

MARCELO LUIZ BENDHACK

**DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS NO SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES COM CARCINOMA DA PRÓSTATA: RESULTADOS
PROSPECTIVOS DE MÉTODO ORIGINAL UTILIZANDO A REAÇÃO
EM CADEIA COM TRANSCRIPTASE REVERSA E POLIMERASE
PARA O ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO DE MEMBRANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial
para obtenção do Grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligoeki Campos
Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligoeki Campos

CURITIBA

2000

ERRATA

- 1 Ficha catalográfica. Onde se lê “... coms transcriptase reversa”, leia-se “... com transcriptase reversa...”.
- 2 Ficha catalográfica. Onde se lê “3.RP-PCR” leia-se “3.RT-PCR”.
- 3 Lista de abreviaturas. Onde se lê “DU145 Linha celular de células de carcinoma de próstata LNCaP” leia-se “...de próstata DU145”.
- 4 Página 6, onde se lê “(BENDHACK, 1996)”, leia-se “(BENDHACK, 1999)”.
- 5 Página 17, onde se lê “(KAWAKAMI M e NAKAYAMA et al. 1997)”, leia-se “(KAWAKAMI e NAKAYAMA, 1997).”.
- 6 Página 15, onde se lê “(COREY and COREY, 1998; GOMELLA et al., 1997; GRASSO et al., 1998; ELGAMAL et al., 2000; SU et al., 2000)”, leia-se “(GOMELLA et al., 1997; COREY e COREY, 1998; GRASSO et al., 1998; ELGAMAL et al., 2000; SU et al., 2000)”.
- 7 Página 16, onde se lê “(MONNE et al., 1994; DIAMANDIS et al., 1995; ZHARGAMI et al., 1996; LEHRER et al., 1996; CLEMENTS et al., 1994; YU et al., 1995; ZHARGAMI et al., 1997)”, leia-se “(CLEMENTS et al., 1994; MONNE et al., 1994; DIAMANDIS et al., 1995; YU et al., 1995; LEHRER et al., 1996; ZHARGAMI et al., 1996; ZHARGAMI et al., 1997)”.
- 8 Página 42, onde se lê “(HENKE et al., 1996; GALA et al., 1998; LINTULA and STENMAN, 1997; SMITH et al., 1995)”, leia-se “(SMITH et al., 1995; HENKE et al., 1996; LINTULA e STENMAN, 1997; GALA et al., 1998)”.
- 9 Página 52, onde se lê “(WYNANT et al., 1991; ABDEL-NABI et al., 1992; MAGUIRE et al., 1993; BABAIAN et al., 1994; SANFORD et al., 1994; MURPHY et al., 1995C; KAHN et al., 1994; HASEMAN et al., 1996; KAHN et al., 1998)”, leia-se “(WYNANT et al., 1991; ABDEL-NABI et al., 1992; MAGUIRE et al., 1993; BABAIAN et al., 1994; KAHN et al., 1994; SANFORD et al., 1994; MURPHY et al., 1995C; HASEMAN et al., 1996; KAHN et al., 1998)”.
- 10 Página 80, onde se lê “... pN = estadiamento relacionado ao linfonododo ...”, leia-se “... relacionado ao linfonodo ...”.

MARCELO LUIZ BENDHACK

**DETECÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS NO SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES COM CARCINOMA DA PRÓSTATA: RESULTADOS
PROSPECTIVOS DE MÉTODO ORIGINAL UTILIZANDO A REAÇÃO
EM CADEIA COM TRANSCRIPTASE REVERSA E POLIMERASE
PARA O ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO DE MEMBRANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial
para obtenção do Grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligoeki Campos
Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligoeki Campos

CURITIBA

2000

Dedico este trabalho

À minha Esposa Carolina
Aos meus filhos Gabriela e Bernardo
Aos meus pais Lilian e Donard
Aos pacientes com tumores
da Próstata, do Trato Urinário e Retroperitôneo

“The prostate is a very unusual organ in that with aging most organs atrophy, whereas the prostate gland almost invariably hypertrophies and in a very high percentage of cases develops a malignancy.”

Israeli et al., 1993

“What is required is to identify a better standard for tumor marker detection than the LNCap cell. One possibility would be to use a RNA mimic that could be incorporated into the reaction but yield a product of slightly different molecular size.”

Warren Heston, 1995

“An important task yet to be solved is to find parameters able to estimate the malignant potential of the tumor preoperatively.”

Marcelo Bendhack et al., 1997a

“Prostate cancer kills but not everyone.
How can we identify the bad actors?”

Mani Menon, 1997

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos,
Professor Titular de Cirurgia do Aparelho Digestivo, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, orientador deste trabalho,
pela disponibilidade imediata, estímulo e influência marcantes. Também pelo apoio incondicional à formação a nível de pós-graduação nesta Universidade e exemplo de comportamento ético e profissional.

Ao Prof. Dr. Donard Augusto Bendhack,
Professor Livre Docente, Chefe do Serviço de Urologia do Hospital Nossa Senhora das Graças,
pela disponibilidade imediata, estímulo e influência marcantes. O exemplo de retidão moral, comportamento ético e qualidade profissional foram fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Rolf Ackermann,
Diretor Clínico da Universidade e do Departamento de Urologia da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf, Alemanha; ex-Presidente da Sociedade Alemã de Urologia, Membro Honorário da Sociedade Norte-Americana de Urologia,
pela disponibilidade do tema e os seus múltiplos e interessantes comentários. Também pelo seu apoio incansável à realização deste estudo e exemplo de comportamento profissional.

À PhD Dra. Bettina Schmidt,
Bióloga Molecular do Departamento de Urologia da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf, Alemanha,
e à Sra. Christiane Hader, técnica do mesmo Laboratório,
pela participação dos valores obtidos e pelo trabalho em equipe, o qual foi indispensável.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha,
Professor Titular, Chefe do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná,
pelo seu importante apoio à minha formação profissional e desenvolvimento a nível de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Giocondo Villanova Artigas,
Professor Titular de Cirurgia, Chefe do Serviço de Nutrição do Hospital Nossa Senhora das Graças, ex-Chefe do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Nossa Senhora das Graças,
pelo estímulo incansável e visão de futuro, os quais sempre marcaram a sua personalidade.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia,
Professor Titular de Cirurgia do Aparelho Digestivo, vice-coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná,
pelo estímulo e apoio à formação a nível de pós-graduação nesta Universidade.

Ao Dr. Luiz Augusto Bendhack,
Mestre em Cirurgia pela Universidade Federal do Paraná, Urologista do Hospital Nossa Senhora das Graças,
pelo apoio à família durante os anos que estive no exterior, permitindo que este trabalho – dentre outras atividades – fosse realizado. Também pelas atividades profissionais em equipe.

Ao Dr. Bernardo Sobreiro,
Urologista, ex-residente do Serviço de Urologia do Hospital Nossa Sra. das Graças,
pela participação na análise estatística e pelo convívio acadêmico.

À CAPES,
pelo apoio a esta pesquisa.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS	viii
	RESUMO	x
	ABSTRACT	xi
1	INTRODUÇÃO	2
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	CÂNCER DA PRÓSTATA.....	5
2.2	MARCADORES TUMORAIS.....	6
2.3	MARCADORES TUMORAIS PARA O CARCINOMA DA PRÓSTATA.....	10
2.3.1	Antígeno Prostático Específico (PSA)	10
2.3.2	Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA).....	13
3	PACIENTES E MÉTODO	19
3.1	PACIENTES.....	19
3.2	MÉTODO.....	21
3.2.1	Determinação do PSMA.....	21
3.2.1.1	Isolamento do Ácido Ribonucleico (RNA) de Amostras de Sangue Periférico.....	21
3.2.1.2	Reação em Cadeia com Transcriptase Reversa (RT-PCR) para a Detecção do PSMA.....	22
3.2.1.3	Construção da molécula controle PSMA MIMIC.....	23
3.2.1.4	Valor de Referência e Padronização do Método.....	26
3.2.2	Determinação do PSA.....	27
3.2.3	Análise Estatística.....	28

4	RESULTADOS	30
4.1	SENSIBILIDADE DO MÉTODO RT-PCR.....	30
4.2	RESULTADOS SEM E COM PADRONIZAÇÃO (PSMA MIMIC) DA RT-PCR.....	30
4.3	DISSEMINAÇÃO HEMATOGENICA DE CÉLULAS PROSTÁTICAS PELA CIRURGIA, DETECTADA PELA RT-PCR PADRONIZADA.....	38
5	DISCUSSÃO	42
5.1	PSMA MIMIC COMO PADRÃO INTERNO.....	43
5.2	SENSIBILIDADE DO MÉTODO.....	45
5.3	VALOR DE CORTE E CÁLCULOS DO NÚMERO DE CÉLULAS NAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DA PRÓSTATA.....	46
5.4	ASSOCIAÇÃO ENTRE PSMA E CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLÓGICAS DO TUMOR.....	48
5.5	DISSEMINAÇÃO DE CÉLULAS PROSTÁTICAS DURANTE CIRURGIA.....	49
6	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	ANEXOS	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	Alfa ₁ -antiquimotripsina
AFP	Alfa-feto-proteína
AMV	Vírus da mieloblastose das aves
bp	Pares de bases
BPH	Hiperplasia benigna da próstata
DU145	Linha celular de células de carcinoma de próstata LNCaP
mAbs	Anticorpos monoclonais
β-HCG	Subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERD	Exame retal digital
GAPDH	Glicerol-aldeído-fosfato desidrogenase
LNCaP	Linha celular de células de carcinoma de próstata LNCaP
MG	Alfa ₂ -macroglobulina
NAAG	N-acetil-aspartil glutamato
PCa	Carcinoma da próstata
PLAP	Isoenzima da fosfatase alcalina placentária
PSA	Antígeno prostático específico
PSMA	Antígeno prostático específico de membrana
PSMA MIMIC	Molécula externa padronizada designada de <i>PSMA Mimicry Molecule</i>
PSP	Prostatectomia supra-púbica
R	Margem cirúrgica da peça de prostatectomia radical
R0	Margens cirúrgicas negativas da peça de prostatectomia radical
R1	Margem(ns) cirúrgica(s) positiva(s) da peça de prostatectomia radical
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro

