte do PSA para cada homem individualmente. (ACS 2012)

#### **Velocidade do PSA**

A velocidade do PSA mede o quanto o PSA aumenta no período de um ano para um indivíduo. Essa medida tem sido muito valorizada para aumentar a especificidade do teste. O aumento de PSA acima de 0,75 ng/mL por ano parece estar associado ao alto risco de CaP em homens com PSA inicial entre 4 e 10 ng/mL. Porém, valores da velocidade de elevação do PSA de 0,4 ng/mL por ano já pode indicar alterações em homens com PSA inicial abaixo de 4,0 ng/mL, principalmente nos mais jovens. Este método também tem variações interindividuais e variações que dependem da metodologia utilizada. (Riffenburgh and Amling 2003)

Segundo Riffenburgh *et al* (2003), a velocidade do PSA foi capaz de prever casos de biópsia positiva em 68% e 52% dos pacientes com valor de PSA sérico de 4 e 10 ng/uL, respectivamente, sugerindo que este método pode auxiliar na detecção precoce de homens em situação de risco para o CaP. (Riffenburgh and Amling 2003)

#### **Densidade do PSA**

A densidade do PSA (PSAD) é definida como a divisão do PSA sérico total pelo volume prostático, que é determinado no ultrassom transretal. O valor de referência sugerido

é 0,15 ng/mL/cm<sup>3</sup>. O PSAD pode ajudar a distinguir entre CaP ou HBP em homens com níveis de PSA entre 4 e 10ng/uL, mas o seu uso é ainda controverso. Segundo Catalona *et al* (1998), o PSA maior que 0,15 ng/mL/cm<sup>3</sup> auxilia na detecção precoce do CaP em 50% dos pacientes com PSA entre 4 e 10ng/mL, enquanto Brawer *et al* (1993) não encontraram associação significativa entre o CaP e o PSAD. (Brawer, Aramburu et al. 1993; Catalona, Partin et al. 1998; Obort, Ajadi et al. 2013)

### **Relação PSA livre e PSA total (%fPSA)**

A maioria do PSA sérico está complexada ao inibidor de protease  $\alpha$ -1 antiqumiotripsina e apenas 10 a 30% está na forma livre ou *free*-PSA (fPSA). Estas duas formas somadas constituem o PSA total (tPSA). Os níveis de fPSA geralmente são mais baixos no CaP do que em alterações benignas. Um valor baixo para a razão fPSA e tPSA (ou %fPSA), menor que 25%, aumenta a probabilidade de câncer em 95% entre pacientes com valores de PSA sérico de 4 a 10 ng/uL. A %fPSA é útil em pacientes com valores elevados de PSA total persistentes e biópsias negativas repetidas, melhorando a especificidade do PSA total. (Brawer, Aramburu et al. 1993; Catalona, Richie et al. 1994; Marco F. Dall'Oglio 2011; Obort, Ajadi et al. 2013)

Catalona *et al.* (1998) demonstraram que homens com tPSA entre 4 e 10 ng/mL apresentam incidência de câncer em apenas 8% dos casos quando a %fPSA é maior que 25%, enquanto que 56% dos homens apresentaram o CaP com a %fPSA menor que 10%. Assim, foi proposto um valor de corte de 25% para a %fPSA. (Brawer, Aramburu et al. 1993; Catalona, Richie et al. 1994; Marco F. Dall'Oglio 2011; Obort, Ajadi et al. 2013)

### **Isoformas do PSA**

O PSA é sintetizado nas células prostáticas como uma sequência líder inativa de 237 aminoácidos denominado pré-pró-PSA. Esta sequência é clivada gerando uma proteína também inativa, o [-7]pró-PSA. Este pode sofrer degradação parcial e gerar diferentes isoformas, tais como o [-2], [-4] e [-5] pró-PSA que podem atingir a circulação periférica, constituindo parte do PSA livre. A clivagem no lúmen da glândula do pró-PSA gera a enzima ativa, o PSA propriamente dito. Ao passar para a circulação, o PSA pode se complexar então à  $\alpha$ -1 antiqumiotripsina constituindo o PSA complexado ou

cPSA. Parte do PSA permanece na forma livre, mas ainda pode sofrer degradação pelas proteases, constituindo o BPSA ou PSA benigno, assim chamado pois encontra-se aumentado na HBP. O PSA ativo pode também sofrer inativação constituindo o PSA inativo ou iPSA. Então o PSA livre é constituído por várias isoformas: o Pró-PSA, que compreende 33% do PSA livre e aumenta com o câncer, o BPSA, que compõe 28% do PSA livre, e o PSA inativo, que diminui com o câncer (Figura 6). (Balk, Ko et al. 2003; Özen and Sözen 2006; Obort, Ajadi et al. 2013)

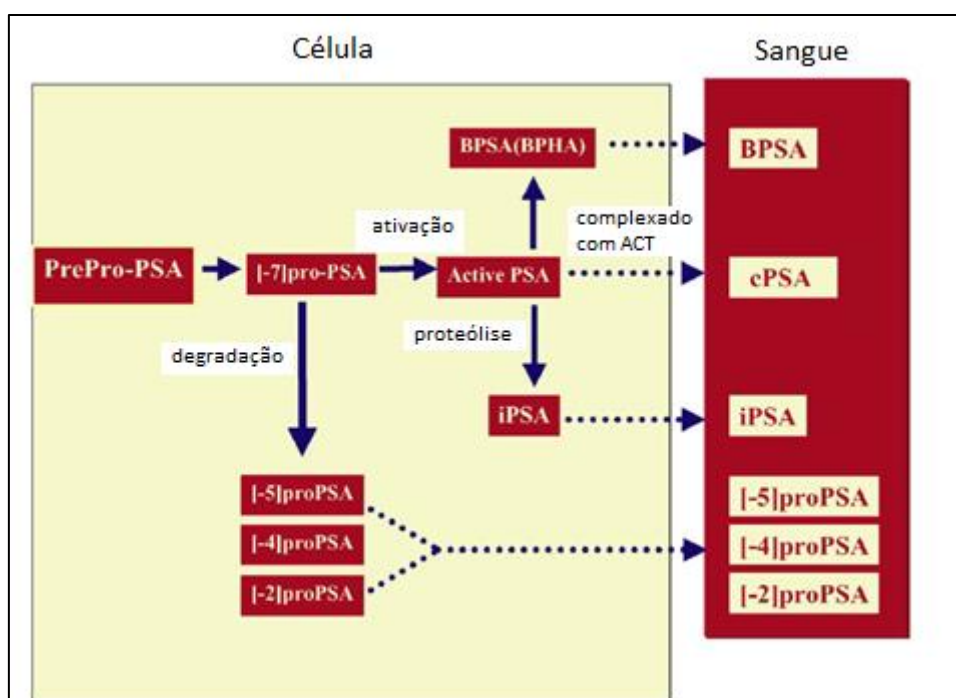


Figura 6: Biossíntese do PSA. PrePro-PSA: sequência líder inativa de 237 aminoácidos; [-7]pró-PSA: proteína inativa gerada da clivagem do PrePro-PSA; [-2], [-4] e [-5] pró-PSA: isoformas geradas à partir da degradação do [-7]pro-PSA; Active PSA: PSA ativo; BPSA(BPHA): PSA benigno; iPSA: PSA inativo; cPSA: PSA complexado. Adaptado de: Özen and Sözen (2006)

### Biópsia Prostática

A necessidade de realização da biópsia prostática deve ser avaliada pelo médico com base nos níveis de PSA e/ou no toque retal. Devem ser consideradas a idade do paciente e as consequências. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, uma única dosagem de PSA não deve ser justificativa para uma biópsia, sendo que a dosagem do PSA deve ser repetida depois de algumas semanas pelo mesmo método e no mesmo laboratório. Condições que elevem o PSA, como ejaculação, infecções, dentre outros, devem ser evitadas ou relatadas antes do exame. (ACS 2012)



A biópsia prostática transretal é atualmente o método padrão ouro para o diagnóstico do CaP. Durante o exame são retirados fragmentos do tecido prostático para realização do exame anatomopatológico. A quantidade de fragmentos retirados varia de 8 a 18, mas a maioria dos médicos retiram 12 fragmentos de diferentes regiões da próstata. Na biópsia guiada por ultrassom uma pequena sonda capta imagens da próstata e é possível medir o seu volume. (ACS 2012)

A biópsia é um processo invasivo podendo acarretar algumas complicações como dor, sangramento retal, hematúria, hematospermia e infecções. (McVary 2010) (Quadro 1). Segundo Loeb *et al.* (2011), a taxa de infecções graves decorrente da biópsia tem aumentado nos últimos anos em consequência da resistência crescente aos antimicrobianos, elevando assim o número de hospitalizações pós-biópsia. (Loeb, Carter et al. 2011)

**Quadro 1: Frequência de complicações pós-biópsia da próstata.**

<b>Complicações</b>	<b>% biópsias</b>
Hematospermia	37,4
Hematúria	14,5
Sangramento retal	2,9
Prostatite / Epididimite	1,7
Febre	0,8
Retenção urinária	0,2
Outras complicações	0,3

**Fonte: Adaptado de McVary (2010).**

A fim de evitar grandes complicações, é exigido um preparo do paciente para a realização do procedimento. É utilizada antibioticoterapia, iniciada dias antes da biópsia, sendo as quinolonas, como o ciprofloxacino, as drogas de escolha. (Aron, Rajeev et al. 2000)

A biópsia não exige analgesia ou anestesia, entretanto, a utilização de analgésico e anestesia intraretal oferece conforto para o paciente e facilidade na execução do procedimento. Também é indicado preparo intestinal com o uso de laxantes no dia

anterior. Pacientes em uso de anticoagulantes devem suspender o uso sete dias antes e sete dias depois da realização do procedimento. (Djavan, Waldert et al. 2001)

As indicações para realização da biópsia segundo as diretrizes para diagnóstico de CaP são: presença de nódulos prostáticos detectados no toque retal, níveis PSA total geralmente acima de 4 ng/mL. Mais recentemente também é indicada em pacientes mais jovens, com idade abaixo dos 55 anos, e que tenham PSA acima de 2,5 ng/mL, e naqueles em que a densidade do PSA é maior que 0,15 ng/mL/cm<sup>3</sup> e a velocidade anual maior que 0,75 ng/uL/ano. O diagnóstico confirmatório é obtido com o laudo histopatológico. (AEU 2013)

A re-biópsia é necessária nos casos de persistência das indicações para o procedimento ou achados histológicos sugestivos de malignidade na biópsia anterior. A re-biópsia tem resultado positivo em aproximadamente 20% dos casos, significando que 80% das biópsias seriam desnecessárias. O recomendado é que a repetição da biópsia ocorra pelo menos seis a oito semanas depois da biópsia anterior. (Marco F. Dall'Oglio 2011; Gittelman, Hertzman et al. 2013)

### **Classificação de Gleason**

O material obtido na biópsia segue para a análise histopatológica onde é classificado em 5 padrões de Gleason de acordo com a arquitetura das glândulas presentes no fragmento analisado. Esse sistema leva em consideração o padrão glandular e sua relação com o estroma prostático. Essa classificação auxilia na determinação do prognóstico e da melhor forma de tratamento. O padrão 1 representa o menos agressivo, com o tecido semelhante ao tecido normal, onde as glândulas são pequenas, bem delimitadas e próximas. O padrão 5 é o de pior prognóstico, onde o tecido já não possui glândulas reconhecíveis (Figura 7). (Gleason 1966; Humphrey 2004)

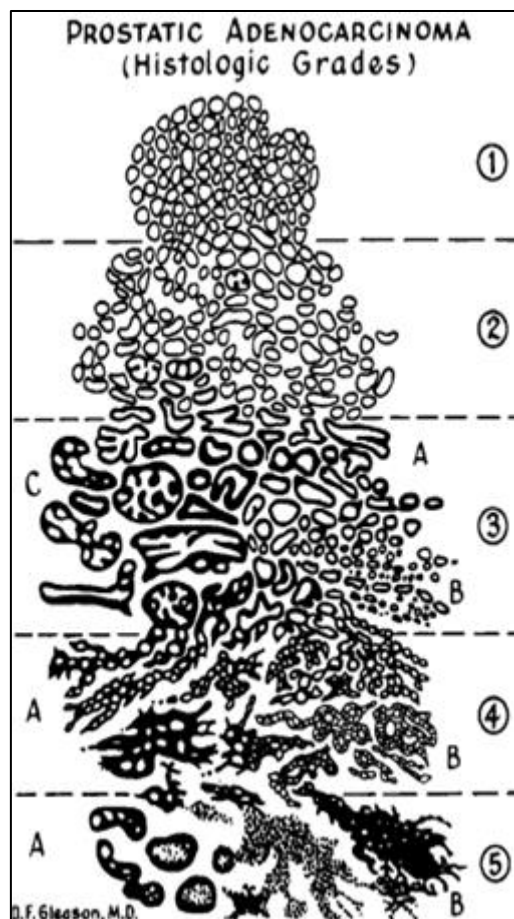


Figura 7: Classificação de Gleason. Fonte: Humphrey (2004)

O resultado da classificação é a soma dos 2 padrões mais frequentes na região tumoral do fragmento analisado. O primeiro representa a maior parte do tumor no fragmento, mais do que 50%, e o segundo representa o segundo padrão mais frequente. A soma dos dois fornece um número que nos diz sobre a chance de metástase em 10 anos afetando a sobrevivência. Uma classificação de Gleason de 2 a 4 representa uma chance de 25% do câncer disseminar, um *score* de 5 a 7 representa 50% de chance, enquanto uma classificação de 8 a 10, 57% de chance. (Gleason 1966; Humphrey 2004)

### Estadiamento

O estadiamento do câncer baseia-se em determinar a extensão da doença, estabelecendo o grau de disseminação. Isto auxilia na determinação do prognóstico e na elaboração de um plano de tratamento individualizado. Tumores com a mesma classificação tendem a apresentar evolução clínica, resposta terapêutica e prognóstico semelhantes.

Diversos sistemas foram propostos para o estadiamento, sendo o Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, o mais utilizado. Este sistema é preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) e baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), o *status* dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente. Além das graduações numéricas, as categorias T e N podem ser subclassificadas em graduações alfabéticas (a, b, c). Ambas expressam a extensão do tumor e do comprometimento dos linfonodos. As categorias T, N e M ainda são agrupadas em estádios que variam de I a IV. (MS/INCA 2013)

Para o CaP, a classificação é válida apenas para os adenocarcinomas e é baseada em exames clínicos e histopatológicos (Quadros 2 e 3, Figura 8). (MS/INCA 2013)

Quadro 2: Sistema TNM de Classificação.

<b>T - Tumor Primário</b>	
<b>TX</b>	O tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Não há evidência de tumor primário
<b>T1</b>	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou visível por meio de exame de imagem
T1a	Achado histológico incidental em 5% ou menos de tecido ressecado
T1b	Achado histológico incidental em mais de 5% de tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (p.ex., devido a PSA elevado)
<b>T2</b>	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor que envolve uma metade de um dos lobos ou menos
T2b	Tumor que envolve mais da metade de um dos lobos, mas não ambos os lobos
T2c	Tumor que envolve ambos os lobos
<b>T3</b>	Tumor que se estende através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (uni- ou bilateral)
T3b	Tumor que invade vesícula(s) seminal(ais)
<b>T4</b>	Tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes, que não as vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores do ânus, ou parede pélvica
<b>N - Linfonodos Regionais</b>	
<b>NX</b>	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástase em linfonodo regional
<b>N1</b>	Metástase em linfonodo regional
<b>M - Metástase à Distância</b>	
<b>MX</b>	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
<b>M0</b>	Ausência de metástase à distância
<b>M1</b>	Metástase à distância
M1a	Linfonodo(s) não regional(ais)
M1b	Osso(s)
M1c	Outra(s) localização(ões)

Fonte: MS/INCA Estimativa de Câncer no Brasil, 2013. (MS/INCA 2013)

Quadro 3: Classificação por estágios.