RRP	Prostatectomia radical retropúbica
RT-PCR	Reação em cadeia com a transcriptase reversa e polimerase
SG	Soma ou <i>score</i> de Gleason
TUR-P	Ressecção trans-uretral da próstata
USTR	Ultra-sonografia trans-retal da próstata

RESUMO

As tecnologias moleculares de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e PCR-transcriptase reversa (RT-PCR) são potentes instrumentos para a investigação em medicina. Estes métodos têm sido progressivamente adaptados para o uso prático em relação à monitorização clínica dos pacientes com doenças malignas. Os objetivos do presente estudo são: detectar células cancerosas no sangue periférico de pacientes com carcinoma da próstata (PCa) localizado submetidos à prostatectomia radical através do uso da RT-PCR para o antígeno prostático específico de membrana (PSMA), demonstrar a construção da molécula PSMA MIMIC, utilizada para padronização da reação, e apresentar os resultados do método em relação aos períodos pré-, intra- e pós-operatório, relacionando-os com estágio tumoral, doença nos linfonodos, margens positivas e grau de diferenciação celular tumoral. Entre junho de 1996 a julho de 1999 foram realizadas 212 determinações do PSMA em amostras de sangue periférico de 117 pacientes e voluntários sadios, no Departamento de Urologia da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf, Laboratório de Biologia Molecular. Os resultados foram analisados de modo prospectivo. Amostras de sangue periférico foram obtidas de pacientes subdivididos em três grupos: 57 pacientes com PCa localizado, 27 pacientes com hiperplasia da próstata (BPH), e 29 pacientes do grupo controle com i) outras doenças do trato urinário exceto da próstata (n = 15) e ii) mulheres e homens (voluntários) sadios (n = 14). Outros 4 pacientes estudados apresentaram PCa metastático. Adicionalmente, amostras de sangue periférico foram obtidas no período pré-operatório (um dia antes), trinta minutos após a remoção da peça cirúrgica e duas semanas após a prostatectomia radical (RRP) de 38/57 pacientes com PCa. Amostras de sangue periférico de 19/27 pacientes com BPH submetidos à ressecção transuretral da próstata foram obtidas 30 minutos após a cirurgia. Uma molécula externa padronizada (PSMA MIMIC) foi construída para a RT-PCR para PSMA com o objetivo de avaliar estes pacientes no pré-operatório e verificar a disseminação de células no intra- e pós-operatório a partir de amostras de sangue periférico. PSMA MIMIC apresenta a mesma seqüência que o PSMA endógeno com exceção de uma deleção central de 85 bp, permitindo assim a amplificação de ambos os alvos simultaneamente. No sentido de eliminar a transcrição ilegítima de PSMA foi estabelecido o valor de corte de 560 moléculas/ml de sangue. Os sinais de PSMA endógeno de pacientes com PCa variaram entre 850 e 9.900 moléculas transcritas e corresponderam a 2 - 20 células que expressam PSMA/ml de sangue. Com este método, a taxa de falso-positivos diminuiu significativamente: somente 25% (14/57) dos pacientes com PCa, 11% (3/27) dos pacientes com BPH e 7,7% (2/27) dos controles sem doença prostática mostraram resultados positivos, se comparados com os resultados da reação sem o uso da PSMA MIMIC de 42% (24/57), 30% (8/27) e 27% (9/27) para os mesmos grupos, respectivamente. Houve associação estatisticamente significativa ($p = 0,044$) entre o grau de diferenciação tumoral (G1 versus G2 versus G3) e os resultados da PSMA RT-PCR no pré-operatório. Foram verificadas tendências de associação (estatisticamente não significativas) para o estágio tumoral. Foi identificada disseminação de células prostáticas por ocasião de

27% das TUR-Ps e 21% das RRP. Em conclusão, o uso padronizado da molécula originalmente construída PSMA MIMIC permite a aplicação do método de PSMA RT-PCR para a detecção de células prostáticas no sangue periférico, aumentando a sua especificidade. Estudos futuros deverão determinar se a disseminação de células prostáticas no sangue periférico se correlaciona com a taxa de recidiva tumoral, local e à distância, após a prostatectomia radical.

ABSTRACT

The molecular technologies of polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) are powerful tools for investigative medicine. These methods are being increasingly adapted for practical use in the clinical monitoring of patients with malignancy. In order to identify tumor cells in peripheral blood of patients with localized prostate cancer (PCa) using RT-PCR to the prostate-specific membrane antigen (PSMA), the present study shows the construction of the molecule PSMA MIMIC, the standardization of the PSMA RT-PCR and the results in the pre-, intra- and postoperative phases of patients who undergo radical prostatectomy. Additionally, the results are correlated to tumor stage, lymphnode status, positive margins and tumor grade. Between June 1996 and July 1999 a total of 212 PSMA RT-PCRs with peripheral blood samples of 117 patients and healthy volunteers were performed in the Department of Urology of the Heinrich-Heine University Düsseldorf, Molecular Biology Laboratory. The results were evaluated prospectively. Blood samples were obtained from persons divided into three groups: 57 patients with localized PCa, 27 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH), and 29 control patients with i) other urinary tract diseases but BPH and PCa ($n = 15$), and ii) healthy volunteers ($n = 14$). Other 4 patients had metastatic PCa. Additionally, blood samples were obtained in the preoperative period (one day before), within 30 minutes after and 2 weeks after radical prostatectomy (RRP) of 38/57 PCa patients. Samples were also obtained 30 minutes after transurethral resection of the prostate (TUR-P) from 19/27 BPH patients. An external standard molecule (PSMA MIMIC) was constructed for PSMA RT-PCRs in order to evaluate PCa patients preoperatively and to identify spread of cancer cells into peripheral blood in the intra- and postoperative periods. PSMA MIMIC has the same sequence as endogenous PSMA with exception of a central 85 bp deletion, allowing the amplification of both targets simultaneously. A "cut-off" value of 560 molecules/ml blood to filter for illegitimate PSMA transcription was established. Endogenous PSMA signals from patients with PCa varied between 850 and 9900 transcript molecules, corresponding to 2-20 PSMA expressing cells/ml blood. The rate of "false-positives" significantly decreased. Only 25% (14/57) of the patients with PCa, 11% (3/27) of patients with BPH and 7,7% (2/27) of the controls without prostatic disease were positive when compared to 42% (24/57), 30% (8/27) and 27% (9/27), respectively, without PSMA MIMIC. An association between tumor grade (G1 versus G2 versus G3) and the positive PSMA RT-PCR results before surgery was verified ($p = 0,044$). A tendency of association was also detected to tumor stage, although not significant. In addition, a dissemination of prostate cells during 27% of TUR-Ps and 21% of RRP was found. The use of this newly constructed external standard molecule broadens the application of PSMA RT-PCR techniques – with higher specificity – for the detection of prostatic cells spread. Further studies should determinate if disseminated prostate cancer cells in peripheral blood are related to tumor recurrence after radical prostatectomy.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer da próstata é, atualmente, a segunda neoplasia de maior prevalência entre indivíduos do sexo masculino no mundo, sendo superada apenas pelos tumores malignos do pulmão (LANDIS et al., 1999; BREWSTER et al., 2000; MAJEED et al., 2000).

Desde o estabelecimento do antígeno prostático específico (PSA) como marcador tumoral para detecção precoce do carcinoma da próstata (PCa), há cerca de 10 anos, foi verificado um aumento importante na incidência desta doença. Outra consequência foi a detecção da maioria dos tumores da próstata na fase de doença localizada e, assim sendo, passíveis de tratamento curativo pela prostatectomia radical. Assunto de pesquisa de extrema importância em relação a essa doença, ainda em desenvolvimento, é a definição de parâmetros que possam determinar o potencial de malignidade do tumor (BENDHACK et al., 1997).

Apesar da melhora em relação ao diagnóstico precoce com a introdução do PSA, há necessidade de se encontrar melhores marcadores para o PCa, sobretudo quando o valor deste marcador se encontra abaixo dos 10ng/ml. Não há, para subgrupos de pacientes com PCa e PSA entre 2 a 9 ng/ml, diferenças estatísticas com relação às taxas de cura (STAMEY, 2000). Essa falta de sensibilidade e especificidade do PSA determinou a procura, por parte dos pesquisadores, de novos métodos de diagnóstico (BEDUSCHI et al., 1998). Analisando os marcadores tumorais PSA e PSMA em estudo multicêntrico, MURPHY et al. (1995b) concluíram que PSMA apresenta o maior valor prognóstico. Ao se considerar a sensibilidade da RT-PCR para PSA e PSMA, ISRAELI et al. (1993, 1994) demonstraram resultados mais favoráveis para o PSMA.

Existe tentativa de se definir o prognóstico ou estadiamento molecular de pacientes com PCa localizado através do uso da reação da transcriptase reversa e em

cadeia com a polimerase (RT-PCR), tanto para o antígeno prostático específico de membrana (PSMA) como para o antígeno prostático específico (PSA). Experimentos neste sentido têm sido realizados, porém limitações devido à variabilidade da metodologia empregada e à falta de controles impedem comparações efetivas e conclusões definitivas. RT-PCRs confiáveis para PSA e PSMA requerem protocolos padronizados, o uso de controles internos e padrões externos como pré-requisito para métodos quantitativos (SCHMIDT et al., 1998).

O presente estudo tem como objetivos principais:

1. Descrever a construção da molécula PSMA MIMIC e a padronização da PSMA RT-PCR para avaliação de pacientes com PCa submetidos à prostatectomia radical mediante a definição de um valor de corte.
2. Comparar os resultados do método padronizado com PSMA MIMIC e sem PSMA MIMIC no período pré-operatório.
3. Apresentar os resultados do novo método em relação aos períodos intra- e pós-operatório.
4. Comparar os achados em relação ao estágio tumoral, doença nos linfonodos, margens positivas e grau de diferenciação das células tumorais com os resultados de RT-PCR para PSMA no período pré-operatório.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DA PRÓSTATA

SPAPEN et al. (2000), avaliando os resultados obtidos pelo Registro de Câncer de Rotterdam, observaram aumento no número de casos novos de carcinoma da próstata diagnosticados entre 1989 e 1995. Utilizando a população europeia como referência, a incidência do câncer da próstata em 1995 foi de aproximadamente o dobro (125:100.000 habitantes) da verificada no ano de 1989 (62:100.000 habitantes).

O carcinoma da próstata é atualmente estimado como sendo o responsável por cerca de 14% dos óbitos relacionados a câncer não cutâneo nos Estados Unidos da América (PARKER et al., 1996). Isto representa um risco de 20% para o desenvolvimento da doença durante a vida. As taxas de mortalidade ajustadas à idade revelam que o câncer da próstata causa entre 3 e 33 mortes a cada 100.000 pessoas (PARKER et al., 1996).

Os dados relacionados à incidência clínica demonstram um número imenso de indivíduos doentes. Mesmo assim, subestima-se a real prevalência desta neoplasia maligna. O aumento contínuo na incidência do câncer da próstata e óbitos relacionados significa que, apesar dos avanços na detecção precoce e tratamento, estratégias melhores precisam ser consideradas para enfrentar esta doença (EBERT e BENDHACK, 1997).

Três fatores foram considerados responsáveis pela elevação da incidência do câncer da próstata: o envelhecimento da população, com um conseqüente aumento no número de indivíduos com risco aumentado para esta neoplasia (SCARDINO et al., 1992; CATALONA et al., 1993), maior interesse da população pelo câncer da próstata, motivado pelas campanhas de prevenção (POTOSKY et al., 1995) e, o mais

importante, a dosagem do antígeno prostático específico sérico (PSA), introduzido como rotina para o diagnóstico precoce em 1987, por recomendação da *American Cancer Society* e *American Urological Association* (METLIN et al., 1993; OLSSON et al., 1994; SLAWIN et al., 1995; von ESCHENBACH et al., 1997).

Desta forma, desde que o antígeno prostático específico (PSA) foi estabelecido como marcador tumoral para detecção precoce do carcinoma da próstata, foi verificado aumento importante na incidência desta doença. Outra consequência da determinação do PSA consiste no fato de que a maioria dos tumores da próstata atualmente diagnosticados se encontram na fase de doença localizada e, assim sendo, são passíveis de tratamento curativo pela prostatectomia radical. Um assunto de extrema importância de pesquisa em relação a esta doença, ainda em desenvolvimento, é a definição de parâmetros – no período pré-operatório – que possam determinar o potencial de malignidade do tumor (BENDHACK et al., 1997).

Conceitos terapêuticos que, a exemplo de outros tumores do trato urinário e pela avaliação do risco da doença, permitam evitar um tratamento radical para pacientes com muito bom prognóstico, e que ajudem a indicar uma terapia máxima – e assim curativa – para pacientes com alto risco, são extremamente importantes (BENDHACK, 1996). Neste sentido os marcadores tumorais representam um método auxiliar indispensável.

2.2 MARCADORES TUMORAIS

Há muito tempo se procura identificar marcadores que indiquem a presença de um processo tumoral. Estas substâncias, denominadas “marcadores tumorais”, apresentam-se freqüentemente como consequência da transformação celular maligna. Elas podem ser identificadas histologicamente no tecido tumoral – marcadores celulares, p. ex., receptores hormonais do câncer da mama – ou em líquidos corporais

– marcadores humorais, p. ex., antígenos associados a tumores, hormônios e marcadores induzidos pelo tumor. A determinação de marcadores tumorais séricos representou grande desenvolvimento para a oncologia (HEISE et al., 1994).

Antígenos associados a neoplasias são produzidos pelos próprios tumores e secretados no soro. Nesta classe encontram-se, dentre outros, antígenos oncofetais como alfa-feto-proteína (AFP) e antígenos tumorais definidos por anticorpos monoclonais (mAbs) como p. ex., CA 125. Também determinados hormônios como a subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana (β -hCG) podem ser produzidos em grande concentração pelo tecido tumoral de células germinativas (HEISE et al., 1994), e enzimas tais como as isoenzimas da fosfatase alcalina placentária (PLAP) pelas neoplasias de células germinativas do testículo, especialmente os seminomas (BENDHACK, 1999a; BENDHACK, 1999b).

Os marcadores tumorais não são, com poucas exceções, específicos de determinados órgãos. Todavia se conseguiu, por meio da introdução de novos marcadores tumorais definidos por anticorpos, melhorar a especificidade em relação ao órgão (HEISE et al., 1994). Por meio da determinação quantitativa com técnicas radioimunológicas verificou-se que a sensibilidade depende da pureza do marcador tumoral em questão – AFP e β -hCG, enquanto que a especificidade depende da qualidade dos anticorpos (ACKERMANN, 1979).

Idealmente os marcadores tumorais deveriam apresentar as seguintes propriedades (HEISE et al., 1994):

- 1- 100 % de diferenciação entre indivíduos sãos e doentes;
- 2- definição de todos os pacientes com tumor, se possível em estágio inicial;
- 3- especificidade em relação ao órgão envolvido, permitindo assim identificação da localização do tumor;
- 4- correlação entre a magnitude de elevação do marcador livre circulante no soro com o estágio tumoral próprio;

- 5- indicação de todas as alterações da evolução do processo quando sob terapia e seguimento;
- 6- informações prognósticas relacionadas ao grau de elevação do marcador.

Caso as duas primeiras condições se façam presentes, a utilização do marcador em questão durante um processo de detecção precoce em pessoas sadias, também conhecido como *screening*, seria possível e racional. Sendo a gênese tumoral muito complexa, provavelmente tal marcador tumoral não exista.

A determinação de marcadores tumorais auxilia a definir condutas terapêuticas precocemente, não sendo, no entanto, adequados para *screening*. Assim, necessitam ser consideradas em associação com outros achados de exames e com a evolução clínica da doença (MANN, 1990).

No entanto, alguns marcadores tumorais são utilizados atualmente para o controle de pacientes considerados como membros de grupos de risco. Isto é especialmente válido para o antígeno prostático específico (PSA), cuja determinação é sugerida para homens com idade superior a 45 anos para o diagnóstico precoce do carcinoma da próstata (CARTER e PARTIN, 1998). O PSA determinado de rotina além de aumentar a detecção do carcinoma prostático mais que o exame dígito-retal, também aumenta o valor preditivo positivo do exame retal e eleva a taxa de detecção de carcinomas restritos ao órgão e significantes em termos de tamanho e diferenciação (CARTER e PARTIN, 1998). Ele é caracterizado por sensibilidade satisfatória (probabilidade do teste ser positivo quando da presença de um tumor, isto é, verdadeiro positivo) e especificidade (frequência de verdadeiros negativos entre indivíduos sadios). O método mais eficiente para a detecção desta doença é, no entanto, a associação do exame dígito-retal e a dosagem do PSA, no sentido de determinar o risco da presença da doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 1998).

Um fator fundamental para o uso adequado de marcadores tumorais é a consequência terapêutica que o resultado anormal deste exame pode causar. Neste contexto, parâmetros que possam indicar a evolução da doença e precocemente apontar com segurança uma recidiva são de grande importância (MANN, 1990). Marcadores tumorais freqüentemente definem recidivas e/ou metástases mais precocemente do que métodos de imagem. Esta diferença de tempo se encontra, em média, na ordem de 3 a 6 meses e pode ser, em casos particulares, até maior do que um ano (HEISE et al., 1994). Através da determinação de marcadores tumorais se permite definir melhor o estágio clínico da doença (BURT e JAVADPOUR, 1981).