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Gleason</b>
<b>Estágio I</b>	T1a	N0	M0	2 a 4
<b>Estágio II</b>	T1a	N0	M0	5 a 10
	T1b, T1c	N0	M0	Qualquer (2 a 10)
	T1, T2	N0	M0	Qualquer (2 a 10)
<b>Estágio III</b>	T3	N0	M0	Qualquer (2 a 10)
<b>Estágio IV</b>	T4	N0	M0	Qualquer (2 a 10)
	Qualquer T	N1	M0	Qualquer (2 a 10)
	Qualquer T	Qualquer N	M1	Qualquer (2 a 10)

Fonte: MS/INCA Estimativa de Câncer no Brasil, 2013. (MS/INCA 2013)

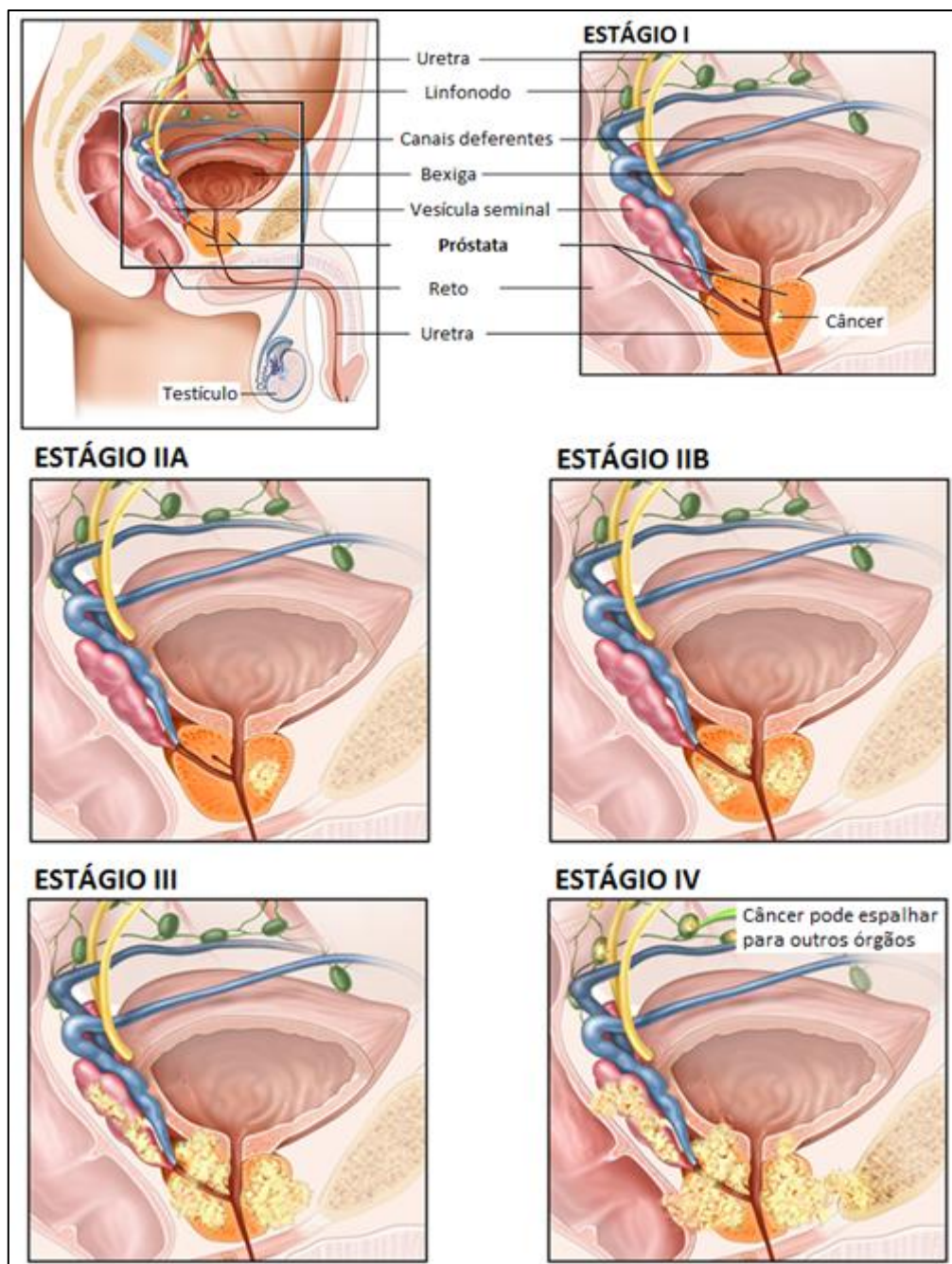


Figura 8: Progressão do câncer de próstata de acordo com os estágios. Adaptado de: Cancer library – The University of Chicago Medicine. (2013)

### 2.2.3.3 MARCADORES MOLECULARES

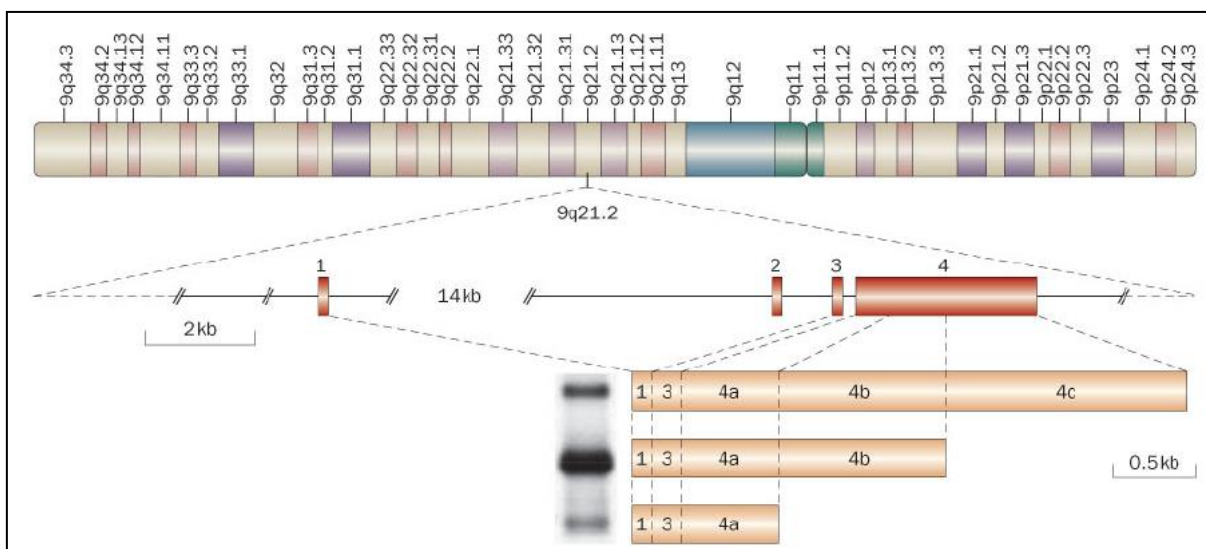
A utilização de marcadores moleculares é uma nova proposta no diagnóstico do CaP. Além de serem mais específicos, possibilitam diagnóstico precoce e menos invasivo. As novas tecnologias possibilitam a detecção de alterações genéticas no tecido da próstata, sangue, urina e fluidos corporais e inclui o estudo de genes que apresentam níveis de expressão mais elevados na presença de tumor na próstata e baixos níveis de

expressão em alterações benignas. Alterações epigenéticas que podem alterar a transcrição de genes supressores tumorais também têm sido estudadas, além de fusões gênicas e estudo de proteínas, como antígenos associados ao tumor. (Shappell 2008)

### **PCA3**

Um grande número de marcadores para o diagnóstico do CaP têm sido estudados, mas um deles, a expressão do gene 3 do Câncer de Próstata (*PCA3*), tem apresentado um grande valor diagnóstico. (Hessels and Schalken 2009)

O gene *PCA3* está presente no braço longo do cromossomo 9 (23 Kb) e é constituído por 4 éxons (9q21.2) (Figura 9). A caracterização molecular do gene revelou que ocorre processamento alternativo do mRNA, resultando na perda do éxon 2 em 95% dos transcritos. Também ocorre poliadenilação alternativa no éxon 4, gerando transcritos de três tamanhos diferentes. O transcrito mais frequente, encontrado em 60% dos cDNAs analisados, contém os éxons 1, 3, 4a e 4b. Estudos complementares revelaram que o mRNA contém um grande número de códons de terminação e três janelas de leitura, sugerindo que o gene não codifica proteínas. (Hessels and Schalken 2009)



**Figura 9: Esquema da unidade de transcrição do gene *PCA3*. Adaptado de: Hessels and Schalken (2009)**

Em 1999, o gene *PCA3* ou *DD3*, foi identificado pela primeira vez em um estudo que demonstrou altos níveis de expressão no tecido tumoral da próstata comparado com o tecido normal adjacente do mesmo paciente. A superexpressão do gene *PCA3* foi



observada em 95% das amostras de CaP e não foi detectada expressão do gene em nenhum outro tecido tumoral ou normal de vários órgãos, nem mesmo em leucócitos, presente nos fluidos corporais. Em tecidos não tumorais ou na presença de alterações benignas da próstata, foram detectados níveis muito baixos de expressão deste gene. Desta forma, a forte associação entre a superexpressão do gene *PCA3* e as alterações malignas na próstata têm atribuído ao gene um importante papel como marcador no diagnóstico do CaP. (Bussemakers, van Bokhoven et al. 1999)

Em 2003, pesquisadores demonstraram que é possível detectar a expressão do gene na primeira urina após massagem prostática quando há apenas 10% de células tumorais em meio às células prostáticas normais, através de uma RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa) quantitativa. (Hessels, Klein Gunnewiek et al. 2003)

Em alguns estudos, a expressão do gene *PSA* em urina após toque retal é detectada em conjunto ao *PCA3*, para normalizar a expressão do gene *PCA3* em relação à quantidade de células prostáticas presentes na amostra, já que o *PSA* é um antígeno específico do tecido prostático. Outros estudos mostram que a análise em conjunto da expressão dos dois genes constitui um melhor método diagnóstico do que a análise apenas do *PCA3*. (Neves, Araujo et al. 2008; Jamaspishvili, Kral et al. 2011)

### **Outros Marcadores**

Outras variantes de baixa penetrância têm demonstrado associação com o desenvolvimento do CaP, identificadas através de estudos GWAS (Genome-wide association studies). A identificação desses marcadores pode auxiliar na identificação do risco e na decisão médica do melhor tratamento. (Choudhury, Eeles et al. 2012; Goh, Schumacher et al. 2012; Eeles, Olama et al. 2013)

Dhir *et al.* (2004) verificaram que a expressão das proteínas da matriz nuclear EPCA e EPCA-2 foi mais elevada no tecido tumoral da próstata em comparação ao tecido normal de pacientes inicialmente com biópsias negativas que foram posteriormente diagnosticados com CaP. A matriz nuclear é responsável pela manutenção da forma nuclear, função e organização dos seus componentes. Alterações nas proteínas da matriz nuclear têm sido associadas com a carcinogênese de muitos tipos de câncer. O

teste apresentou altos níveis de sensibilidade e especificidade e foi capaz de identificar indivíduos com CaP precocemente, em um período de cinco anos, antes dos pacientes receberem o diagnóstico de câncer prostático. (Dhir, Vietmeier et al. 2004)

O gene de fusão *TMPRSS2:ERG* é frequente no CaP, representando cerca de 90% das fusões gênicas neste tipo de câncer. Sua maior expressão no tecido prostático ativa uma cascata enzimática que afeta a proliferação e/ou a apoptose celular. Ainda não existe um teste diagnóstico disponível, mas estudos mostram que o *TMPRSS2:ERG* tem especificidade superior a 90% para detecção do CaP, sendo um marcador promissor para diagnóstico. (Hessels, Smit et al. 2007; King, Xu et al. 2009) No entanto, a presença dessa fusão gênica em pacientes com bom prognóstico e nenhuma associação com o câncer é o que impede que este marcador se torne um exame para diagnóstico. Pesquisadores propõem também o estudo concomitante da expressão do *PCA3* e do *TMPRSS2-ERG* em urina para detecção e avaliação de agressividade do CaP. A associação dos dois marcadores pode ser útil para avaliar a necessidade de biópsia após a detecção de níveis elevados de PSA. Além disso, homens com biópsias negativas, mas com altos níveis de *TMPRSS2:ERG* e *PCA3*, deveriam manter um acompanhamento rigoroso, pois as chances de desenvolvimento de CaP são altas. (Tomlins, Aubin et al. 2011)

Um estudo conduzido por Velonas *et al.* (2013) propôs uma análise por *microarray* e verificação por qRT-PCR (RT-PCR quantitativa) e obteve um painel de sete genes que poderiam distinguir entre o CaP agressivo e pacientes saudáveis com alta sensibilidade e especificidade (83 % e 80%, respectivamente), utilizando amostras de sangue. Os genes identificados *CTAM*, *CXCR3 (CD183)*, *FCRL3*, *KIAA1143*, *KLF12*, *TMEM204* e *SAMSN1* estão envolvidos na regulação da resposta imune na carcinogênese. (Velonas, Woo et al. 2013)

Outra novidade entre os marcadores para o câncer de próstata é a análise de microRNAs (miRNAs), que são pequenos RNAs não codificantes (aproximadamente 22pb), que regulam a expressão de mais de 60% dos genes codificantes. (Bartel 2009; Catto, Alcaraz et al. 2011)

Alguns miRNAs são super expressos nos tumores, inclusive no da próstata, e atuam como reguladores oncogênicos levando ao crescimento do tumor e silenciamento de genes supressores tumorais. (Meng, Henson et al. 2007)

Um estudo de Haj-Ahmad *et al.* (2014) investigou o uso dos miRNAs presentes na urina para diferenciar o câncer da HBP nodular prostática. Encontrou-se uma alta sensibilidade e especificidade dos miRNAs 1825 e 484 para diagnóstico diferencial do CaP e HBP, identificando-os como possíveis marcadores. (Haj-Ahmad, Abdalla et al. 2014)

Devido à heterogeneidade do CaP, os estudos ainda não conseguiram apontar para um marcador comprovadamente capaz de detectar o CaP de maneira rápida, eficiente e específica. Desta forma, vários marcadores estão ainda sendo estudados em busca daquele que apresente melhor especificidade e sensibilidade. (Velonas, Woo et al. 2013)

#### **2.2.3.4 TRATAMENTO**

O tratamento para o CaP varia de acordo com o estágio da doença. Os tratamentos de escolha geralmente incluem a radioterapia, prostatectomia, terapia hormonal ou quimioterapia. Para o tumor localizado, a radioterapia ou a prostatectomia são as opções mais comuns. Também se utiliza a observação vigilante em algumas situações especiais (Figura 10). (Tonon 2009; Medicine 2013)

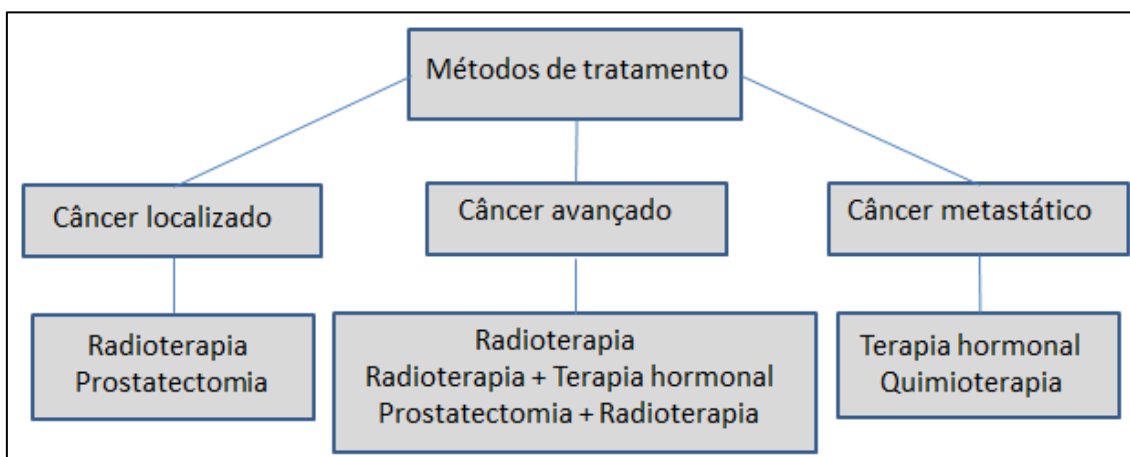
Na radioterapia é utilizada radiação externa invasiva com capacidade para atingir células tumorais na extremidade da glândula, o que pode danificar outros órgãos e ocasionar reações adversas no paciente durante o tratamento, como cansaço físico. Já a radiação interna, também chamada de braquiterapia, consiste na aplicação de sementes radioativas de iodo ou ouro dentro do órgão, sendo assim uma radiação mais concentrada, constante e, por isso, mais eficiente. (Tonon 2009)