A taxa de redução pós-operatória de um marcador sérico (tempo de meia vida biológica) auxilia a definir se houve a retirada completa do tumor mediante a cirurgia (HEISE et al., 1994). O tempo de meia vida do PSA é calculado em 1.6 dias (SEMJONOW et al., 1994). Devido, no entanto, a um padrão bifásico de declínio na sua concentração, alguns autores afirmam que a determinação do PSA antes de 30 dias após a prostatectomia radical não permitiria uma conclusão acerca da presença ou ausência de doença residual (VAN STRAALEN et al., 1994). Os órgãos associados à eliminação das diferentes formas moleculares do PSA são o fígado e o rim (BIRKENMEIER et al., 1999).

A elevação dos valores pré-operatórios, isto é, uma nova elevação da concentração do marcador após o tratamento apresenta, para certos marcadores, valor prognóstico. Especialmente no seguimento dos pacientes, um novo aumento ou a permanência de valores elevados está intimamente relacionado ao prognóstico. Os valores preditivos positivo e negativo se apresentam, nessa situação, como parâmetros importantes para interpretação dos resultados (HEISE et al., 1994).

Recentemente, progressos na citogenética e biologia molecular permitiram estudos sobre a carcinogênese, progressão tumoral e desenvolvimento de metástases no nível de genes específicos (ACKERMANN e SCHMITZ-DRÄGER, 1994).

2.3 MARCADORES TUMORAIS PARA O CARCINOMA DA PRÓSTATA

2.3.1 Antígeno Prostático Específico (PSA)

O antígeno prostático específico (PSA) é uma proteína sérica, produzida pelo epitélio prostático e pelas glândulas periuretrais do homem, tendo sido primeiramente identificado no líquido seminal por HARA et al. (1971). Dois anos mais tarde LI e BELING (1973), determinaram o peso molecular do PSA (30.000 Daltons) e descreveram as suas características na eletroforese. Em 1979, o PSA foi isolado no tecido prostático por WANG et al. No ano seguinte, esse mesmo grupo de investigadores relataram a presença do PSA no soro de pacientes com câncer da próstata (PAPSIDERO et al., 1980). O gene para o PSA está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q), e a seqüência do seu DNA foi determinada por LUNDWALL e LILJA (1987).

O PSA é secretado no líquido seminal em altas concentrações [0,24 mg/ml a 5,5 mg/ml] (SENSABAUGH, 1978) e sua função é liquefazer o coágulo seminal (LILJA, 1985; McGEE e HERR, 1988). No soro, o PSA é encontrado normalmente em concentrações muito menores (ng/ml) e possui duas formas moleculares: livre e ligado às antiproteases plasmáticas alfa₁-antiquimotripsina e alfa₂-macroglobulina (CHRISTENSSON et al., 1990; LILJA et al., 1991; STENMANN et al., 1991).

A concentração das antiproteases no soro é muito superior à do PSA. Portanto, todo o PSA enzimaticamente ativo deverá formar complexos com as antiproteases, principalmente a alfa₂-macroglobulina (MG). A ligação do PSA à alfa₁-antiquimotripsina (ACT) inativa a ação proteolítica do PSA, mas o complexo PSA-ACT permanece imunodetectável. Por outro lado, o complexo PSA-MG não cessa

totalmente a atividade de protease do PSA, porém não é detectável imunologicamente (CHRISTENSSON et al., 1990).

A forma livre do PSA, sem ação proteolítica, provavelmente é mantida inativa dentro das células epiteliais até ser liberada no soro. Esta forma livre não constitui complexos com as antiproteases e é imunodetectável (LILJA et al., 1991). Assim, a forma livre do PSA e o complexo PSA-ACT são imunodetectáveis e representam o PSA sérico total determinado pelos métodos atualmente disponíveis.

Alterações da arquitetura normal da próstata podem levar à liberação do PSA das células epiteliais para o estroma prostático, permitindo que o PSA tenha acesso à corrente sanguínea, determinando elevações na sua concentração plasmática. Isto pode ocorrer em situações como manipulação prostática por biópsia ou massagem (STAMEY et al., 1987) e presença de doença prostática, como hiperplasia benigna, câncer ou prostatite (WANG et al., 1981; ERCOLE et al., 1987; ROBLES et al., 1988).

Desta forma, um valor elevado do PSA sérico é indicativo da presença de doença prostática, não necessariamente câncer. Além disso, nem todos os pacientes com neoplasia maligna da próstata possuem PSA elevado.

Inicialmente, acreditou-se que o PSA não seria útil como marcador para o câncer da próstata, em virtude da sua baixa especificidade. Os primeiros estudos indicaram que 21 a 86% dos indivíduos com hiperplasia prostática benigna (BPH) possuíam PSA elevado (STAMEY et al., 1987; OESTERLING et al., 1988; HUDSON et al., 1989). Contudo, em diversos trabalhos posteriores foi demonstrada a associação entre os níveis séricos do PSA e o risco para a presença de câncer da próstata (CATALONA et al., 1991; LABRIE et al., 1992; STONE et al., 1994; GANN et al., 1995).

A avaliação dos métodos de detecção do câncer da próstata demonstrou que o PSA, como teste isolado, possuía o mais alto valor preditivo positivo. Uma proporção bem maior de pacientes com PSA elevado apresentou câncer na biópsia prostática em comparação a pacientes com exame retal digital (ERD) alterado ou ultra-sonografia trans-retal da próstata (USTR) sugestiva para neoplasia (CATALONA et al., 1994; ELLIS et al., 1994; STONE et al., 1994). Além disso, o ERD e a USTR são dependentes do examinador enquanto o PSA é uma medida objetiva do risco para câncer.

O risco para neoplasia maligna da próstata é diretamente proporcional ao nível do PSA (COONER et al., 1990). A chance de detecção de câncer na biópsia prostática é de 1:50 em pacientes com PSA abaixo de 4 ng/ml (LABRIE et al., 1992); 1:4 para PSA entre 4 e 10 ng/ml e 1:2 quando o PSA for superior a 10 ng/ml (BRAWER et al., 1992; CATALONA et al., 1994; STONE et al., 1994; LITTRUP et al., 1994).

Embora o PSA possua o mais alto valor preditivo positivo para câncer da próstata, o seu uso isolado não é recomendado, uma vez que cerca de 25% dos pacientes com carcinoma prostático possuem PSA < 4 ng/ml. O método mais eficaz de detecção precoce do câncer da próstata é o emprego conjunto do ERD e dosagem do PSA sérico (CATALONA et al., 1994; LITTRUP et al., 1994; STONE et al., 1994).

OESTERLING et al. (1993) descreveram sobre o ajuste do PSA em relação à idade do paciente. BABAIAN et al. (1990) e LITTRUP et al. (1991) propuseram o emprego da densidade do PSA, calculada pela razão entre PSA sérico e volume prostático. CARTER et al. (1992), e SMITH e CATALONA (1994) defenderam a avaliação dos níveis do PSA sérico ao longo do tempo, conhecido como velocidade do PSA. Com o surgimento de métodos que permitem determinar a concentração de cada forma molecular do PSA (livre ou conjugada com ACT), PARTIN et al. (1995),

CATALONA et al. (1995) e LUDERER et al. (1995) têm estudado a relação PSA livre/total como meio de aumentar a especificidade do PSA.

A introdução do antígeno prostático específico, na rotina de detecção precoce do câncer da próstata, não teve como consequência apenas o aumento na incidência da doença. O tempo necessário para o diagnóstico foi reduzido de maneira significativa, o que foi confirmado por meio de estudos longitudinais onde o PSA foi determinado a partir de amostras de plasma congelado anos antes do diagnóstico de câncer da próstata. Dados do *Baltimore Longitudinal Study of Aging* (SHOCK et al., 1984), demonstraram que indivíduos com carcinoma prostático apresentavam alteração do PSA cerca de 4 anos antes do diagnóstico. Resultados similares foram encontrados por GANN et al. (1995), onde elevações do PSA foram percebidas 5,5 anos antes do diagnóstico de neoplasia prostática. Em estudo similar, utilizando amostras de plasma congelado, TIBBLIN et al. (1995) demonstraram que um PSA > 4 ng/ml estava associado a um risco 20 vezes maior para câncer da próstata seis anos após o plasma ter sido colhido e armazenado.

Portanto, a utilização do PSA como método de diagnóstico precoce, parece resultar em uma identificação do câncer prostático em um momento mais precoce de sua evolução natural.

2.3.2 Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA)

O antígeno prostático específico de membrana (PSMA) é um potencial marcador para o diagnóstico inicial e exato estadiamento do carcinoma da próstata, assim como auxílio na definição de tratamento e no acompanhamento desses pacientes (HOROSZEWICZ et al., 1987; ISRAELI et al., 1993).

O PSMA é uma proteína transmembrana do tipo 2, composta por 750 aminoácidos, com peso molecular de 100 kDa, presente na superfície de células epiteliais da próstata e com atividade de hidrólise do folato e NAALAdase. A expressão de PSMA encontra-se aumentada em associação com o câncer da próstata e nos vasos sanguíneos de muitos tumores sólidos (WRIGHT et al., 1996A; KAWAKAMI e NAKAYAMA, 1997, O'KEEFE et al., 1998). O gene do PSMA consiste de 19 exons, compreendendo aproximadamente 60kb do DNA genômico. A localização do gene que codifica o PSMA é 11p11-p12, todavia um gene homólogo mas não idêntico ao PSMA existe no cromossoma 11q14 (O'KEEFE et al., 1998).

O PSMA foi originalmente definido pelo anticorpo monoclonal 7E11.C5 e tem sido descrito como portador de grande especificidade à próstata (HOROSZEWICZ et al., 1987; LOPES et al., 1990; ROSENSTROUS et al., 1990; ISRAELI et al., 1994B; TROYER et al., 1995; KAWAKAMI e NAKAYAMA, 1997; SILVER et al., 1997), porém expressão mínima tem sido observada no cérebro, glândulas salivares e intestino delgado através de estudos de expressão proteica e genética (HOROSZEWICZ et al., 1987; LOPES et al., 1990; ROSENSTROUS et al., 1990; ISRAELI et al., 1994B; TROYER et al., 1995; KAWAKAMI e NAKAYAMA, 1997; SILVER et al., 1997).

O PSMA está aumentado no soro de pacientes com carcinoma da próstata. Isto foi verificado através da determinação da reatividade com o anticorpo 7E11.C5 por métodos imunoabsorventes ligados à enzimas (ELISA) e análise com *Western blot* (ROCHON et al., 1994; MURPHY et al., 1995A; MURPHY et al., 1995B; MURPHY et al., 1996A). A sua expressão aumentada é encontrada em associação com a progressão e no carcinoma prostático hormônio refratário (WRIGHT et al., 1996a; KAWAKAMI e NAKAYAMA, 1997).

2.3.2.1 PSMA e Métodos de Determinação

A detecção de células prostáticas no sangue periférico e nos linfonodos baseada na expressão de genes específicos da próstata representa um conceito emergente. Isto estimulou muitos investigadores a analisar o potencial da tecnologia associado à reação em cadeia com transcriptase reversa e polimerase (RT-PCR), recentemente resumido por alguns autores (COREY and COREY, 1998; GOMELLA et al., 1997; GRASSO et al., 1998; ELGAMAL et al., 2000; SU et al., 2000).

Desde a introdução dos experimentos com RT-PCR com *primers* específicos para PSA (MORENO et al. 1992) e PSMA (ISRAELI et al., 1994a), uma série de estudos foram realizados para a detecção de células prostáticas cancerosas no sangue periférico e para a detecção de micrometástases em linfonodos (DEGUCCI et al., 1993). A maior parte deles correlacionaram os resultados com achados clínicos, tais como penetração capsular, margens cirúrgicas positivas, estágio patológico (KATZ et al. 1994, GHOSSEIN et al. 1995), tempo livre de doença e falha após tratamento com prostatectomia radical retropúbica (RRP) (OLSSON et al., 1996).

Foi estimado que grande número de células tumorais circulantes (acima de 10.000 células num homem de 70 Kg) seria necessário no sentido de permitir a sobrevivência de uma pequena percentagem destas (menos que 0,01%) e assim o desenvolvimento de uma metástase (LIOTTA et al., 1991; MORENO et al., 1992). Embora células prostáticas circulantes freqüentemente sejam encontradas em pacientes com PCa metastático, quando as mesmas são detectadas em pacientes com PCa localizado, elas podem não possuir o verdadeiro potencial metastático e, desta forma, não deveriam ser classificadas como micrometástases (OLSSON e BUTTYAN, 1998).

Todavia, mesmo após cinco anos do início destas análises, os resultados relacionados aos dados clínicos variam significativamente devido ao uso de protocolos diversos e não padronizados (KATZ et al. 1994, GHOSSEIN et al. 1995, LORIC et al. 1995, OLSSON et al., 1996, SOKOLOFF et al. 1996). A maior parte

destes estudos difere com relação aos *primers* e protocolos, impossibilitando assim comparações entre os mesmos. Adicionalmente, a sensibilidade extremamente elevada dos experimentos com RT-PCR apresenta o risco de sinais “falso-positivos” e dificulta significativamente o uso da tecnologia de RT-PCR.

CHELLY e colaboradores (1989) foram os primeiros a descrever os sinais “falso positivos” como conseqüência da transcrição ilegítima, também designada como transcrição basal, a qual se refere à transcrição de genes tecido-específicos em tecidos não específicos. Este fenômeno é uma conseqüência do silenciamento incompleto de genes tecido-específicos devido a uma metilação incompleta das ilhas CpG nas regiões promotoras destes genes. Assim, resultados “falsos positivos” em RT-PCRs para PSA e PSMA são responsáveis pela expressão de genes prostático específicos em células e tecidos não prostáticos. Alguns autores descreveram um baixo nível de transcrição de PSA no sangue de indivíduos normais dos sexo feminino e masculino, em tecidos humanos normais e tumorais (mama, pulmão, endométrio, ovário) (MONNE et al., 1994; DIAMANDIS et al., 1995; ZHARGAMI et al., 1996; LEHRER et al., 1996; CLEMENTS et al., 1994; YU et al., 1995; ZHARGAMI et al., 1997), bem como em leucócitos (O'HARA et al., 1996; HENKE et al., 1996; HENKE et al., 1997). Resultados semelhantes têm sido demonstrados para PSMA em sangue normal, em linhas celulares de carcinoma de ovário, leucemia e mieloma múltiplo (HENTTU et al., 1996). LINTULA e STENMAN (1997) detectaram expressão básica bastante elevada até mesmo na fração leucocitária de sangue periférico de voluntários sadios.

A maioria dos métodos de RT-PCR utilizados atualmente são baseados na amplificação do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) do PSA, devido à especificidade notavelmente maior, se comparada com aquela do PSMA. Todavia, há uma forte redução da expressão do PSA em resposta aos tratamentos de ablação hormonal, verificado por exemplo para células da linha celular LNCaP (HENTTU et al., 1992). Pacientes com PCa submetidos a esse tratamento têm uma redução da

transcrição de PSA, e assim a possibilidade de detecção de células prostáticas se encontra reduzida. Em contraste, a expressão do gene do PSMA é extremamente aumentada durante esta mesma forma de tratamento (WRIGHT et al., 1996A; WRIGHT et al., 1996B; FAIR et al., 1997), tornando a RT-PCR para PSMA o método de escolha para controlar o resultado de tratamento em pacientes com tratamento hormonal. Adicionalmente, a expressão elevada de PSMA em células cancerosas metastáticas (KAWAKAMI M e NAKAYAMA et al. 1997) poderia se relacionar a um grande potencial para o diagnóstico de câncer da próstata.

Este estudo tem por objetivo apresentar a construção e o uso de uma molécula externa padronizada para definir a sensibilidade e especificidade da detecção de células prostáticas no sangue periférico através do marcador tumoral PSMA com o uso da RT-PCR em pacientes submetidos a tratamento do carcinoma da próstata. Esta molécula, designada de PSMA Mimicry Molecule (PSMA MIMIC), e que serve para aumentar a especificidade do método através da sua padronização e adição à reação, foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Urologia da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf, Alemanha. PSMA MIMIC tem aproximadamente as mesmas características de amplificação do PSMA endógeno, i.é, dos pacientes, e após a adição externa de PSMA MIMIC às amostras de sangue dos pacientes, ambas podem ser analisadas na mesma reação, o que permitiria o estabelecimento de um valor de referência para filtrar a transcrição basal, a eliminação de resultados “falso positivos” e uma análise quantitativa do método de PSMA RT-PCR.

3 PACIENTES E MÉTODO

3 PACIENTES E MÉTODO

3.1 PACIENTES

Entre junho de 1996 a julho de 1999 foram realizadas 212 determinações do PSMA em amostras de sangue periférico de 117 pessoas, pacientes e voluntários sadios (tabela 1), no Departamento de Urologia da Universidade Heinrich-Heine de Düsseldorf, Laboratório de Biologia Molecular. Os resultados foram analisados de modo prospectivo.

TABELA 1 – DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES

Diagnóstico	Número de pacientes (n)
Doença maligna da próstata	61
Carcinoma da próstata localizado	57
Carcinoma da próstata metastático	4
Hiperplasia da próstata	27
Outras doenças do trato urinário	15
Voluntários sadios	14
Total	117

Todos os pacientes com doença maligna da próstata foram submetidos aos exames de rotina do Departamento, não relevantes para o presente estudo.

A média de idade dos homens com PCa localizado foi de 64,2 anos, enquanto que para os pacientes com BPH a média foi de 63,2 anos (tabela 2). A média de idade dos voluntários sadios e pacientes com doenças do trato urinário exceto da próstata foi de 41,7 anos (limites de 25 a 62 anos).

O valor médio do PSA sérico dos pacientes submetidos à prostatectomia radical foi de 8,9 ng/ml (limites de 0,13 ng/ml e 96,5 ng/ml).

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO POR IDADE DOS PACIENTES SUBMETIDOS À PROSTATECTOMIA RADICAL E RESSECÇÃO TRANS-URETRAL DA PRÓSTATA

Idade	Idade (anos)	Idade (anos)
	PCa	BPH
Mínima	53	54
Máxima	74	74
Média	64,2	63,2

PCa = carcinoma da próstata; BPH = hiperplasia benigna da próstata.