A prostatectomia radical é outro tipo de tratamento eficaz e curativo, oferecendo maior sobrevida ao paciente quando comparada à radioterapia. Esta técnica cirúrgica consiste na retirada de toda a glândula incluindo o tumor e as vesículas seminais, unindo-se a bexiga à uretra. O procedimento é agressivo e também pode acarretar

complicações como incontinência urinária e impotência sexual. (Tonon 2009; Srougi 2013)

A observação vigilante consiste em simplesmente monitorar o crescimento do câncer através de exames como o PSA, toque retal e biópsia. Este pode ser o caso quando o câncer é diagnosticado em um estágio muito precoce ou quando não se espera que o tumor progrida rapidamente, já que o CaP é considerado um tumor de crescimento lento e pode ser monitorado cuidadosamente considerando as condições clínicas do paciente. Muitos pacientes idosos ou com outras doenças associadas não necessitam de um tratamento agressivo, o que aumenta a expectativa de vida. (Medicine 2013)

Para a doença avançada, recorre-se à radioterapia ou prostatectomia em combinação com tratamento hormonal. Para a doença metastática, o tratamento de eleição é a terapia hormonal ou castração. São utilizados hormônios que impedem a produção de testosterona ou bloqueiam sua ação na próstata, como os estrógenos, análogos da LHRH e antiandrogêneos. Os análogos da LHRH atuam na hipófise e impedem a formação de testosterona nos testículos. Já os antiandrogêneos bloqueiam os receptores da testosterona ao nível da próstata. Sabe-se que a testosterona estimula a proliferação das células prostáticas, ao passo que a redução dos seus níveis inibe o metabolismo e a divisão das mesmas. O tratamento quimioterápico com uma ou mais drogas também é utilizado no câncer metastático para regredir o tumor, mas sua eficácia ainda é discutida. (Tonon 2009)



**Figura 10:** Esquema dos métodos de tratamento mais utilizados para o câncer de próstata.

**3. OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos genes *PCA3* e *PSA* em amostras de urina como marcadores no diagnóstico diferencial do CaP e HBP.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Padronizar um método de quantificação do mRNA dos genes *PCA3* e *PSA*.
- 2) Avaliar a expressão dos genes *PCA3* e *PSA* em urina de homens com CaP ou HBPa e compará-la a um grupo de indivíduos hígidos.
- 3) Relacionar os resultados obtidos em cada grupo com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes:
  - Idade
  - Histórico Familiar
  - Tabagismo
  - Níveis de PSA Total sérico
  - O score de Gleason
- 4) Avaliar a sensibilidade e especificidade como critérios de validação da quantificação da expressão dos genes *PCA3* e *PSA* como marcadores para o diagnóstico do CaP, comparando ao método padrão-ouro de biópsia prostática.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 POPULAÇÃO**

Participaram do estudo 59 homens encaminhados ao setor de Radiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) para realização de biópsia prostática. Foram acessados os prontuários médicos dos pacientes e todos foram convidados a participar do projeto cuja anuência foi registrada no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1) e foram orientados quanto ao procedimento de coleta. Outras informações/ dados clínicos foram obtidos em entrevista com os pacientes e registrados na Ficha Clínica (Apêndice 2). Foram coletadas amostras de conveniência e não foi estabelecido nenhum critério de exclusão. O período de coleta foi de fevereiro de 2013 a fevereiro de 2014.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) com parecer de número 156.531, e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC (DEPE-HC/UFMG) (Anexos 1 e 2).

Foi coletada uma amostra do primeiro jato da primeira urina (aproximadamente 30 mL) imediatamente após massagem prostática realizada pelo médico antes da biópsia. Os dados coletados foram: idade, história clínica, história familiar de CaP e de outros tipos de câncer, uso de medicamentos, tabagismo, alterações urinárias, PSA sérico e outras informações relevantes. Para determinação do histórico familiar de câncer, consideraram-se parentes consanguíneos de 1º a 3º grau com diagnóstico de qualquer tipo de câncer. O histórico familiar de CaP também levou em consideração parentes até o 3º grau de consanguinidade. Quanto ao uso de medicamentos, foi investigada a utilização de inibidores da 5-alfa redutase (finasterida), pela conhecida interferência que podem causar nos testes laboratoriais realizados. Em relação ao hábito de fumar, considerou-se tabagista indivíduos com hábito regular de fumar qualquer quantidade de cigarro por um período maior que 6 meses nos últimos cinco anos. As informações não acessadas nos prontuários foram obtidas por relatos dos pacientes.

#### **4.2 MASSAGEM PROSTÁTICA**

O exame do toque retal realizado pelo médico durante a consulta clínica libera as células epiteliais da próstata através do ducto prostático para o trato urinário. O



médico aplica uma pressão na próstata da base em direção ao ápice, três vezes em cada lobo (esquerdo e direito) (Figura 11). É de extrema importância a execução desse procedimento para possibilitar a detecção das células epiteliais prostáticas na urina, permitindo a quantificação dos genes de interesse.

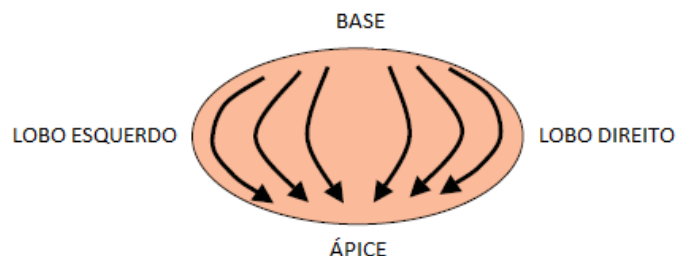


Figura 11: Instruções para a execução da massagem prostática. Adaptado de: GEN-PROBE® (2010)

### 4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas foram imediatamente armazenadas em gelo por no máximo 30 minutos até que se realizasse a centrifugação, que foi executada a 1000 g por 10 minutos a 4°C. Ao sedimento obtido foi adicionado 1mL de RNA later® e armazenado em geladeira entre 2 e 8°C por no máximo 24 horas, até a extração do mRNA.

#### 4.3.1 EXTRAÇÃO DO RNA

Antes da extração, a amostra foi lavada com PBS (tampão fosfato salino) para retirada do conservante e centrifugada a 5000 g durante 10 minutos sob refrigeração.

Ao *pellet* adicionou-se 1 mL de Trizol® e homogeneizou-se a amostra a fim de lisar as células. A amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos para completa dissociação dos complexos de nucleoproteína. Adicionou-se 200 uL de clorofórmio para separar a fase aquosa contendo o RNA da fase oleosa, após centrifugação a 21.000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior contendo o RNA foi transferida para um novo tubo onde adicionou-se 600uL de isopropanol 100% gelado para precipitar o RNA. A amostra permaneceu à temperatura ambiente por 10 minutos. Após nova centrifugação a 21.000 g por 20 minutos e secagem do *pellet*, realizou-se uma lavagem com etanol 75% gelado e centrifugou-se a amostra a 21.000 g por 5 minutos. O *pellet* seco foi eluído em 20 uL de água livre de RNase (QIAGEN) e hidratado em banho seco à 60°C por 10 minutos.

Em seguida, realizou-se a quantificação das amostras em equipamento espectrofotômetro NanoDrop®. Este aparelho baseia-se na intensidade de luz absorvida pela amostra em 260 nm, comprimento de onda no qual os ácidos nucleicos absorvem luz, para determinar a concentração de RNA na amostra. Obtêm-se também as absorvâncias a 280 e 230nm, comprimentos de onda no qual proteína e outros interferentes absorvem luz. Dessa forma calcula-se as razões 260/280 e 260/230 para avaliar a qualidade da amostra de RNA, cujos valores devem estar próximos de 1,8.

Após a quantificação, prosseguiu-se ao tratamento com a enzima DNase para eliminar o DNA genômico presente na amostra que poderia interferir na quantificação dos genes de interesse.

#### **4.3.2 TRATAMENTO COM DNASE**

Foram adicionados a 1.000 ng de RNA: 2µL de DNase Buffer 10x, 1,36µL de DNase I (QIAGEN) e completou-se o volume com água livre de RNase (QIAGEN) para 20 uL. A digestão foi realizada a 37°C por 30 minutos seguida por inativação da enzima a 65°C durante 5 minutos.

#### **4.3.3 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DOS GENES *PCA3* E *PSA***

Determinou-se a expressão dos genes *PCA3*, *PSA* e  $\beta$ -actina (*ACTB*) através da quantificação absoluta por PCR em Tempo Real de única etapa (Applied Biosystems 7500 Fast), onde é realizada a transcrição reversa e quantificação dos transcritos na mesma reação. Utilizou-se o kit *SuperScript® III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen) e sondas de hidrólise *TaqMan®* (Applied Biosystems).

A curva padrão foi construída com quantidades conhecidas de DNA diluídos. Construiu-se curvas padrão para os três genes alvo. Para o *PSA* e *PCA3*, utilizou-se fragmentos sintetizados de DNA (gBlocks™ Gene Fragments-Integrated DNA Technologies), que foram diluídos em 5 pontos de  $10^6$  a  $10^2$  vezes e  $10^7$  a  $10^3$  vezes, respectivamente, buscando manter concentrações semelhantes àsquelas encontradas nas amostras biológicas (Quadro 4). Para normalizar o número de cópias dos genes *PSA* e *PCA3*, utilizou-se o gene referência *ACTB* como controle endógeno, uma vez que seus níveis de expressão não são afetados pelas variáveis estudadas. O controle endógeno corrige

distorções provenientes de diferentes quantidades de ácido nucléico nas amostras. Para a construção da curva padrão para o *ACTB* utilizou-se DNA genômico purificado, partindo do cálculo de que 1 ng de DNA genômico contém aproximadamente 150 células e então 300 cópias de qualquer gene. (Albert Leyva 1974) Dessa forma, diluiu-se a amostra para dosagem de *ACTB* também em cinco pontos, de  $10^5$  a  $10^1$  vezes.

**Quadro 4: Sequências do padrão sintetizado para construção das curvas padrão do *PSA* e *PCA3*.**

Nome do Gene	Sequência sintetizada
<b>PSA (206pb)</b>	5'-ATGTGGGTCCCGTTGTCTTCCTCACCCCTGTCCGTGACGTGGATTGGTGCTGC ACCCCTCATCCTGTCTCGGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGCGAGAAGCATTCCCAACCCTG GCAGGTGCTTGTGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCACCCCC AGTGGTCCCTCACAGCTGCCACTGCATCAGGAA-3'
<b>PCA3 (500pb)</b>	5'-GTGAGAAATAAGAAAGGCTGCTGACTTTACCATCTGAGGCCACACATCTGCTG AAATGGAGATAATTAACATCACTAGAAACAGCAAGATGACAATATAATGTCTAAGTAGTGAC ATGTTTTTGCACATTTCCAGCCCCTTTAAATATCCACACACACAGGAAGCAGAAAAGGAAGC ACAGAGATCCCTGGGAGAAATGCCCGGCCGCCATCTTGGGTCATCGATGAGCCTCGCCCT GTGCCTGGTCCCGCTTGTGAGGGAAGGACATTAGAAAATGAATTGATGTGTTCCCTAAAGG ATGGGCAGGAAAACAGATCCTGTTGTGGATATTTATTTGAACGGGATTACAGATTTGAAATG AAGTCACAAAGTGAGCATTACCAATGAGAGGAAAACAGACGAGAAAATCTTGATGGCTTCA CAAGACATGCAACAAACAAAATGGAATACTGTGATGACATGAGGCAGCCAAGCTGGGGAG GAGATAACCACGGGGCAGA-3'

Cada ponto da curva padrão foi analisado em triplicata para cada gene separadamente, enquanto as reações para as amostras biológicas foram realizadas em multiplex para cada gene de interesse mais o controle endógeno, em duplicata. A reação de quantificação foi feita conforme descrito nos Quadros 5, 6 e 8.

Quadro 5: Reagentes utilizados no preparo da reação para as amostras.

Reagentes (concentração)	Volume Reação PSA/ACTB (uL)	Volume Reação PCA3/ACTB (uL)
Tampão <i>Reaction Mix</i> (2X)	25	25
Enzima SuperScriptR III RT/Platinum® Taq Mix	1	1
ROX (25uM)	0,2	0,2
Ensaio TaqMan PSA (1X)	1,25	-
Ensaio TaqMan PCA3 (1X)	-	1,25
Ensaio TaqMan ACTB (1X)	1,25	1,25
RNA tratado (~50ng/uL)	10	10
Água (qsp 50uL)	11,3	11,3

Quadro 6: Reagentes utilizados no preparo da reação para as curvas padrão.

Reagentes (concentração)	Volume Curva PSA (uL)	Volume Curva PCA3 (uL)	Volume Curva ACTB (uL)
Tampão <i>Reaction Mix</i> (2X)	25	25	25
Enzima SuperScriptR III RT/Platinum® Taq Mix	1	1	1
ROX (25uM)	0,2	0,2	0,2
Ensaio TaqMan PSA (1X)	1,25	-	-
Ensaio TaqMan PCA3 (1X)	-	1,25	-
Ensaio TaqMan ACTB (1X)	-	-	1,25
DNA diluído	10	10	10
Água (qsp 50uL)	12,55	12,55	12,55

O kit contém o corante de referência passiva ROX™ que auxilia o software a normalizar os sinais do fluoróforo *reporter* para compensar pequenas variações no sinal, aumentando a precisão dos resultados.

**Quadro 7: Identificação das sondas utilizadas.**

<b>Nome do Gene</b>	<b>Sigla</b>	<b>Assay ID</b>
Kallicreína Humana 3	KLK3 (PSA)	Hs02576345_m1
Gene 3 do Câncer de Próstata	PCA3	Hs01371939_g1
$\beta$ -ACTINA	ACTB	Hs01060665_g1

**Quadro 8: Condições da reação de PCR.**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Transcrição Reversa	50°C	30 minutos
Desnaturação	95°C	10 minutos
Anelamento/ Extensão (60 ciclos)	95°C	15 segundos
	60°C	1 minuto

Foram realizados testes para avaliar a eficiência do tratamento com DNase e ausência de DNA genômico nas amostras, o que poderia superestimar a quantificação dos transcritos. Para isso realizou-se as mesmas reações de PCR para os três genes em estudo, mas trocou-se a enzima SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix pela enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e comprovou-se a ausência de contaminação com DNA genômico nas amostras.

A Figura 12 esquematiza resumidamente todas as etapas dos procedimentos laboratoriais.

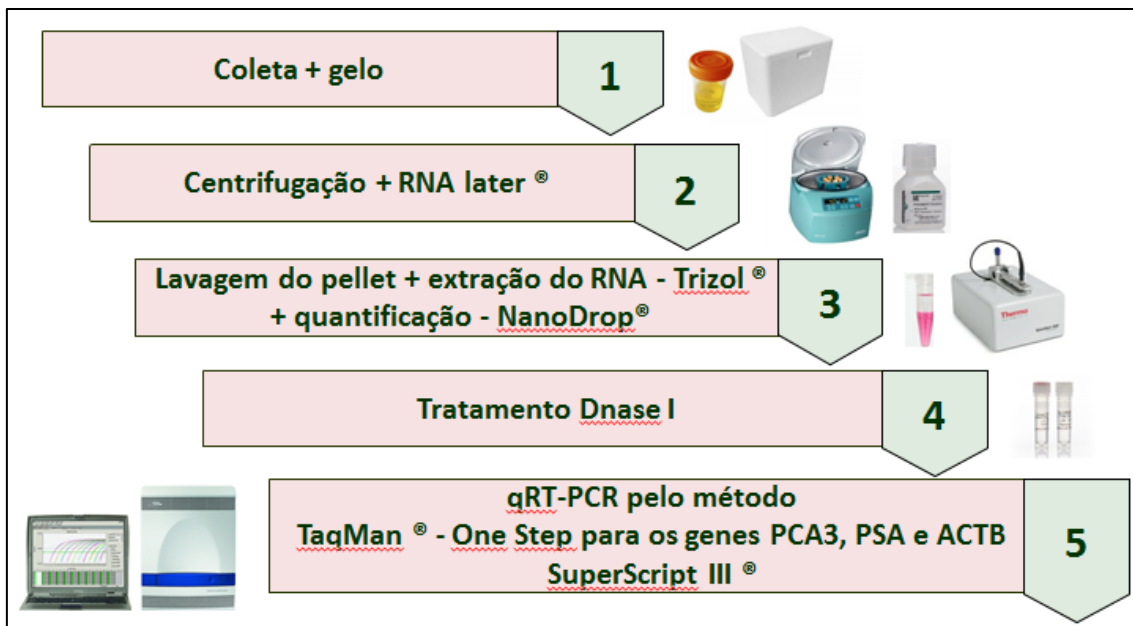


Figura 12: Procedimentos laboratoriais.