Para interpretação dos resultados, os pacientes foram subdivididos em três grupos principais:

- 1 57 pacientes com carcinoma da próstata (PCa, n = 57),
- 2 27 pacientes com doença benigna, hiperplasia da próstata (BPH, n = 27), e
- 3 14 mulheres e homens (voluntários) sadios e 15 pacientes com doenças do trato urinário exceto da próstata (n = 29). Este grupo foi denominado de controle.

Outros 4 pacientes com PCa metastático forneceram amostras que serviram para comparação entre os resultados do método antes e após a padronização com MIMIC.

Adicionalmente, amostras de sangue periférico foram obtidas no período pré-operatório (um dia antes) de 38/57 pacientes com carcinoma da próstata, trinta

minutos após a remoção da peça cirúrgica por ocasião da prostatectomia radical e duas semanas após a cirurgia. Amostras de sangue periférico de 19/27 pacientes com BPH submetidos à ressecção transuretral da próstata foram obtidas 30 minutos após a cirurgia. Todas as amostras foram armazenadas a 4°C pelo período máximo de 18 horas ou foram submetidas imediatamente ao procedimento de isolamento do ácido ribonucleico (RNA).

As linhas celulares LNCaP e DU-145 foram obtidas da *American Type Culture Collection*. Informações com relação ao estabelecimento e características destas linhas celulares foram previamente publicadas (HOROSZEWICZ et al., 1983; STONE et al., 1978).

3.2 MÉTODO

3.2.1 Determinação do PSMA

3.2.1.1 Isolamento do Ácido Ribonucleico (RNA) de Amostras de Sangue Periférico

Leucócitos sanguíneos intactos do sangue periférico de amostra de 2 ml de sangue venoso foram isolados após a lise dos eritrócitos com tampão hipotônico (tampão hipotônico para eritrócitos ELB, Qiagen, Hilden, Alemanha) por 3 ciclos de centrifugação (10 minutos a 400g e 4°C). Os leucócitos foram armazenados a -70°C ou submetidos imediatamente à extração do RNA utilizando-se o *RNA Blood Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Cada amostra de RNA foi quantificada por espectroscopia, de 340 nm a 210 nm (UviKon 900, Kontron Instruments, Neufarn, Germany).

3.2.1.2 Reação em Cadeia com Transcriptase Reversa (RT-PCR) para a Detecção do PSMA

Foram utilizados 2 μg de RNA total para a síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) utilizando AMV (vírus da mieloblastose das aves) transcriptase reversa (Promega, Madison, Estados Unidos da América) e oligo (dT)-*primers* (Sigma, St- Louis, E.U.A.). Foi realizado um método semi-quantitativo de PCR para PSMA, utilizando-se glicerol-aldeído-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle interno. *Primers* para *nested* PSMA PCR [par do *primer* externo: P3 e P4 (647 bp); par do *primer* interno: P5 e P6 (234 bp) (ver figura 1)] e GAPDH (379 bp) foram utilizados com descrito previamente (ISRAELI et al., 1994a; SCHOENFELD et al., 1994).

No sentido de aumentar a especificidade foi desenvolvido um método específico de *nested* PCR para PSMA. Um décimo do cDNA foi utilizado diretamente para a amplificação da PCR. Para amplificar PSMA e PSMA MIMIC, ambas as reações de *nested* PCR utilizando os *primers* externo e interno se fizeram num período inicial de 5 minutos de denaturação a 96°C e 5 minutos de recozimento a 62°C. Foram utilizados dezoito ciclos de polimerização, denaturação e recozimento por 90 segundos a 72°C, 30 segundos a 96°C e 45 segundos a 62°C. Os produtos da PCR foram marcados durante os ciclos de PCR utilizando-se uma U-DNA polimerase (DynaZyme, Biometra, Göttingen, Alemanha) por reação através da incorporação de 2.6 μM dUTP marcada com digoxigenina e 50 μM dNTPs. O gene *house-keeping* GAPDH foi simultaneamente amplificado servindo como controle interno de qualidade e quantidade de RNA, transcrição reversa, síntese de cDNA e PCR. Após a separação de um décimo do volume da reação de PCR em gel de agarose a 1.6%, os produtos de PCR foram transferidos para uma membrana de nylon N⁺ (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). A quantificação da expressão de

PSMA foi realizada usando o sistema hipersensível com digoxigenina (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha) e detecção por quimioluminescência em “ECL-Hyperfilm” (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). Embora a quantificação dos resultados de RT-PCR seja possível (ver exemplos em resultados), no presente estudo a determinação se os mesmos são positivos ou negativos é considerada mais importante. Cada reação de PCR foi repetida no mínimo 2 vezes.

3.2.1.3 Construção da Molécula Controle PSMA MIMIC

A molécula artificial PSMA MIMIC foi construída como esquematizado na figura 1. Na primeira etapa, PSMA endógeno de um linfonodo de paciente com metástase linfática foi amplificado usando *primers* P1 (5'-CAGCACCACCAGATAGCAGC-3') e P2 (5'-CGACAATCAAAAGGGAGCAC-3') resultando em produto de 883 bp. *Primers* foram designados utilizando o programa OLIGO versão 4.0. O perfil de amplificação foi idêntico àquele mencionado acima com exceção de que o número de ciclos foi de 35. O produto resultante da PCR foi usado para a construção da PSMA MIMIC pela realização de deleção de 85 bp utilizando 10 U de enzimas de restrição *AccI* e *NspI* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), cada uma delas sendo ativadas em duas fases subseqüentes de incubação a 37°C por 2 horas. As duas partes resultantes da molécula foram tratadas com polimerase T4 DNA (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) por 20 minutos à temperatura ambiente. Ligação subseqüente com ligase T4 DNA (*Ready to Go T4 DNA Ligase Kit*; Pharmacia, Reino Unido) por uma hora à temperatura ambiente resultou na molécula PSMA MIMIC de 798 bp. O produto de ligação foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e retirado do mesmo (gel) utilizando-se o *Qiagen Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden; Alemanha). Após amplificação seqüencial utilizando os *primers* P1 e P2 (ver acima), o produto da PSMA MIMIC PCR foi novamente purificado utilizando-se do *Qiagen PCR Purification KIT* (Qiagen, Hilden; Alemanha) de acordo com o protocolo do

fabricante. A PSMA MIMIC foi submetida a seqüenciamento, e ambos, a seqüência de PSMA e a base de 85 bp deletada, puderam ser observadas.

O uso de um par de *primer* externo P3 and P4 na primeira reação da *nested* PCR resultou na produção da PSMA MIMIC de 562 bp, o uso de um par de *primer* interno P5 e P6 na segunda fase da PSMA MIMIC PCR resultou num produto de 149 bp (figura 1). Esse produto da PSMA MIMIC PCR é novamente 85 bp menor que o PSMA endógeno e pode ser claramente separado por meio de eletroforese em gel (figura 2).

FIGURA 1 – CONSTRUÇÃO DA MOLÉCULA PSMA MIMIC. LOCAIS DE RESTRIÇÃO PARA AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO NSP I E ACC I E LOCAIS DE LIGAÇÃO PARA OS PARES DE PRIMERS P1/P2, P3/P4 E P5/P6 SE ENCONTRAM INDICADOS. OS COMPRIMENTOS DE FRAGMENTOS RESULTANTES DA PCR ESTÃO TAMBÉM APRESENTADOS

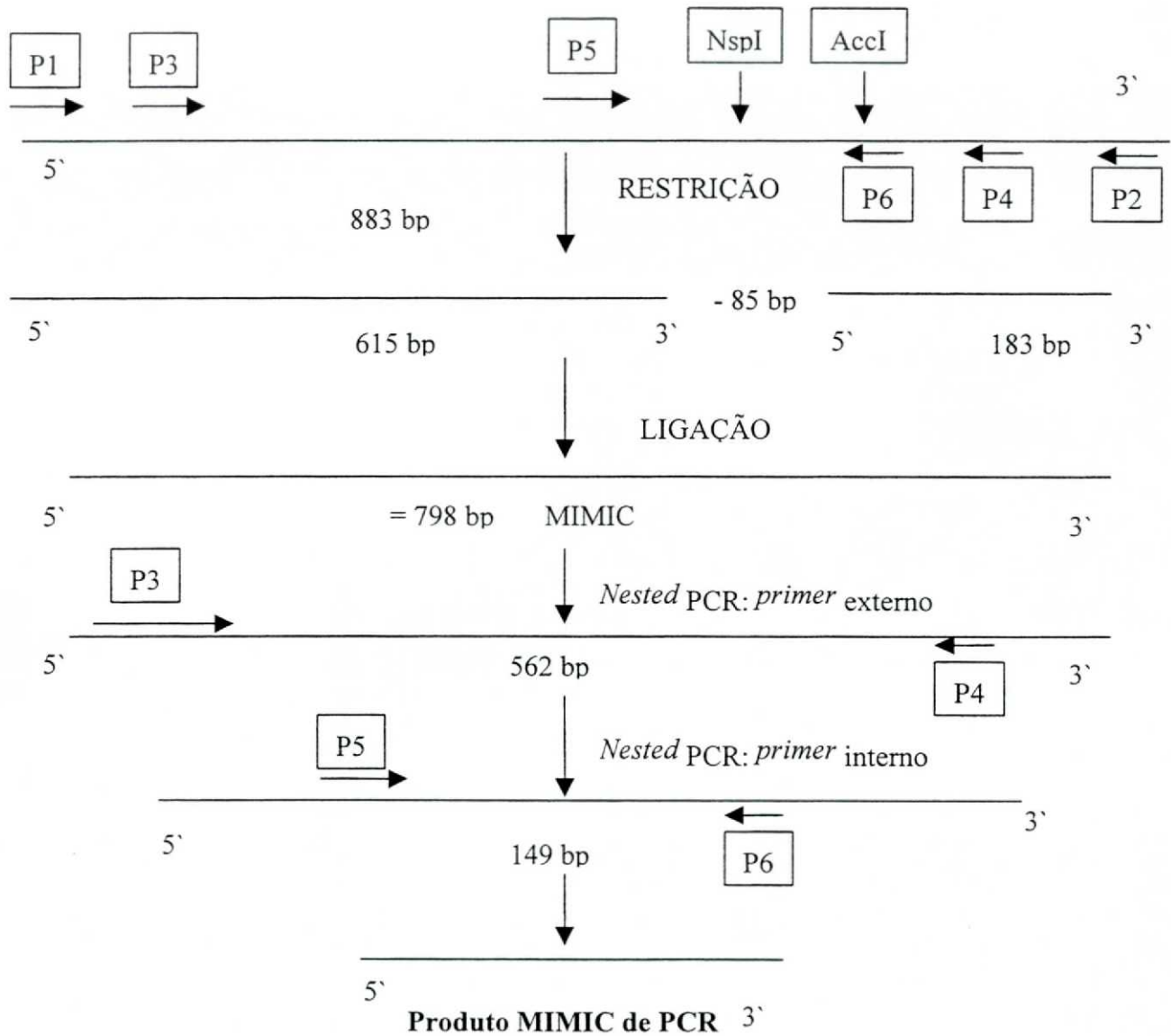
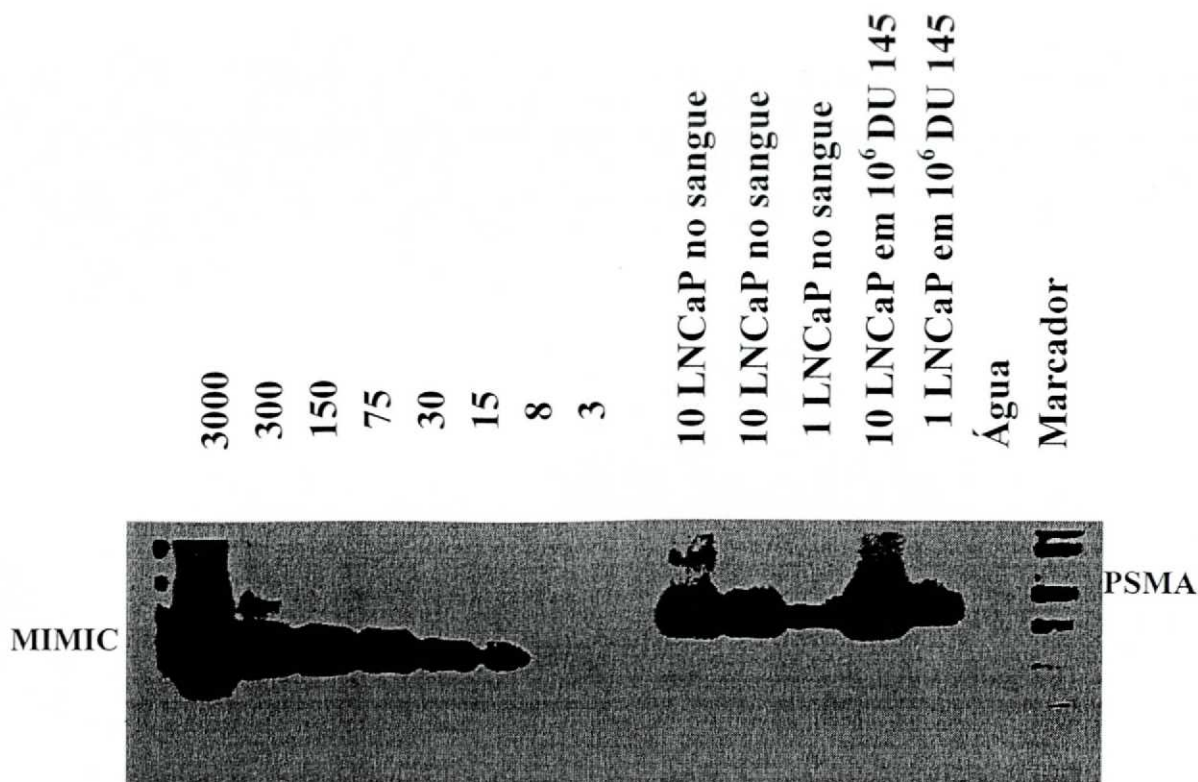


FIGURA 2 - *NESTED* RT-PCR PARA DEMONSTRAR O LIMITE INFERIOR DE DETECÇÃO DA MOLÉCULA PSMA MIMIC, INDICADA COMO O NÚMERO DE MIMICS ADICIONADA À REAÇÃO DE PCR (ESQUERDA). O LIMITE DE DETECÇÃO PARA O PSMA ENDÓGENO FOI DETERMINADO PELA ADIÇÃO EXTERNA DE 1 E 10 CÉLULAS LNCaP EXPRESSORAS DE PSMA ÀS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO E À LINHA CELULAR DU 145, A QUAL NÃO EXPRESSA PSMA (DIREITA)



3.2.1.4 Valor de Referência e Padronização do Método

As amostras de sangue de indivíduos sadios foram utilizadas para determinar o valor de referência. Para a determinação desse valor reações de RT-PCR para PSMA foram realizadas, às quais se adicionaram moléculas de PSMA MIMIC externas em quantidades definidas. Pela comparação de sinais (positivos e fracos) de PSMA RT-PCR de 4/14 indivíduos sadios do grupo controle com os sinais de quantidades definidas de PSMA MIMIC, foi estabelecido o valor de referência de 60 moléculas

de PSMA MIMIC por reação, o que corresponde a 560 moléculas/ml do sangue periférico.

Vinte moléculas de PSMA MIMIC adicionadas a cada reação de PCR mostraram o mesmo sinal que 1/25 de 1 ml de sangue de voluntários sadios acrescidos de uma célula LNCaP (ver figura 2). O PSMA endógeno (dos pacientes) foi calculado ao se utilizar este valor de conversão. Os sinais fortes de PSMA dos pacientes foram comparáveis aos sinais resultantes de 34 - 400 PSMA MIMICs adicionadas à reação de PCR e corresponderam a 850 - 9900 moléculas/ml de sangue e 1.7 - 20 células LNCaP /ml de sangue (ver resultados, figura 3 e tabela A1 - anexos). A transcrição ilegítima dos pacientes negativos e controles sadios variou entre zero e 575 correspondendo a um sinal (fraco) de no máximo 0 - 1 célula da próstata/ml de sangue.

Assim foram estabelecidas as definições de:

- 1 sinal fraco = resultado de RT-PCR correspondente de zero a 575 moléculas PSMA MIMIC/ml de sangue ou sinal de no máximo 1 célula da próstata/ml de sangue; e
- 2 sinal forte = resultado de RT-PCR correspondente a 34 - 400 PSMA MIMICs adicionadas à reação de PCR ou 850 - 9900 moléculas/ml de sangue, ou 1.7 - 20 células LNCaP /ml de sangue

3.2.2 Determinação do PSA

Para a determinação do PSA foi utilizado o método “Elecsys PSA” de acordo com a descrição do fabricante (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha).

3.2.3 Análise Estatística

BANCO DE DADOS

Todas as informações foram armazenadas em arquivo estruturado com auxílio do programa EXCEL® 1997 (MICROSOFT, E.U.A.).

TESTE APLICADO

Para análise de associação dos resultados de PSMA no período pré-operatório e estadiamento patológico, margem cirúrgica, metástase para linfonodos e grau de diferenciação das células tumorais foi aplicado o teste de Qui-quadrado.

DEFINIÇÃO DO VALOR DO ERRO ALFA (α)

O nível de significância estabelecido para a não aceitação da hipótese nula (H_0) foi de 5%.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 SENSIBILIDADE DO MÉTODO RT-PCR

Para o PSMA endógeno foi detectada uma única célula LNCaP (linha celular prostática sendo positiva para PSMA) para um excesso de 1×10^6 células de DU 145 (linha celular prostática sendo negativa para PSMA) (figura 2). Foi possível realizar a detecção de uma célula LNCaP após a adição para 2ml de sangue periférico (1×10^7 leucócitos). O limite mínimo de detecção para a molécula PSMA MIMIC foi de oito moléculas simples para cada reação (figura 2). Uma célula LNCaP em 1ml de sangue apresentou o mesmo sinal do que 20 moléculas PSMA MIMIC purificadas. Todavia, analisando uma célula LNCaP adicionada a 1×10^6 células DU145, o sinal de PSMA atingiu a mesma intensidade do que 75 moléculas PSMA MIMIC.

4.2 RESULTADOS SEM E COM PADRONIZAÇÃO (PSMA MIMIC) DA RT-PCR

Para as reações de PSMA RT-PCR sem o uso da molécula PSMA MIMIC, 42% (24/57) dos pacientes com PCa localizado foram positivos para PSMA (tabela 3). Todavia, 30% (8/27) dos pacientes com hiperplasia benigna da próstata (BPH) e 33% (9/27) dos indivíduos do grupo controle foram positivos para PSMA.