#### 4.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 13.0. Para avaliação de normalidade dos dados, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas não paramétricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil. As variáveis paramétricas foram apresentadas como média  $\pm$  desvio padrão. Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann Whitney para comparação de mediana entre três e dois grupos, respectivamente, para as variáveis não-paramétricas. Para as variáveis paramétricas, a média entre os três e os dois grupos foram comparadas pelo teste de ANOVA seguido pelo teste *post hoc* LSD ou T-Student, respectivamente. Para comparação das frequências das variáveis categóricas, utilizou-se o teste de qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher. Para as diferenças significativas pelo qui-quadrado entre 3 grupos, realizou-se o teste de resíduos considerando menos frequente o resíduo menor que -1,96 e mais frequente o resíduo maior que 1,96. Para avaliar a correlação entre as variáveis, foi utilizado o teste de Spearman. A curva de Características de Operação do Receptor (Curva ROC) foi traçada para avaliar a sensibilidade e a especificidade das variáveis contínuas no diagnóstico das anormalidades da próstata. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

**5. RESULTADOS**

## 5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS GRUPOS

Participaram do estudo pacientes com CaP do tipo adenocarcinoma (n=22), pacientes com HBP (n=26) e indivíduos sem nenhuma das patologias (n=11) servindo como grupo controle. O diagnóstico foi determinado baseado nos dados clínicos e no laudo histopatológico fornecido após a biópsia e depois da realização dos testes, constituindo um ensaio triplo-cego.

Na Tabela 1 é apresentada a caracterização dos grupos quanto aos dados demográficos e quanto aos fatores de risco como tabagismo, histórico familiar de câncer (qualquer tipo) e histórico familiar de CaP, além do uso de inibidores da 5-alfa redutase. Este último critério foi incluído pelo fato de que pode ser uma variável de interferência nas análises moleculares.

Tabela 1: Características clínicas e demográficas entre os grupos estudados.

Variável	CaP (n=22)	HBP (n=26)	Controle (n=11)	p
Idade	64,87±7,34	66,60±7,84	66,00±6,53	0,720
Tabagismo (sim)	9 (39,1%)	11 (44,0%)	4 (36,4%)	0,895
Histórico				
Familiar de câncer (sim)	11 (47,8%)	13 (52%)	4 (36,4%)	0,687
Histórico				
familiar de CaP (sim)	9 (39,1%)	6 (24,0%)	0 (0%) <sup>a</sup>	0,048*
Uso de				
inibidores da 5- alfa redutase (sim)	2 (8,7%)	2 (8,0%)	0 (0%)	0,609

Idade: média±desvio padrão, teste ANOVA. Outras variáveis: número absoluto (frequência), teste qui-quadrado de Pearson. (a) menos frequente pelo teste de resíduo. \*Significante.



Os grupos apresentaram homogeneidade quanto à idade e tabagismo ( $p > 0,05$ ). Em relação ao histórico familiar de qualquer tipo de câncer, não observou-se diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). No entanto, observou-se uma menor frequência de indivíduos com o histórico familiar de CaP no grupo controle quando comparado aos demais grupos ( $p = 0,048$ ).

## **5.2 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PCA3* E *PSA*, E DOS NÍVEIS DO *PSA* SÉRICO TOTAL ENTRE OS GRUPOS**

A quantificação da expressão dos genes *PCA3* e *PSA* normalizada pelo controle endógeno e a relação *PCA3/PSA* foram comparadas entre os grupos. Foram obtidos no prontuário médico os valores de *PSA* sério total (Tabela 2).

No grupo CaP, seis pacientes não apresentaram valores detectáveis de expressão para os genes *PCA3* e *PSA*. Já no grupo HBP, apenas quatro pacientes apresentaram quantificação para o gene *PCA3*, enquanto a expressão de *PSA* foi possível ser quantificada em sete indivíduos deste grupo. Desta forma, os valores médios da relação *PCA3/PSA* serão apresentados apenas para os pacientes em cada grupo que apresentaram níveis quantificáveis para ambos os genes. Nenhum indivíduo do grupo controle apresentou valores mensuráveis de expressão do *PCA3* e apenas um apresentou valores de expressão do gene *PSA* (0,11), não sendo possível calcular a média para este grupo.

Tabela 2: Número de cópias dos genes *PCA3* e *PSA* normalizados e níveis séricos de *PSA* total entre os grupos estudados.

Parâmetro	CaP (n=22) <sup>b</sup>	HBP (n=26) <sup>c</sup>	Controle (n=11)	p
PCA3	0,74±1,48	0,31±0,46	-	0,587
PSA	0,36±0,40	0,20±0,25	-	0,215
PCA3/ PSA	6,08±9,19	2,90±3,02	-	0,535
PSA total <sup>a</sup>	7,620 (4,64)	6,800 (7,98)	4,735 (5,87)	0,065

Média±desvio padrão, teste T-Student; (a) Mediana e intervalo interquartilico, Kruskal-Wallis; (b) n=16 para *PCA3*, *PSA* e *PCA3/PSA*, (c) n=4 para *PCA3* e *PCA3/PSA*, n=7 para *PSA*.

Não foi observada diferença significativa no número de cópias dos genes *PCA3*, *PSA* e da relação *PCA3/PSA* quando comparados os grupos de pacientes com CaP e HBP, embora esta última razão tenha apresentado maiores valores no grupo com CaP (todos  $p > 0,05$ ). Em relação aos níveis de *PSA* sérico total, também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos, embora tenha-se observado uma tendência a maiores valores no grupo CaP, seguido do grupo HBP e controle ( $p = 0,065$ ).

As figuras 13 a 16 permitem visualizar a dispersão dos dados. É importante ressaltar que em função da grande variabilidade dos mesmos, todas as análises foram conduzidas novamente com a exclusão dos *outliers*, mas não houve modificação na significância dos resultados já obtidos. Desta forma, optou-se por manter todos os dados nos gráficos.

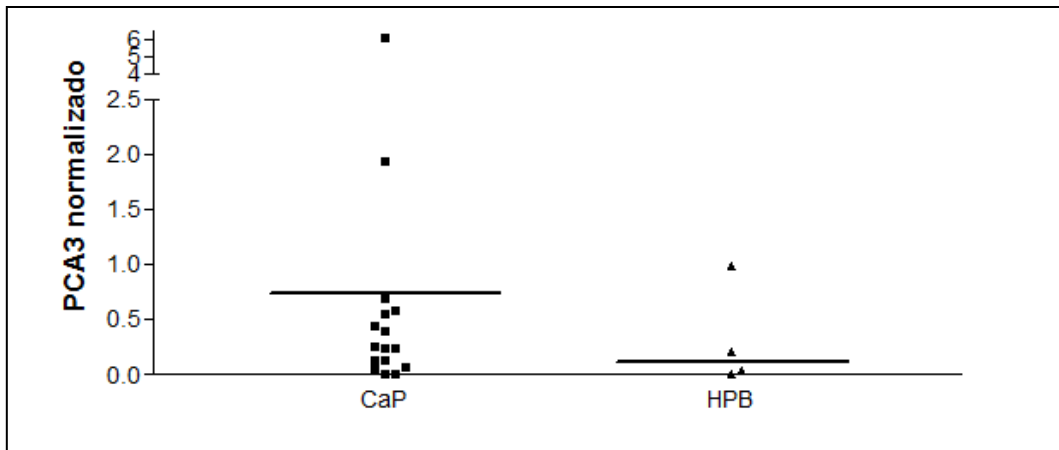


Figura 13: Número de cópias do gene *PCA3* normalizado entre os grupos CaP e HBP.

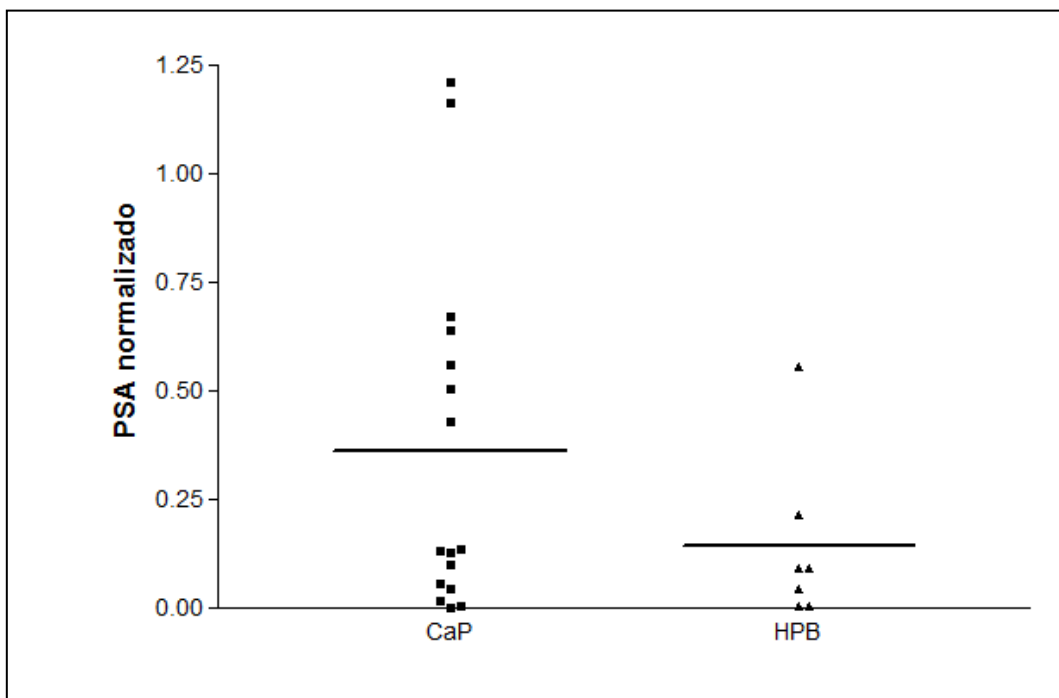


Figura 14: Número de cópias do gene *PSA* normalizado entre os grupos CaP e HBP.

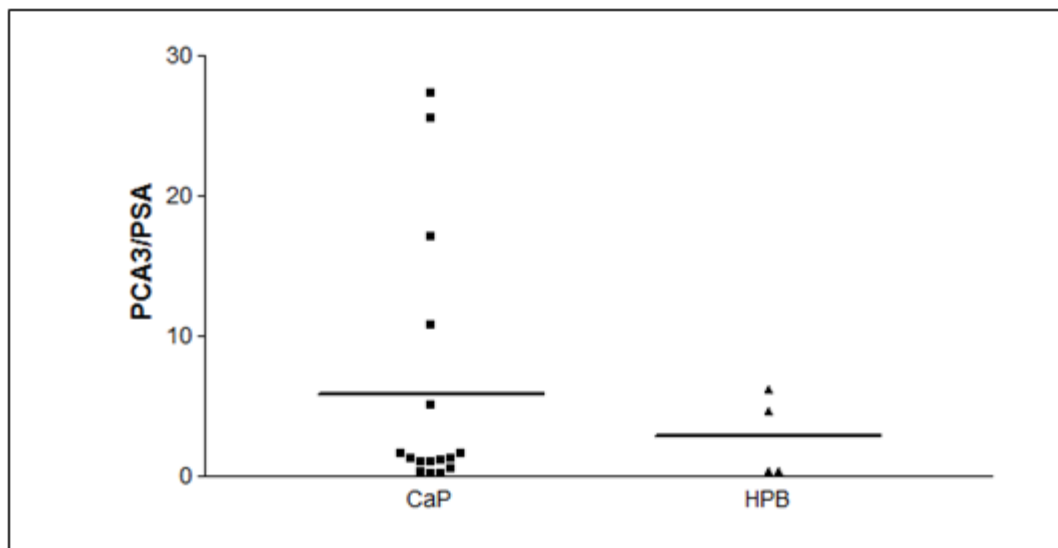


Figura 15: Relação PCA3/PSA (número de cópias) entre os grupos de CaP e HPB.

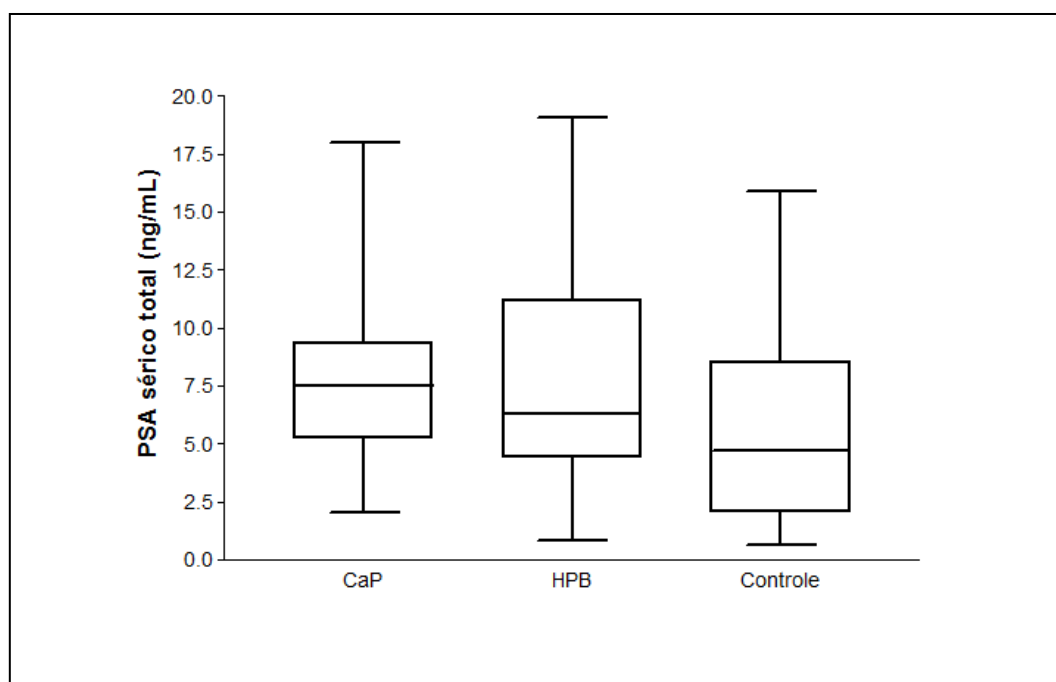


Figura 16: Níveis de PSA sérico total entre os grupos de CaP, HBP e controle.

As variáveis número de cópias do *PCA3* e *PSA* foram categorizadas como presença (nível de expressão quantificável) ou ausência (nível de expressão não quantificável). A partir de então, foi calculada a frequência com que estes marcadores foram detectados em cada um dos grupos estudados (Tabela 3). Além disso, classificou-se os indivíduos de acordo com o valor de PSA sérico total categorizado, separando-se aqueles com  $PSA < 4$  daqueles com  $PSA \geq 4$  ng/mL.

Tabela 3: Frequência das variáveis *PCA3*, *PSA* (expressão) e *PSA* sérico total categorizadas nos grupos estudados.

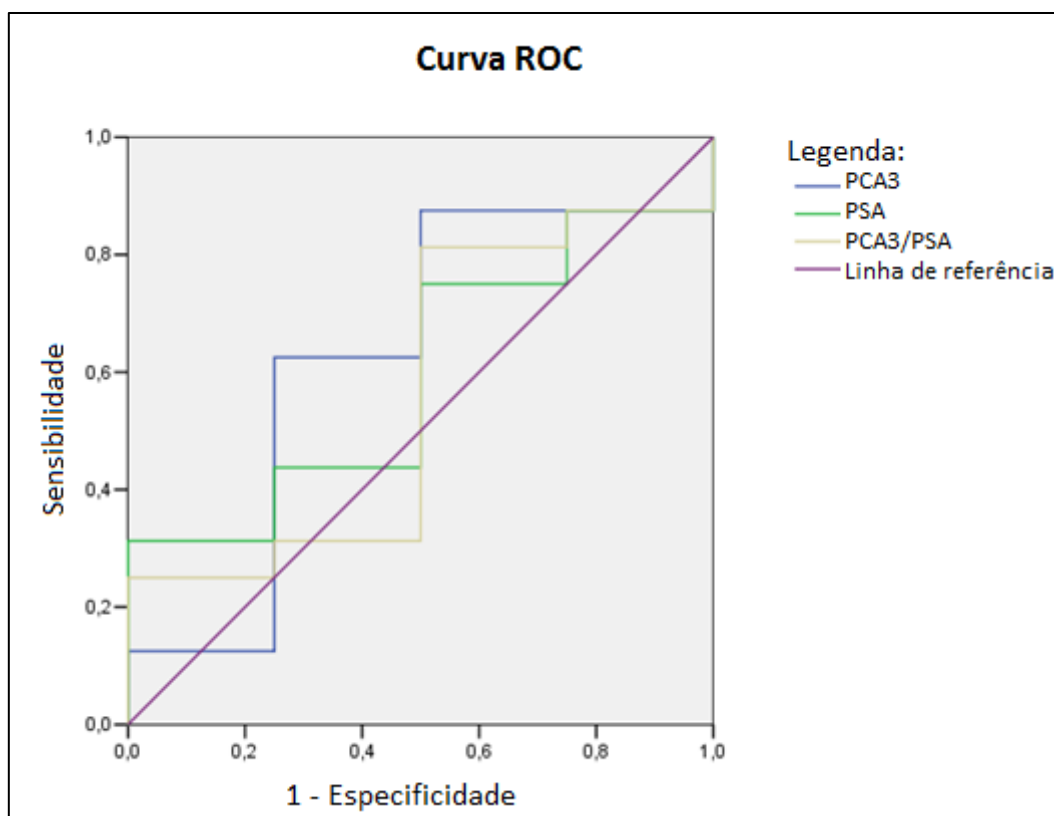
Presença	CaP (n=22)	HBP (n=26)	Controle (n=11)	p
<i>PCA3</i>	16 (72,7%)	4 (15,4%)	0	<0,001*
<i>PSA</i>	16 (72,7%) <sup>b</sup>	7 (26,9%)	1 (9,1%) <sup>a</sup>	<0,001*
<i>PSA</i> ≥ 4 ng/mL	20 (90,9%)	23 (88,5%)	6 (54,5%) <sup>a</sup>	0,020*

(a) Menos frequente pelo teste de resíduo; (b) Mais frequente pelo teste de resíduo. \*Significante.

Observa-se que os pacientes do grupo CaP apresentaram uma maior frequência de expressão de *PCA3* detectável quando comparado ao grupo HBP. Com relação à quantificação da expressão de *PSA*, o grupo CaP mostrou maior frequência de valores detectáveis deste marcador quando comparado aos grupos HBP e controle, enquanto o HBP também mostrou maior frequência quando comparada ao controle. Uma maior frequência de indivíduos com valores de *PSA* sérico total ≥ 4 ng/mL também foi observada nos grupos CaP e HBP quando comparado aos controles.

### 5.3 VALIDADE DOS MARCADORES COMO TESTES DE DIAGNÓSTICO

A avaliação de sensibilidade e especificidade do nível de expressão dos genes *PCA3*, *PSA* e da relação *PCA3/PSA* como exames para o diagnóstico diferencial entre CaP e HBP foi realizada por meio da curva ROC (Figura 17). Esta ferramenta não foi utilizada para comparação com o grupo controle, uma vez que não houve nível de quantificação da expressão dos genes detectável neste grupo.



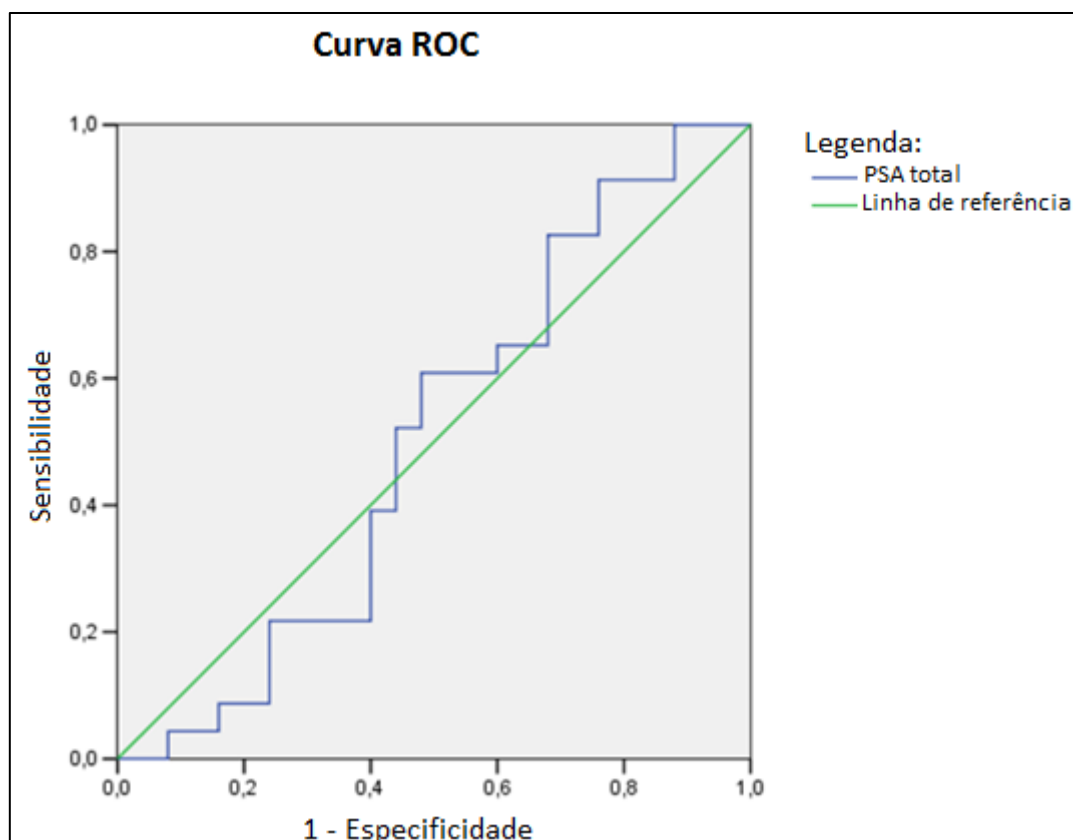
Variável	Área sob a curva	IC <sup>a</sup>	P
PCA3	0,625	0,290 – 0,960	0,450
PSA	0,596	0,349 – 0,843	0,449
PCA3/PSA	0,559	0,229 – 0,888	0,720

(a) Intervalo de confiança a 95%

Figura 17: Curva ROC para o número de cópias dos genes *PCA3*, *PSA* e relação *PCA3/PSA*.

Considerando a classificação proposta por Motta & Filho (Motta and Filho 2009), valores da área sob a curva (ASC) entre 0,60-0,70 são considerados testes pobres para o diagnóstico da doença, enquanto valores entre 0,50-0,60 são considerados ruins para o diagnóstico. Desta forma, o nível de expressão do gene *PCA3* pode ser considerado pobre e os valores de *PSA* (expressão) e relação *PCA3/PSA* são ruins para diferenciar pacientes com CaP e HBP.

A sensibilidade e especificidade do *PSA* sérico total em discriminar pacientes com CaP e HBP foram também avaliados pela curva ROC (Figura 18).



Variável	Área sob a curva	IC <sup>a</sup>	P
PSA total	0,503	0,336 – 0,670	0,975

(a) Intervalo de confiança a 95%

Figura 18: Curva ROC para os níveis séricos de PSA total.

Levando-se em consideração a classificação acima descrita, os níveis de PSA sérico total também se mostraram ruins para diferenciar pacientes com CaP e HBP, apresentando baixa sensibilidade e especificidade.

Com base nas curvas ROC, foram simulados vários pontos de corte ou *cut off* para os marcadores a partir do qual poderia ser considerado um valor positivo para CaP, sendo apresentado abaixo o valor que apresentou maior sensibilidade e especificidade (Tabela 4).

Tabela 4: Valores dos pontos de corte (*cut off*) determinados para as variáveis estudadas.

Variável	<i>Cut off</i>	Sensibilidade	1 – Especificidade
PCA3	0,2219	0,625	0,250
PSA	0,9615	0,706	0,375
PCA3/PSA	0,5007	0,824	0,500
PSA total	7,020	0,609	0,480

Na tabela 5 determinou-se o número de indivíduos com valores de expressão dos genes *PCA3*, *PSA*, da relação *PCA3/PSA* e dos valores de *PSA* sérico total maiores e menores que os valores de *cut off* simulados anteriormente.

Tabela 5: Número de indivíduos com valores maiores e menores que o *cut off* para cada variável considerando apenas indivíduos com CaP e HBP.

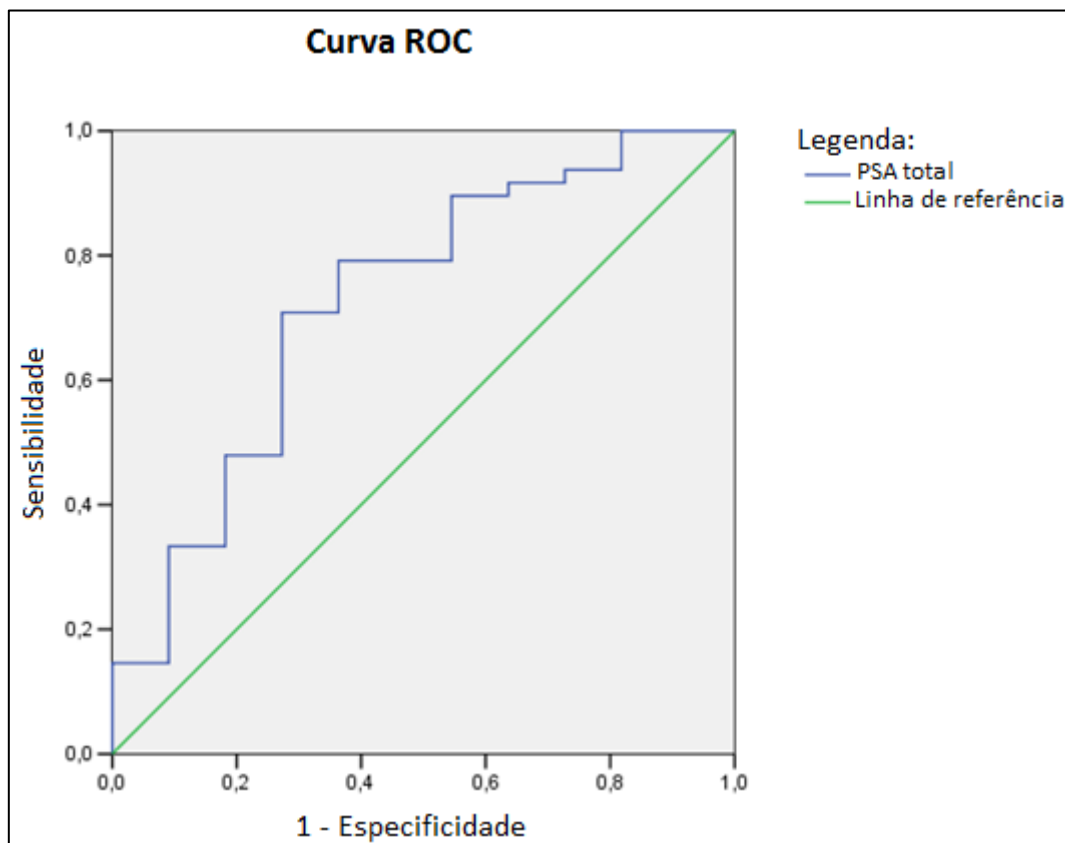
Variável		CaP	HBP	P
PCA3 (n=20)**	≥ 0,2219	10 (62,5%)	1 (25,0%)	<0,001*
	< 0,2219	6 (37,5%)	3 (75,0%)	
PSA (n=23)**	≥ 0,9615	2 (12,5%)	1 (14,3%)	0,834
	< 0,9615	14 (87,5%)	6 (85,7%)	
PCA3/PSA (n=20)**	≥ 0,5007	13 (81,2%)	2 (50,0%)	<0,001*
	< 0,5007	3 (18,8%)	2 (50,0%)	
PSA total (n=48)**	≥ 7,020	13 (59,0%)	13 (50,0%)	0,256
	< 7,020	9 (41,0%)	13 (50,0%)	

\*Significante. \*\*n=número de indivíduos com detecção da variável. Qui-quadrado.

Considerando-se os valores de *cut off* estimados, foi possível observar uma diferença significativa entre o número de indivíduos com valores acima destes no grupo CaP para as variáveis *PCA3* e razão *PCA3/PSA*, quando comparado ao grupo HBP ( $p < 0,001$ ). Para as variáveis *PSA* expressão e níveis séricos de *PSA* não foram observadas diferença de frequência entre os dois grupos.



Uma nova análise do PSA sérico total foi realizada considerando a capacidade do marcador em distinguir o grupo de controles saudáveis *versus* os outros dois grupos (CaP e HBP), conforme mostra a Figura 19.



Variável	Área sob a curva	IC <sup>a</sup>	P
PSA total	0,727	0,552 – 0,903	0,020

(a) Intervalo de confiança a 95%

Figura 19: Curva ROC para os níveis séricos de PSA total considerando o grupo controle versus o grupo de CaP + HBP.

A ASC obtida para o PSA sérico total (0,727) indica que este marcador mostra regular capacidade em prever a presença de uma alteração prostática, seja ela CaP ou HBP.

A tabela 6 apresenta o melhor valor de *cut off* para o PSA sérico total que apresentou maior sensibilidade e especificidade para diagnosticar CaP ou HBP, distinguindo-os dos pacientes sem alteração (controle).

Tabela 6: Valor dos pontos de corte (cut off) determinado para o PSA sérico total.

Variável	Valores de Cut off	Sensibilidade	1 – Especificidade
PSA total	5,560	0,708	0,273

Da mesma forma que feito anteriormente, na tabela 7 determinou-se o número de indivíduos com valores de PSA total maiores que o *cut off* acima, sendo observada maior frequência de indivíduos com valores superiores a este valor no grupo CaP+HBP quando comparado ao grupo controle.

Tabela 7: Número de indivíduos com valores maiores e menores que o *cut off* para a variável PSA total entre dois grupos.

Variável	CaP+ HBP	Controle	p
PSA total	33	3	0,009
(n=59)**	15	8	

\*Significante. \*\*n=número de indivíduos com detecção da variável. Qui-quadrado.

Além da curva ROC, realizou-se uma nova análise comparando-se o padrão-ouro do diagnóstico do CaP - biópsia, à detecção da expressão do gene *PCA3*, independentemente dos seus valores. Os resultados encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8: Desempenho do teste de detecção da expressão do gene *PCA3* no diagnóstico do Adenocarcinoma Prostático.**

		Resultado da biópsia prostática (Padrão-ouro)	
		Positiva (CaP)	Negativa (HBP)
Resultado de expressão do gene <i>PCA3</i>	Detectada expressão	16 (a)	4 (b)
	Ausência de expressão	6 (c)	22 (d)
	<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>26</b>

Parâmetro	Fórmula	Resultado (%)
Sensibilidade	$a/a+c$	73
Especificidade	$d/b+d$	85
Prevalência real	$(a+c)/N$	46
Prevalência estimada	$(a+b)/N$	42
Valor preditivo positivo	$a/a+b$	80
Valor preditivo negativo	$d/c+d$	78
Exatidão	$(a+d)/N$	79
Classificação incorreta	$(b+c)/N$	21

A mesma análise de sensibilidade e especificidade, comparando ao resultado da biópsia, foi realizada para o teste de detecção do *PCA3* e para a relação *PCA3/PSA*, considerando positivo para o teste os indivíduos com níveis de expressão maiores ou igual ao *cut off* estabelecido na Tabela 4. Como resultado, encontrou-se uma sensibilidade de 62,5% e especificidade de 75% para o *PCA3* e 81,25% e 50%, respectivamente, para a razão *PCA3/PSA*.

#### **5.4 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DO TUMOR**

Foi realizada a análise dos marcadores *PCA3*, *PSA*, *PCA3/PSA* e *PSA* sérico total nos pacientes diagnosticados com CaP de acordo com a classificação de Gleason obtida na

biópsia, classificando-os como: a) Gleason menor que 7; b) Gleason maior ou igual a 7. Embora o  $score \geq 8$  seja considerado o de alto risco, este ponto de corte foi escolhido pelo fato de que obtivemos apenas dois pacientes com este perfil, e conforme já descrito por Ouyang, Fontenete e Jamaspishvili, valores de Gleason  $\geq 7$  podem ser considerados como de pior prognóstico. (Ouyang, Bracken et al. 2009; Fontenete, Silva et al. 2011; Jamaspishvili, Kral et al. 2011) (Tabela 9)

**Tabela 9: Número de cópias dos genes PCA3 e PSA normalizados, razão PCA3/PSA e níveis séricos de PSA total de acordo com a Classificação de Gleason.**

Parâmetro	Gleason < 7 (n=9)	Gleason $\geq$ 7 (n=13)	p
PCA3	0,62 $\pm$ 0,69	0,81 $\pm$ 1,84	0,815
PSA	0,42 $\pm$ 0,41	0,33 $\pm$ 0,40	0,670
PCA3/ PSA	1,72 $\pm$ 1,77	8,70 $\pm$ 10,89	0,116
PSA total <sup>a</sup>	8,20 (4,40)	7,29 (3,66)	0,453

Média $\pm$ desvio padrão, teste T-Student; (a) Mediana e intervalo interquartilico, Mann-Whitney.

Apesar dos resultados demonstrados na Tabela 9 não apresentarem diferenças significativas entre as médias ou medianas dos valores, observa-se uma maior relação PCA3/PSA entre os indivíduos diagnosticados com câncer de pior prognóstico, ou seja, classificação de Gleason  $\geq 7$ .

Foram também determinadas as correlações para as variáveis contínuas estudadas no grupo CaP, conforma mostra a Tabela 10.

Tabela 10: Valores de coeficiente de correlação para as variáveis estudadas no grupo CaP.

Parâmetro	PCA3	PSA	PCA3/PSA	Gleason	PSA total
PCA3	-	r= 0,642 p= 0,002*	r= 0,218 p= 0,356	r= -0,268 p= 0,316	r= -0,147 p= 0,535
PSA	-	-	r= -0,443 p= 0,044*	r= -0,313 p= 0,222	r= -0,168 p= 0,423
PCA3/ PSA	-	-	-	r= 0,105 p= 0,688	r= 0,191 p= 0,407
Gleason	-	-	-	-	r= 0,038 p= 0,866

Correlação de Spearman. \* Significativo.

Observou-se uma forte correlação positiva entre o número de cópias dos genes *PCA3* e *PSA* ( $r=0,642$ ). Uma boa correlação negativa foi observada entre o número de cópias do gene *PSA* e a correlação *PCA3/PSA*, conforme já esperado ( $r=-0,443$ ). Para as outras variáveis não foi observada correlação significativa ( $p>0,05$  para todas as análises).

## **6. DISCUSSÃO**

## 6.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS GRUPOS

O presente trabalho avaliou a expressão dos genes *PCA3* e *PSA* em indivíduos com alterações prostáticas, seja maligna (CaP) ou benigna (HBP) e em indivíduos hígidos. Paralelamente, foi avaliada a aplicação do PSA sérico total, marcador já estabelecido na clínica, no diagnóstico diferencial dos grupos.

Observou-se que a distribuição de idade entre os grupos foi homogênea, uma vez que buscou-se o pareamento entre estes grupos. A idade média acima de 60 anos está associada ao fato de que a incidência de alterações prostáticas, em especial o câncer, aumenta com a idade. Embora o tabagismo e o histórico familiar de câncer sejam fatores de risco já conhecidos para o desenvolvimento de CaP, não foi observada diferença significativa na frequência destas variáveis entre os grupos, possivelmente pelo pequeno número de indivíduos que apresentaram estes fatores de risco. (MS/INCA 2013)

Foi observada uma associação do CaP com o histórico familiar deste tipo de câncer em parentes consanguíneos de 1° a 3° graus, o que indica uma relação da doença com fatores hereditários. Sabe-se que o câncer é uma doença complexa e decorre de alterações somáticas na maioria dos casos, mas alterações germinativas também estão presentes. No entanto, a etiologia do CaP é pouco esclarecida e os genes associados com esta predisposição hereditária ainda não foram completamente definidos. (Heise and Haus 2014)

Já a frequência de uso de inibidores da 5-alfa redutase, utilizado na terapêutica do HBP com a finalidade de reduzir os sintomas urinários e no CaP (Srougi 2013), não apresentou diferença significativa entre os grupos, descartando a possibilidade de que esta variável seja um fator de interferência nas análises realizadas.

## 6.2 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PCA3* E *PSA*, E DOS NÍVEIS SÉRICOS DO PSA TOTAL ENTRE OS GRUPOS

Entre os pacientes com CaP, seis não apresentaram expressão dos genes *PCA3* e *PSA* detectável. Isto indica que durante a massagem prostática e coleta das amostras não

houve liberação suficiente de células da próstata, ou ainda que possa ter ocorrido degradação do material, o que é comum com amostras de urina devido à lise celular.

Já no grupo de pacientes com HBP, apenas quatro deles apresentaram quantificação da expressão para os genes *PCA3* e *PSA*, enquanto três indivíduos apresentaram quantificação apenas para o gene *PSA*. Uma vez que trabalhos mostram ser a expressão de *PCA3* tecido-específica, sendo encontrada apenas no tumor, não esperávamos detectar a expressão do *PCA3* neste grupo (Bussemakers, van Bokhoven et al. 1999; Hessels, Klein Gunnewiek et al. 2003). Levando em consideração que a classificação em HBP foi feita com base no resultado da biópsia (padrão-ouro), não podemos descartar limitações nesta técnica e a possibilidade de que estes pacientes com HBP apresentem um câncer inicial não detectável, uma vez que a sensibilidade da biópsia varia e depende do número de fragmentos analisados. Hass et al. (2007) investigaram o valor das biópsias para o diagnóstico do CaP em próstatas removidas de autópsias comparando seis, 12 e 18 fragmentos, e definiram que as taxas de sensibilidade foram de 30%, 53% e 53%, respectivamente. (Haas, Delongchamps et al. 2007), sugerindo que a biópsia tem limitações e que o aumento do número de fragmentos além de 12 não aumenta a sensibilidade do teste.

Ainda para o grupo de HBP, esperava-se também um maior número de amostras com detecção da expressão de *PSA*, mas acreditamos que o tecido prostático na HBP descama menos facilmente que a próstata acometida pelo tumor, mesmo após a massagem prostática, devido à maior proliferação celular observada no CaP. (Nelson, De Marzo et al. 2004) Dessa forma, foi obtida a relação *PCA3/PSA* apenas para os pacientes com detecção de ambos os genes.

Entre os indivíduos do grupo controle, nenhum apresentou detecção da expressão do gene *PCA3* e apenas um indivíduo apresentou a expressão de *PSA*. Este último resultado demonstra a limitação da técnica em detectar células da próstata em indivíduos sem alterações, já que o *PSA* só é detectado quando há células prostáticas na amostra. A massagem prostática é, portanto, de extrema importância para liberação das células na urina. Fontenete *et al* (2011) demonstraram a importância da massagem prostática em um estudo realizado com 57 indivíduos com suspeita de



alterações prostáticas submetidos ao teste de detecção do *PCA3* e *PSA* em urina sem massagem prostática, onde apenas 15,8% dos casos apresentaram expressão do *PSA* e apenas 3,8% dos pacientes com CaP apresentaram níveis detectáveis de *PCA3*. (Fontenete, Silva et al. 2011)

A vantagem de se utilizar a urina no rastreio do CaP é o fato de ser um método não invasivo, mas em contrapartida, exige cuidados e está sujeito às variações associadas à execução da massagem prostática pelo médico. Além disso, o estudo de expressão gênica em amostras de urina é um procedimento difícil e que exige rápida manipulação e cuidados especiais a fim de evitar degradação e, dessa forma, falsos resultados podem ocorrer. A urina é um material com muitos contaminantes e inibidores da Reação em Cadeia da Polimerase, podendo interferir na análise e dificultar a padronização do teste em questão. (Toye, Woods et al. 1998)

Linehan *et al.* (2014) compararam a expressão do *PCA3* na secreção prostática obtida após massagem da próstata e observou aumento na ASC quando comparada com a curva ROC de detecção do mesmo marcador na urina. A secreção prostática é obtida pela coleta do fluido diretamente do canal urinário. Este também é um procedimento de coleta pouco invasivo, evita a lise celular que ocorre na urina e a diluição dos componentes do fluido prostático. Desta forma, este procedimento possivelmente aumenta a sensibilidade e especificidade do teste de detecção de marcadores prostáticos como o *PCA3* e *PSA*, sendo importante a condução de novos estudos para confirmar estas hipóteses. (Dr J. Linehan 2014)

Embora a relação *PCA3/PSA* tenha sido maior entre os pacientes com CaP, a diferença entre os grupos (CaP e HBP) não foi significativa. Não houve diferença também em relação à detecção dos genes *PCA3* e *PSA* isoladamente, embora no primeiro caso a média de valores tenha sido superior no grupo CaP. Vários estudos conseguiram demonstrar diferenças significativas entre os valores de expressão de ambos os genes entre pacientes com CaP e HBP em amostras de urina pós massagem prostática. (Hessels, Klein Gunnewiek et al. 2003; Groskopf, Aubin et al. 2006; Haese, de la Taille et al. 2008; Neves, Araujo et al. 2008; Mearini, Antognelli et al. 2009; Jamaspishvili, Kral et al. 2011)

Possivelmente, esta significância não foi demonstrada em nosso trabalho pelo fato de que estas variáveis apresentaram grande dispersão e variabilidade, o que se pode observar nas figuras 13 a 15 e na grandeza do desvio padrão calculado. Além disso, o limitado tamanho amostral corroborou para este achado, sendo necessário avaliar um grupo maior para que esta diferença seja observada.

Em relação aos níveis de PSA sérico total, embora tenhamos observado maiores valores também entre os pacientes com CaP, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Comparando-se o grupo HBP com o grupo controle, os níveis de PSA foram maiores entre os pacientes com HBP. Dessa forma, evidencia-se a limitação do PSA no rastreio do CaP e HBP. São frequentes os relatos na literatura de detecção de CaP em pacientes com PSA sérico menor do que o valor de referência e casos de HBP em indivíduos com valores superiores ao valor de referência. (Thompson, Pauler et al. 2004; Hessels and Schalken 2009; Marco F. Dall'Oglio 2011) Hessels *et al.* (2009) demonstraram que pacientes com níveis séricos de PSA entre 3 e 10 ng/mL apresentam chance de 60 a 75% de apresentarem biópsia negativa, enquanto Thompson *et al.* (2004) discutiram que a neoplasia pode ser encontrada em homens com níveis de PSA menores que 4 ng/mL. (Thompson, Pauler et al. 2004; Hessels and Schalken 2009)

Ao realizarmos a categorização dos grupos de acordo com a presença ou ausência de detecção dos genes, observou-se uma maior frequência de detecção do *PCA3* entre os indivíduos com CaP quando comparado ao grupo com HBP. O mesmo foi observado para o PSA. Com os resultados obtidos, percebe-se que a análise qualitativa dos genes *PCA3* e PSA foi mais significativa do que a análise quantitativa. Uma vez que a ausência de expressão do gene *PCA3* exclui a necessidade de biópsia prostática, este marcador aponta como sendo um importante parâmetro para evitar biópsias desnecessárias. (Haese, de la Taille et al. 2008; Gittelman, Hertzman et al. 2013) A presença do *PCA3* indica uma chance correspondente a 80% de o indivíduo vir a apresentar um resultado de biópsia positiva, uma vez que entre os indivíduos com detecção de expressão do *PCA3*, 16 apresentaram biópsia positiva e apenas quatro apresentaram biópsia negativa.

Categorizou-se também o PSA total separando-se os indivíduos com PSA menor que 4 daqueles com  $PSA \geq 4$  ng/mL. Dessa forma, observou-se uma maior frequência de indivíduos com PSA total  $\geq 4$  ng/mL no grupo de CaP e HBP quando comparado aos controles. No entanto, não foi observada diferença entre os grupos CaP e HBP, o que corrobora para a discussão de que o PSA sérico total é pouco específico no rastreio do CaP, já que não diferencia pacientes com alterações malignas de pacientes com alterações benignas. (Riegman, Vlietstra et al. 1991; Balk, Ko et al. 2003; Riffenburgh and Amling 2003; Thompson, Pauler et al. 2004; Hessels and Schalken 2009)

### 6.3 VALIDADE DOS MARCADORES COMO TESTES DE DIAGNÓSTICO

De acordo com a ASC obtida na Curva ROC da Figura 17, percebe-se que a análise quantitativa da expressão do *PCA3* é pobre para diferenciar pacientes com CaP e HBP, mas ainda constitui um melhor método do que apenas a análise da expressão do *PSA* e da relação *PCA3/PSA*, que são considerados ruins para essa finalidade. No entanto, a detecção da expressão do *PSA* em urina é importante para normalizar o número de células prostáticas presentes na amostra.

Hessels *et al.* (2003) e Tinzl *et al.* (2004) encontraram áreas sob as curvas ROC para o *score PCA3* em urina de 0,717 e 0,87, respectivamente, valores considerados bons para um teste diagnóstico do câncer. Hessels *et al.* (2003) analisaram amostras de urina pós massagem prostática de 108 homens com alterações na próstata admitidos para realização da biópsia e PSA sérico maior que 3 ng/mL, enquanto Tinzl *et al.* (2004), em um estudo prospectivo, estudaram 201 pacientes encaminhados para detecção do CaP. (Hessels, Klein Gunnewiek et al. 2003; Tinzl, Marberger et al. 2004) Já Marks *et al.* (2007) e Jamaspishvili *et al.* (2011) obtiveram valores de ASC de 0,678 e 0,671, respectivamente, valores considerados pobres. Marks *et al.* (2007) testaram amostras de 233 homens com níveis de PSA sérico maior ou igual a 2,5 ng/mL e no mínimo uma biópsia negativa prévia. Jamaspishvili *et al.* (2011) estudaram 176 indivíduos com alterações nos níveis de PSA sérico. Os valores encontrados nestes últimos trabalhos estão próximos do valor observado no presente estudo para a detecção do *PCA3* normalizado. (Marks, Fradet et al. 2007; Jamaspishvili, Kral et al. 2011) Acredita-se que

as limitações intrínsecas à seleção dos grupos nos mais diversos trabalhos, em especial ao tamanho amostral, possam ter contribuído para estes resultados contraditórios.

Considerando os valores obtidos de sensibilidade e especificidade, notamos que a análise do *PCA3* é uma variável mais específica na detecção do CaP quando comparada ao *PSA* e à relação *PCA3/PSA*, que são mais sensíveis na diferenciação de pacientes com CaP. Já a análise do *PSA* sérico de acordo com a Curva ROC, mostrou boa capacidade de detectar qualquer alteração prostática quando compara-se ao grupo controle, mas sem diferenciar entre alterações benignas e malignas. Sabe-se que o *PSA* deve ser avaliado individualmente pelo médico para cada paciente, de acordo com o quadro clínico e exames adicionais, assim como não deve ser utilizado isoladamente para uma conclusão clínica devido à sua baixa especificidade. (Riegman, Vlietstra et al. 1991; Balk, Ko et al. 2003; Riffenburgh and Amling 2003; Thompson, Pauler et al. 2004; Hessels and Schalken 2009)

Quando foram estimados valores de *cut off* para cada variável que conjugavam maior sensibilidade e especificidade, observou-se que a frequência de valores iguais ou acima de 0,2219 (número de cópias) para o gene *PCA3* foi maior para o grupo CaP quando comparado com o grupo HBP. Da mesma forma, valores iguais ou maiores de 0,5007 para a razão *PCA3/PSA* foram maiores para o grupo com câncer. Desta forma, estes resultados indicam que valores quantitativos da expressão de *PCA3* e razão *PCA3/PSA* poderão ser utilizados na rotina clínica, mas este valor de referência deve ser estabelecido num grupo maior e que seja representativo da população em que o teste será aplicado.

O valor de *cut off* sugerido pelo estudo de Hessels *et al.* (2003) citado anteriormente foi de 0,200 para o *score PCA3* comparando sedimentos urinários de homens com alterações malignas e homens com alterações benignas. Já Tinzi *et al.* (2004) estimaram um *cut off* de 0,500 no estudo prospectivo de pacientes encaminhados para detecção do CaP, valor muito próximo ao observado no presente estudo. (Hessels, Klein Gunnewiek et al. 2003; Tinzi, Marberger et al. 2004)

Os valores de *cut off* estimados para o *PSA* sérico total para distinguir as duas alterações prostáticas (7,020 ng/mL) ou para diferenciar qualquer alteração da

próstata comparado ao controle (5,560 ng/mL) são ainda maiores que o valor de referência utilizado atualmente (4 ng/mL), o que confirma a baixa especificidade do PSA no rastreio do CaP (Riegman, Vlietstra et al. 1991; Balk, Ko et al. 2003; Riffenburgh and Amling 2003; Thompson, Pauler et al. 2004; Hessels and Schalken 2009), já que foram detectados indivíduos com valores de PSA sérico total acima de 7,020 ng/mL sem alterações prostáticas malignas.

Ao compararmos a detecção do CaP através do teste do *PCA3* e da biópsia prostática, que constitui o método padrão-ouro para este estudo, notamos que a sensibilidade e a especificidade do teste foram 73% e 85%, respectivamente. O teste, portanto, mostrou ser mais específico do que sensível, o que é desejável para um teste que elimina a chance de um resultado falso positivo, evitando biópsias repetitivas. O ideal seria um teste com alta sensibilidade e especificidade, mas o valor destas propriedades depende dos resultados dos testes e de sua distribuição entre os indivíduos com e sem CaP. Considerando também que o aumento da sensibilidade ocorre em detrimento da especificidade e vice-versa, a escolha de um valor de *cut off* ideal é essencial na discriminação correta dos doentes.

A acurácia do teste, mesmo apresentando resultados com classificação incorreta (4 falsos positivos e 6 falsos negativos), foi de 79%, demonstrando uma exatidão, ou seja, uma boa relação entre o diagnóstico estimado e o diagnóstico real. Além disso, o teste apresentou valores preditivos positivo e negativo próximos (80 e 78%, respectivamente), o que significa que a proporção de pacientes verdadeiramente classificados como CaP ou HBP foi semelhante.

Considerando a sensibilidade e especificidade para a detecção do *PCA3* e da relação *PCA3/PSA* de acordo com o *cut off* estimado, observou-se que este último apresentou maior sensibilidade (81,25%) na capacidade de diferenciar indivíduos com CaP de indivíduos com HBP, enquanto que o teste de detecção apenas do *PCA3* foi menos sensível, mas mais específico quando comparado à razão *PCA3/PSA*.

Utilizando o *cut off* de 0,200, Hessels *et al.* (2003) obtiveram sensibilidade de 83% para a relação *PCA3/PSA* e 16, dos 24 indivíduos com biópsia positiva, apresentaram detecção do *PCA3* e *PSA*, com especificidade de 67% para a relação *PCA3/PSA*. Além

disso, o valor preditivo negativo foi de 90%. (Hessels, Klein Gunnewiek et al. 2003) Tinzi *et al.* (2004), utilizando o *cut off* de 0,500 para o *score* PCA3/PSA, obtiveram sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 82%, 76%, 67% e 87%, respectivamente. Para o PSA sérico, observaram 98%, 5%, 40% e 83% para os mesmos parâmetros. (Tinzi, Marberger et al. 2004)

A fim de entender os resultados falso-positivos e falso-negativos obtidos das análises do *PCA3* em amostras de urina, Robert *et al* (2013) sugeriram a análise em conjunto do *PCA3* e do gene de fusão *TMPRSS2:ERG* em amostras de tecido prostático obtidos após biópsia de pacientes com CaP e HBP, além de realizar a análise do tecido prostático normal adjacente ao tumoral. Dessa forma não foi detectado nenhum falso positivo e 57% dos resultados falso negativos para o *PCA3* foram corrigidos pela detecção do gene de fusão. Este estudo sugere que a análise em conjunto de outros marcadores pode auxiliar no aumento da especificidade do *PCA3* em diferenciar pacientes com CaP de HBP. (Robert, Jannink et al. 2013)

#### **6.4 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DO TUMOR**

A classificação de Gleason obtida na biópsia auxilia na determinação do prognóstico no CaP. Desta maneira, dividiu-se o grupo de indivíduos com CaP em Gleason menor que 7 e Gleason maior ou igual a 7. Não observou-se diferença significativa entre estes grupos e as variáveis estudadas, mas percebe-se uma maior relação *PCA3/PSA* entre os indivíduos diagnosticados com câncer de alto risco. Os resultados sugerem que pode haver uma associação positiva entre o nível de expressão do gene *PCA3* e o pior prognóstico da doença, hipótese que poderá ser confirmada com um número maior de indivíduos estudados.

Jamaspishvili *et al.* (2011) realizaram a mesma análise e não encontraram diferença entre pacientes com Gleason de alto padrão comparado com indivíduos com Gleason menor que 7. Para o PSA total, os autores observaram níveis significativamente mais elevados entre indivíduos com tumor em estágio avançado. (Jamaspishvili, Kral et al. 2011)

A fim de identificar possíveis correlações entre as variáveis estudadas, foi aplicado o Teste de Spearman nas variáveis contínuas no grupo de indivíduos com CaP. Observou-se que ocorre uma forte correlação positiva entre o *PCA3* e o *PSA*, ou seja, a expressão de *PCA3* aumenta com a expressão de *PSA*. A utilização do *PSA* para normalizar o *PCA3* é importante, pois o *PSA* é um gene específico da próstata, servindo para ajustar os valores de *PCA3* em função da quantidade de células prostáticas na amostra, evitando que se superestime um valor de expressão de *PCA3* em amostras com maior número de células prostáticas. Já a correlação entre o *PSA* e a relação *PCA3/PSA* foi negativa, o que é facilmente explicado já que a o *PSA* é o divisor na determinação da relação.

### **6.5 UTILIZAÇÃO DO TESTE DE DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *PCA3***

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a necessidade de se analisar um maior número de pacientes a fim de estabelecer um *score* que possa prever uma biópsia positiva, pois até o momento o teste não foi capaz de discriminar os indivíduos com CaP ou HBP com base apenas no número de cópias de *PCA3*.

A função do *PCA3* ainda não é conhecida, mas estudos mostram que o RNA não codificante do gene está envolvido no controle da sobrevivência celular no CaP, modulando a sinalização celular via receptores androgênicos, o que poderia levantar novas possibilidades de utilização deste marcador na terapêutica do CaP. (Ferreira, Palumbo et al. 2012)

Apesar dos estudos iniciais promissores envolvendo o gene *PCA3*, a utilidade clínica deste marcador ainda é incerta. De acordo com o presente estudo, indivíduos sem alterações prostáticas não apresentam expressão do gene *PCA3* quantificável na urina, mas o teste não foi capaz de excluir completamente os pacientes com HBP.

Outras formas de avaliação do *PCA3* têm sido sugeridas, como a análise de mutações e dos diferentes tipos de transcritos, com o objetivo de auxiliar na diferenciação entre CaP e HBP e na determinação do prognóstico da doença. (Clarke, Zhao et al. 2009; Zhou, Chen et al. 2011) Além disso, a determinação de densidade do *PCA3* (*PCA3D*), semelhante à densidade do *PSA*, também foi proposta por Ruffion *et al* (2014), que consiste na razão entre o *score* *PCA3* e o volume prostático. O estudo demonstrou que

o PCA3D aumenta a especificidade do teste quando comparado à análise apenas do *PCA3*. (Ruffion, Perrin et al. 2014) Outros marcadores têm também sido avaliados, como na revisão de Amaro *et al* (2014), onde foram estudados mais de 380 marcadores publicados em mais de 20 mil artigos. Esta análise de 10 anos de pesquisa sugere que o teste diagnóstico e prognóstico é mais difícil em CaP do que em outras neoplasias e que ainda não há um forte candidato como marcador do CaP. (Amaro, Esposito et al. 2014)

Podemos inferir que para os pacientes que não apresentaram detecção do gene *PSA*, alguns fatores podem ter interferido, como a pequena quantidade de células prostáticas na amostra, a degradação do mRNA, ou aos interferentes analítica do teste molecular. Entre os pacientes estudados do grupo com CaP, 6 não apresentaram detecção dos genes *PCA3* e nem do *PSA*, sugerindo que a ausência de detecção possa ter ocorrido devido à ausência de células prostáticas na amostra.

O maior desafio técnico para a liberação do teste para uso na rotina laboratorial é a detecção de células prostáticas em todas as amostras, o que pode sofrer interferência da massagem prostática, que é um procedimento essencial para o sucesso do teste.

Embora não avaliado no presente estudo, por serem os casos de CaP recém-diagnosticados, estudos mostram que o teste pode ser utilizado também em pacientes submetidos à prostatectomia, mas que voltaram a apresentar PSA sérico elevado. Nestes casos, quando o *PCA3* é detectado, uma nova biópsia positiva é provavelmente obtida, o que confirma a capacidade prognóstica do teste de expressão do *PCA3*. (Groskopf, Aubin et al. 2006)



## **7. CONCLUSÕES**

- Os testes qualitativos de expressão dos genes *PCA3* e *PSA* sinalizam serem biomarcadores úteis na diferenciação do paciente com CaP e HBP, bem como destes com indivíduos sem alterações prostáticas;
- O teste quantitativo de média do número de cópias de *PCA3* e *PSA*, bem como a relação *PCA3/PSA*, não foram capazes de discriminar os indivíduos com CaP ou HBP;
- Valores de *cut off* estimados em 0,2219 para expressão de *PCA3* e 0,5007 para a razão *PCA3/PSA* são possíveis valores de referência para a diferenciação do CaP e HBP.
- Os valores de PSA sérico total acima de 5,560 diferenciaram indivíduos com alterações benignas ou malignas daqueles sem alterações prostáticas, ao passo que apenas valores acima de 7,020 foram mais frequentes em indivíduos com CaP quando comparados ao grupo com HBP.
- A expressão de *PCA3*, *PSA* e PSA sérico total não mostraram relação com o pior prognóstico da doença de acordo com a classificação de Gleason.

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Abate-Shen, C. and M. M. Shen (2000). "Molecular genetics of prostate cancer." *Genes Dev* 14(19): 2410-2434.

ACS. (2012). "Prostate Cancer Overview." American Cancer Society, from [www.cancer.org](http://www.cancer.org).

AEU, A. E. d. U. (2013). from <http://www.uroweb.org>.

Albert Leyva, J. a. W. N. K. (1974). "Measurement of DNA in Cultured Human Cells." *Analytical Biochemistry* 62: 173-179.

Alshahrani, S., J. McGill, et al. (2013). "Prostatitis and male infertility." *Journal of reproductive immunology* 100(1): 30-36.

Amaro, A., A. I. Esposito, et al. (2014). "Validation of proposed prostate cancer biomarkers with gene expression data: a long road to travel." *Cancer Metastasis Rev* 30: 30.

Aron, M., T. P. Rajeev, et al. (2000). "Antibiotic prophylaxis for transrectal needle biopsy of the prostate: a randomized controlled study." *BJU Int* 85(6): 682-685.

Balk, S. P., Y. J. Ko, et al. (2003). "Biology of prostate-specific antigen." *J Clin Oncol* 21(2): 383-391.

Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* 136(2): 215-233.

Brawer, M. K., E. A. Aramburu, et al. (1993). "The inability of prostate specific antigen index to enhance the predictive the value of prostate specific antigen in the diagnosis of prostatic carcinoma." *J Urol* 150(2 Pt 1): 369-373.

Bussemakers, M. J., A. van Bokhoven, et al. (1999). "DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer." *Cancer Res* 59(23): 5975-5979.

Catalona, W. J., A. W. Partin, et al. (1998). "Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial." *Jama* 279(19): 1542-1547.

Catalona, W. J., J. P. Richie, et al. (1994). "Comparison of prostate specific antigen concentration versus prostate specific antigen density in the early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves." *J Urol* 152(6 Pt 1): 2031-2036.

Catto, J. W., A. Alcaraz, et al. (2011). "MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review." *Eur Urol* 59(5): 671-681.

Choudhury, A. D., R. Eeles, et al. (2012). "The role of genetic markers in the management of prostate cancer." *Eur Urol* 62(4): 577-587.

Clarke, R. A., Z. Zhao, et al. (2009). "New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression." *PLoS One* 4(3): 25.

De Marzo, A. M., T. L. DeWeese, et al. (2004). "Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment." *J Cell Biochem* 91(3): 459-477.

Dhir, R., B. Vietmeier, et al. (2004). "Early identification of individuals with prostate cancer in negative biopsies." *J Urol* 171(4): 1419-1423.

Djavan, B., M. Waldert, et al. (2001). "Safety and morbidity of first and repeat transrectal ultrasound guided prostate needle biopsies: results of a prospective European prostate cancer detection study." *J Urol* 166(3): 856-860.

Dr J. Linehan, D. J. Y., Prof. T. Wilson and Prof. S. Smith (2014). "The role of expressed prostatic secretion biomarkers in prostate cancer screening/surveillance." *CLI-ONLINE Digital Magazine*.

Edwards, J. L. (2008). "Diagnosis and management of benign prostatic hyperplasia." *Am Fam Physician* 77(10): 1403-1410.

Eeles, R. A., A. A. Olama, et al. (2013). "Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array." *Nat Genet* 45(4): 385-391.

Ferreira, L. B., A. Palumbo, et al. (2012). "PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling." *BMC Cancer* 12(507): 1471-2407.

Fontenete, S., J. Silva, et al. (2011). "Controversies in using urine samples for Prostate Cancer detection: PSA and PCA3 expression analysis." *Int Braz J Urol* 37(6): 719-726.

GEN-PROBE® (2010). "Ensaio PROGENSA® PCA3."

Gittelman, M. C., B. Hertzman, et al. (2013). "PCA3 molecular urine test as a predictor of repeat prostate biopsy outcome in men with previous negative biopsies: a prospective multicenter clinical study." *J Urol* 190(1): 64-69.

Gleason, D. F. (1966). "Classification of prostatic carcinomas." *Cancer Chemother Rep* 50(3): 125-128.

Goh, C. L., F. R. Schumacher, et al. (2012). "Genetic variants associated with predisposition to prostate cancer and potential clinical implications." *J Intern Med* 271(4): 353-365.

Griffiths (2009). *Introdução a Genética*.

- Groskopf, J., S. M. Aubin, et al. (2006). "APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer." *Clin Chem* 52(6): 1089-1095.
- Haas, G. P., N. B. Delongchamps, et al. (2007). "Needle biopsies on autopsy prostates: sensitivity of cancer detection based on true prevalence." *J Natl Cancer Inst* 99(19): 1484-1489.
- Haese, A., A. de la Taille, et al. (2008). "Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy." *Eur Urol* 54(5): 1081-1088.
- Haj-Ahmad, T. A., M. A. Abdalla, et al. (2014). "Potential Urinary miRNA Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients." *J Cancer* 5(3): 182-191.
- Hayward, S. W. and G. R. Cunha (2000). "The prostate: development and physiology." *Radiol Clin North Am* 38(1): 1-14.
- Heise, M. and O. Haus (2014). "Hereditary prostate cancer." *Postepy Hig Med Dosw* 68(0): 653-665.
- Hessels, D., J. M. Klein Gunnewiek, et al. (2003). "DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer." *Eur Urol* 44(1): 8-15.
- Hessels, D. and J. A. Schalken (2009). "The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer." *Nat Rev Urol* 6(5): 255-261.
- Hessels, D., F. P. Smit, et al. (2007). "Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer." *Clin Cancer Res* 13(17): 5103-5108.
- Humphrey, P. A. (2004). "Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate." *Mod Pathol* 17(3): 292-306.
- Ishak, M. B. and V. N. Giri (2011). "A systematic review of replication studies of prostate cancer susceptibility genetic variants in high-risk men originally identified from genome-wide association studies." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20(8): 1599-1610.
- Jamaspishvili, T., M. Kral, et al. (2011). "Quadriplex model enhances urine-based detection of prostate cancer." *Prostate Cancer Prostatic Dis* 14(4): 354-360.
- King, J. C., J. Xu, et al. (2009). "Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis." *Nat Genet* 41(5): 524-526.
- Lee, C. H., O. Akin-Olugbade, et al. (2011). "Overview of prostate anatomy, histology, and pathology." *Endocrinol Metab Clin North Am* 40(3): 565-575.
- Loeb, S., H. B. Carter, et al. (2011). "Complications after prostate biopsy: data from SEER-Medicare." *J Urol* 186(5): 1830-1834.

Lucia, M. S., A. K. Darke, et al. (2008). "Pathologic characteristics of cancers detected in The Prostate Cancer Prevention Trial: implications for prostate cancer detection and chemoprevention." *Cancer Prev Res* 1(3): 167-173.

Marco F. Dall'Oglio, A. C., Eliney Ferreira Faria, Gustavo Franco Cavalhal (2011). *Diretrizes de Câncer de Próstata*.

Marks, L. S., Y. Fradet, et al. (2007). "PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy." *Urology* 69(3): 532-535.

McVary, K. T. (2010). "American Urological Association Guideline: Management of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH)." *American Urological Association Education and Research*.

Mearini, E., C. Antognelli, et al. (2009). "The combination of urine DD3(PCA3) mRNA and PSA mRNA as molecular markers of prostate cancer." *Biomarkers* 14(4): 235-243.

Medicine, T. U. o. C. (2013). "Cancer library ", from [www.uchospitals.edu/online-library/content=CDR62965](http://www.uchospitals.edu/online-library/content=CDR62965).

Meng, F., R. Henson, et al. (2007). "MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer." *Gastroenterology* 133(2): 647-658.

Motta, V. T. and P. F. d. O. Filho (2009). "SPSS - ANÁLISE DE DADOS BIOMÉDICOS." *MEDBOOK*.

MS/INCA. (2013). "Estimativa de Câncer no Brasil." from <http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>.

Nelson, W. G., A. M. De Marzo, et al. (2004). "The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer." *J Urol* 172(5 Pt 2): S11-12.

Neves, A. F., T. G. Araujo, et al. (2008). "Combined analysis of multiple mRNA markers by RT-PCR assay for prostate cancer diagnosis." *Clin Biochem* 41(14-15): 1191-1198.

NICE, N. C. C. f. C. (2008). *Prostate Cancer: Diagnosis and Treatment*.

Obort, A. S., M. B. Ajadi, et al. (2013). "Prostate-Specific Antigen: Any Successor in Sight?", *Rev Urol*. 2013;15(3):97-107.

Ouyang, B., B. Bracken, et al. (2009). "A duplex quantitative polymerase chain reaction assay based on quantification of alpha-methylacyl-CoA racemase transcripts and prostate cancer antigen 3 in urine sediments improved diagnostic accuracy for prostate cancer." *J Urol* 181(6): 2508-2513.

Özen, H. and S. Sözen (2006). "PSA Isoforms in Prostate Cancer Detection." *European Urology Supplements* 5(6): 495-499.

Pierce, B. A. (2008). "Genetics: A Conceptual Approach."

Riegman, P. H., R. J. Vlietstra, et al. (1991). "The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element." *Mol Endocrinol* 5(12): 1921-1930.

Riffenburgh, R. H. and C. L. Amling (2003). "Use of early PSA velocity to predict eventual abnormal PSA values in men at risk for prostate cancer." *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6(1): 39-44.

Robert, G., S. Jannink, et al. (2013). "Rational basis for the combination of PCA3 and TMPRSS2:ERG gene fusion for prostate cancer diagnosis." *Prostate* 73(2): 113-120.

Ruffion, A., P. Perrin, et al. (2014). "Additional value of PCA3 density to predict initial prostate biopsy outcome." *World J Urol* 6: 6.

Schiller, D. S. and A. Parikh (2011). "Identification, pharmacologic considerations, and management of prostatitis." *Am J Geriatr Pharmacother* 9(1): 37-48.

Shappell, S. B. (2008). "Clinical utility of prostate carcinoma molecular diagnostic tests." *Rev Urol* 10(1): 44-69.

Srougi, M. R., L. A.; Piovesan, A. C.; Colombo, J. R.; Nesrallah, A. (2013). "Doenças da próstata." *Revista de Medicina* 87: 166-177.

Sun, a. De, et al. (2014). "Role of Prostate Specific Antigen, Digital Rectal Examination and Trans Rectal Ultrasonography in the Diagnosis of Prostate Cancer in Patients with Lower Urinary Tract Symptoms." *Arch Clin Exp Surg* 3(1): 40-46.

Thompson, I. M., D. K. Pauler, et al. (2004). "Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq$  4.0 ng per milliliter." *N Engl J Med* 350(22): 2239-2246.

Tinzl, M., M. Marberger, et al. (2004). "DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer." *Eur Urol* 46(2): 182-186.

Tomlins, S. A., S. M. Aubin, et al. (2011). "Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA." *Sci Transl Med* 3(94): 3001970.

Tonon, T. C. A. S., J. P. F. (2009). "Câncer de Próstata: Uma revisão da literatura." *Saúde e Pesquisa* 2(3): 401-410.

Toye, B., W. Woods, et al. (1998). "Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for Chlamydia trachomatis testing." *J Clin Microbiol* 36(8): 2356-2358.

Velonas, V. M., H. H. Woo, et al. (2013). "Current status of biomarkers for prostate cancer." *Int J Mol Sci* 14(6): 11034-11060.

Yamamoto, T., K. Ito, et al. (2001). "Diagnostic significance of digital rectal examination and transrectal ultrasonography in men with prostate-specific antigen levels of 4 NG/ML or less." *Urology* 58(6): 994-998.



Zhou, W., Z. Chen, et al. (2011). "Association of short tandem repeat polymorphism in the promoter of prostate cancer antigen 3 gene with the risk of prostate cancer." *PLoS One* 6(5): 31.

**ANEXO 1****APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – COEP/UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Projeto: CAAE – 08500412.7.0000.5149

Interessado(a): Profa. Karina Braga Gomes Borges  
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia - UFMG

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 28 de novembro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da expressão dos genes PSA e PCA3 como biomarcadores no diagnóstico diferencial do câncer e hiperplasia benigna da próstata" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO 2

## APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – DEPE/HC-UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas

Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão

Belo Horizonte, 06 de fevereiro de 2013.

PROCESSO: Nº 121/12 "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES PSA E PCA3 COMO BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO CÂNCER E HIPERPLASIA BENIGNA DA PRÓSTATA"

SR(A) PESQUISADOR(A):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 28/11/2012, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE *relatório* parcial ou final, após um ano.

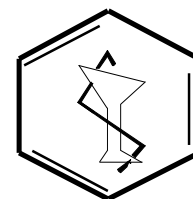
Atenciosamente,

PROF.ª ANDRÉA MARIA SILVEIRA  
Diretora da DEPE/HC-UFMG

À SR.  
Prof.ª Karina Braga Gomes Borges  
Dpto. Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia- UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**PROJETO DE PESQUISA: Avaliação da expressão dos genes PSA e PCA3 como biomarcadores no diagnóstico diferencial do câncer e hiperplasia benigna da próstata**

Prezado Sr.,

Este projeto tem por objetivo estudar como o Câncer de Próstata se desenvolve, na tentativa de poupar a necessidade de se realizar a biópsia caso seja excluída a chance de se ter o câncer. Isso poderá ser feito com um teste de menor risco, detectando-se alterações na primeira urina do paciente, após exame no consultório. Esse estudo auxiliará também a determinar a gravidade da doença, quando presente. É possível que você não venha a se beneficiar diretamente dos resultados deste projeto, mas certamente contribuirá para que novos pacientes venham futuramente se beneficiar.

Para conclusão da pesquisa, será necessário comparar os resultados dos exames de voluntários com câncer de próstata confirmado após biópsia (grupo 1) com os resultados de voluntários com hiperplasia benigna da próstata confirmada após biópsia (grupo 2). Teremos um terceiro grupo formado por pacientes sem nenhuma das alterações, servindo como grupo controle (grupo 3). Caso na sua biópsia seja detectada presença do tumor, sua amostra será analisada juntamente com os outros indivíduos do grupo 1. Caso seja detectada hiperplasia benigna da próstata, sua amostra será analisada juntamente com os indivíduos do grupo 2. Caso não seja detectado aumento no volume da próstata, nem qualquer outra alteração clínica, até mesmo sem necessidade de biópsia, sua amostra será analisada juntamente com as amostras do grupo 3.

A coleta da amostra de urina deve ser realizada imediatamente após o atendimento clínico com massagem prostática e não inclui qualquer risco para o paciente. Deve ser coletado o primeiro jato num copo de coleta fornecido, com volume de aproximadamente 30 mL. Para uma melhor coleta pede-se que o paciente beba dois copos de água antes da consulta.

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa como voluntário do grupo 1, do grupo 2 ou do grupo 3, sem custo algum pelos exames realizados. Se você quiser participar, poderá fazê-lo doando 30 mL de sua urina para o uso nesta pesquisa, sendo este material armazenado em condições adequadas. Se você não quiser participar, não haverá qualquer problema ou alteração no seu tratamento e assistência recebida pelo seu médico. As amostras coletadas serão utilizadas para a obtenção do material genético.

Seu nome será mantido em segredo, não sendo divulgado em nenhuma hipótese.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

De acordo: \_\_\_\_\_

(Assinatura)

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Qualquer dúvida sobre a sua participação neste estudo, por favor, entre em contato com a Profa. Karina Braga Gomes Borges no telefone 3409-6895- Faculdade de Farmácia/UFMG.

Desde já agradecemos sua valiosa participação.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável

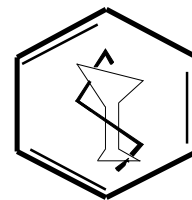
Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil. telefax 31 3409-4592. coep@prpq.ufmg.br**

## APÊNDICE 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
 FACULDADE DE FARMÁCIA  
 DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



## FICHA CLÍNICA

PROJETO DE PESQUISA: **Avaliação da expressão dos genes PSA e PCA3 como biomarcadores no diagnóstico diferencial do câncer e hiperplasia benigna da próstata**

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_ Número: \_\_\_\_\_

Médico que realizou a coleta: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora da coleta: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_ anos (Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Telefones: ( ) \_\_\_\_\_

Já foi diagnosticado com câncer? \_\_ SIM \_\_ NÃO

Se sim, qual tipo de câncer? \_\_\_\_\_

Presença de câncer na família? \_\_ SIM \_\_ NÃO

Se sim, qual tipo de câncer e qual grau de parentesco?  
 \_\_\_\_\_

Tem alguma doença crônica? \_\_ SIM \_\_ NÃO

Se sim, qual?  
 \_\_\_\_\_

Atualmente está em uso de algum medicamento? \_\_ SIM \_\_ NÃO

Se sim, qual (is)?  
 \_\_\_\_\_

Utiliza finasterida: \_\_ SIM \_\_ NÃO

Fuma? \_\_ SIM \_\_ NÃO

Se sim, quanto e com que frequência?  
 \_\_\_\_\_

Apresenta alterações urinárias: \_\_ SIM \_\_ NÃO

Se sim, qual (is)? \_\_\_\_\_

PSA livre: \_\_\_\_\_ ng/mL PSA Total: \_\_\_\_\_ ng/mL

PSA Livre/PSA Total: \_\_\_\_\_ %

Exames complementares e/ou outras observações:

**RESUMOS ACEITOS PARA APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO****AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY****PCA3 GENE EXPRESSION AS BIOMARKER TO DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF BENIGN HYPERPLASIA AND PROSTATIC CANCER**

**BACKGROUND:** The Prostate Cancer (Pca) is the second most common type of cancer in men around the world. Because of the increasing numbers of cases, it is extremely important the development of a noninvasive test with high specificity and sensitivity to diagnosis cancer and other prostatic alterations. Studies showed that the gene 3 of Prostate Cancer (PCA3) presents high levels of expression in tumor tissue. High levels of PCA3 gene expression can be associated with an increased probability of positive biopsy and has arisen as a molecular marker in the diagnosis of PCa.

**OBJECTIVE:** We proposed to evaluate the the expression of PCA3 gene in urine from patients with benign hyperplasia (BPH) or prostatic cancer.

**METHODS:** The study included 33 men attended at the Clinical Hospital from Federal University of Minas Gerais (HC-UFGM) to performer a prostatic biopsy, being 13 patients with Pca, 8 with BPH and 12 patients with no alterations (controls). It was collected 30 mL of patient's urine after prostatic massage, which was immediately centrifuged. The pellet was added to RNA later® and stored for up to 24 hours, until the extraction of RNA. The samples were quantified in a spectrophotometer and submitted to treatment with DNase. After, this sample was quantified in a one-step RT-PCR for PCA3 gene and PSA/ACTB genes for control or reaction normalization.

**RESULTS:** The PCA3 gene expression was detected in 10 patients with PCa, 3 with BPH and 2 controls. For the remaining patients was not detected any gene expression. The test presented 77% of sensitivity for PCa screening and 38% for BPH. The specificity was 83% for both.

**CONCLUSIONS:** The PCA3 screening showed median sensitivity for PCa diagnosis; subsequently prostate biopsy is still considered the best standard procedure for detect prostatic alterations. Some patients with PCa no presented any expression of the PCA3 gene, which can be explained by the large number of interfering, as well as the prostate massage, the use of drugs and the high RNA degradation's rate in urine samples. It is required the standardization of these procedures and to analyze a larger number of samples in order to evaluate the importance of PCA3 gene expression in differential prostatic alterations and its use in the clinical practice.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/ MEDICINA LABORATORIAL



#### PCA3 GENE EXPRESSION AS BIOMARKER TO DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF BENIGN HYPERPLASIA AND PROSTATIC CANCER

**OBJECTIVE:** The Prostate Cancer (Pca) is the second most common type of cancer in men and it is extremely important the development of a noninvasive test with high specificity and sensitivity to diagnosis cancer and other prostatic alterations. High levels of gene 3 of Prostate Cancer (PCA3) gene expression is associated with an increased probability of positive biopsy and has arisen as a molecular marker in the diagnosis of PCa. We proposed to evaluate the expression of PCA3 gene in urine from patients with benign hyperplasia or prostatic cancer (BPH). **METHODS:** The study included 33 men - 13 patients with Pca, 8 with BPH and 12 patients with no alterations (controls). It was collected 30 mL of patient's urine after prostatic massage. This sample was quantified by RT-PCR for PCA3 gene and PSA/ACTB genes for control or reaction normalization. **RESULTS/CONCLUSIONS:** The PCA3 gene expression was detected in 10 patients with PCa, 3 with BPH and 2 controls. For the remaining patients was not detected any gene expression. The test presented 77% of sensitivity for PCa screening and 38% for BPH. The specificity was 83% for both. The PCA3 screening showed median sensitivity for PCa diagnosis; subsequently prostate biopsy is still considered the best standard procedure for detect prostatic alterations. It is required the standardization of these procedures and the analysis of a larger number of samples in order to evaluate the importance of PCA3 gene expression in differential prostatic alterations and its use in the clinical practice.