Três de 8 indivíduos sadios do sexo masculino e 1 de 6 do feminino foram positivos para PSMA. Pela comparação de sinais (fracos) de PSMA RT-PCR destes 4 indivíduos sadios do grupo controle com os sinais de quantidades definidas de PSMA MIMIC, foi estabelecido o valor de referência de 60 moléculas de PSMA MIMIC por reação, o que corresponde a 560 moléculas/ml do sangue periférico.

TABELA 3 – RESULTADOS DE RT-PCR PARA PSMA DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO; COMPARAÇÃO DA RT-PCR SEM MIMIC E PADRONIZADA COM MIMIC NA REAÇÃO. OS RESULTADOS POSITIVOS SÃO APRESENTADOS EM %

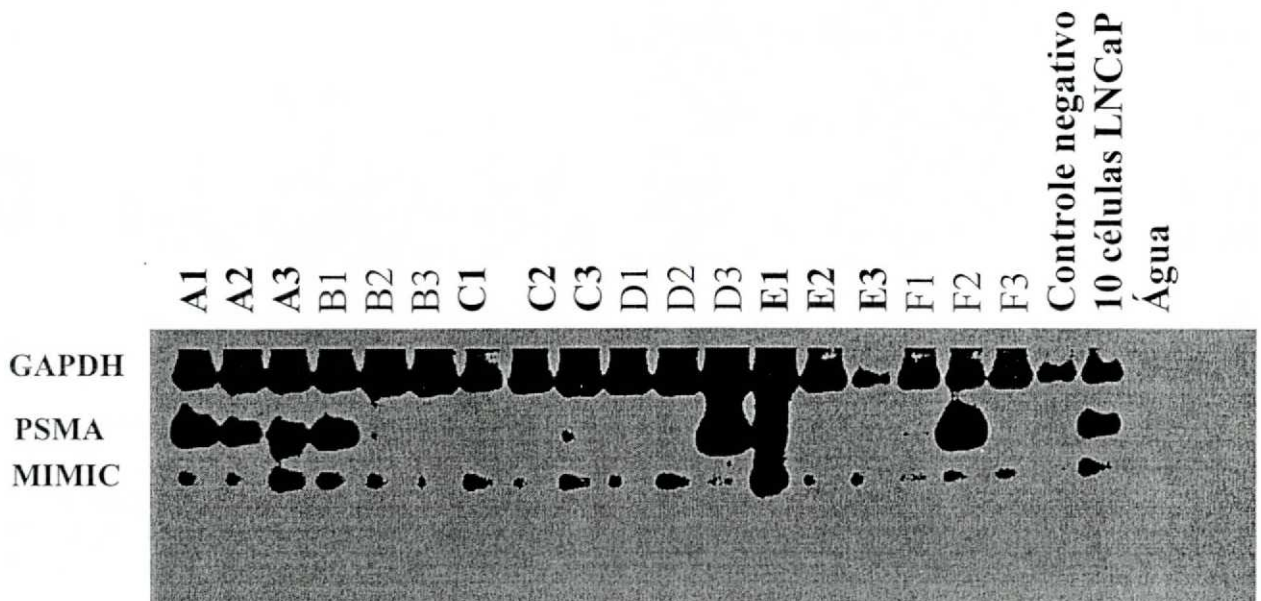
		Sem MIMIC (%)	Com MIMIC (%)
BPH	TUR-P e PSP	29,6 [8/27]	11,1 [3/27]
PCa	RRP	42,1 [9/27]	24,6 [14/57]
	PCa metastático	75 [3/4]	50 [2/4]
Controles		33,3 [9/27]	7,4 [2/27]

BPH = hiperplasia benigna da próstata; TUR-P = ressecção trans-uretral da próstata; PSP = prostatectomia supra-púbica; PCa = carcinoma da próstata; RRP = prostatectomia radical retro-púbica.

A padronização do método usando o valor de referência pré-definido e comparação do sinal do PSMA endógeno do sangue de pacientes com PCa e BPH, assim como de indivíduos sadios do grupo controle com o sinal do PSMA MIMIC adicionado externamente (figura 3), associou-se a decréscimo no número de amostras positivas (tabela 3, coluna à direita). Somente 11% (3/27) dos pacientes com BPH mostraram sinais positivos com o método padronizado. A positividade do grupo controle diminuiu para 7% (2/27). Enquanto que nenhuma das sete voluntárias apresentou resultado positivo, 2/20 (10%) dos homens do grupo controle mostraram sinais positivos mesmo após padronização do sinal do PSMA MIMIC. As duas amostras foram de um paciente com tumor testicular e de um paciente com carcinoma renal metastático. Todavia, a amostra de sangue de outro paciente do sexo feminino com carcinoma renal metastático, incluída neste estudo, foi negativa. Dentre os pacientes com PCa, 24,6 % (14/57) e somente 2 de 4 dos pacientes com metástase à distância permaneceram positivos (tabela 3).

Utilizando o valor de conversão de 20 moléculas de PSMA MIMIC/reacção de PCR ou 1 célula LNCaP em 1/25 ml de sangue de voluntários sadios, foi calculado o sinal de PSMA endógeno da figura 3 como apresentado na tabela A1 (anexos). Como se verifica na figura 3, os sinais de PSMA endógeno no sangue das amostras A1, A2, A3, B1, D3 e F2 são comparáveis aos sinais resultantes de 34 - 400 PSMA MIMICs adicionadas à reacção de PCR e corresponde a 850 - 9.900 moléculas/ml de sangue e 1,7 - 20 células LNCaP/ml de sangue. Estes são sinais considerados fortes.

FIGURA 3 - RT-PCR PADRONIZADA PARA PSMA ENDÓGENO EM AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES SUBMETIDOS À PROSTATECTOMIA RADICAL. TODAS AS PCRs FORAM REALIZADAS NA PRESENÇA DA MOLÉCULA MIMIC ADICIONADAS EXTERNAMENTE. AS AMOSTRAS COLHIDAS UM DIA ANTES, 30 MINUTOS E 14 DIAS APÓS A CIRURGIA FORAM ANALISADAS A CADA 3 LINHAS (SEQÜENCIAIS OU VIZINHAS)

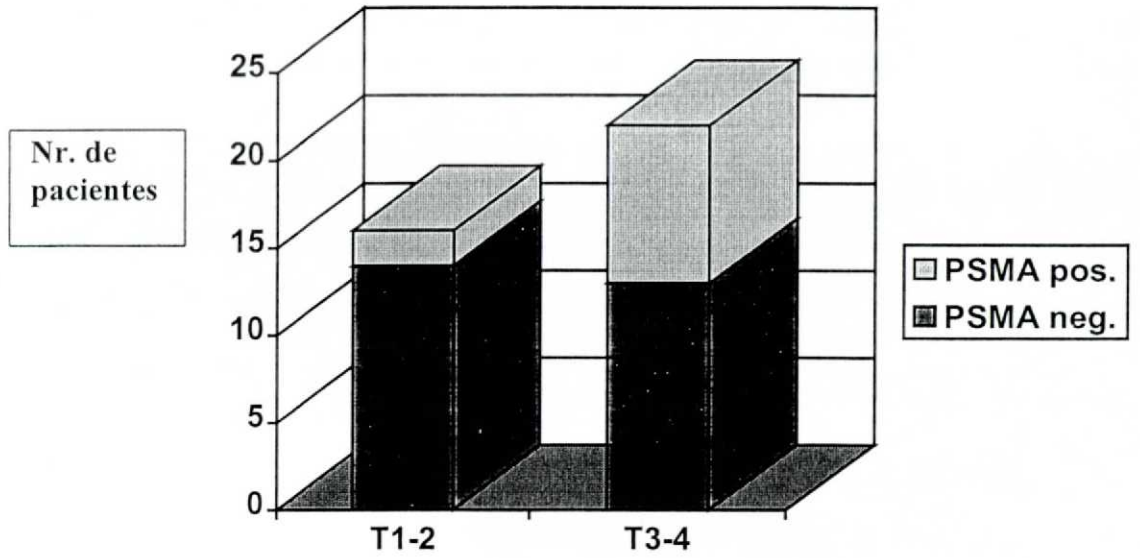


GADPH = Glicerol-aldeído-fosfato desidrogenase.

Utilizando esta padronização do método, as amostras sanguíneas de 2 dos 4 pacientes com metástases à distância foram positivos. Dentre os pacientes com PCa submetidos à prostatectomia radical (tabela A3 – anexos), 11/38 (= 28.9%) revelaram sinais positivos à RT-PCR. Houve tendência de associação com o estágio tumoral: 2/16 (= 12.5%) dos pacientes com tumores pT2, 8/20 (= 40.0%) dos pacientes com tumores pT3 e 1/2 com tumores pT4 foram positivos para PSMA. O método detectou 44.4% (4/9) pacientes com positividade para metástases em linfonodos, enquanto somente 24.1% (7/29) dos pacientes com tumores N0 foram positivos. Enquanto que 36.4% (8/22) dos tumores com Gleason *score* ≥ 7 foram positivos, somente 18.8% (3/16) dos tumores com Gleason *score* < 7 apresentaram reações positivas.

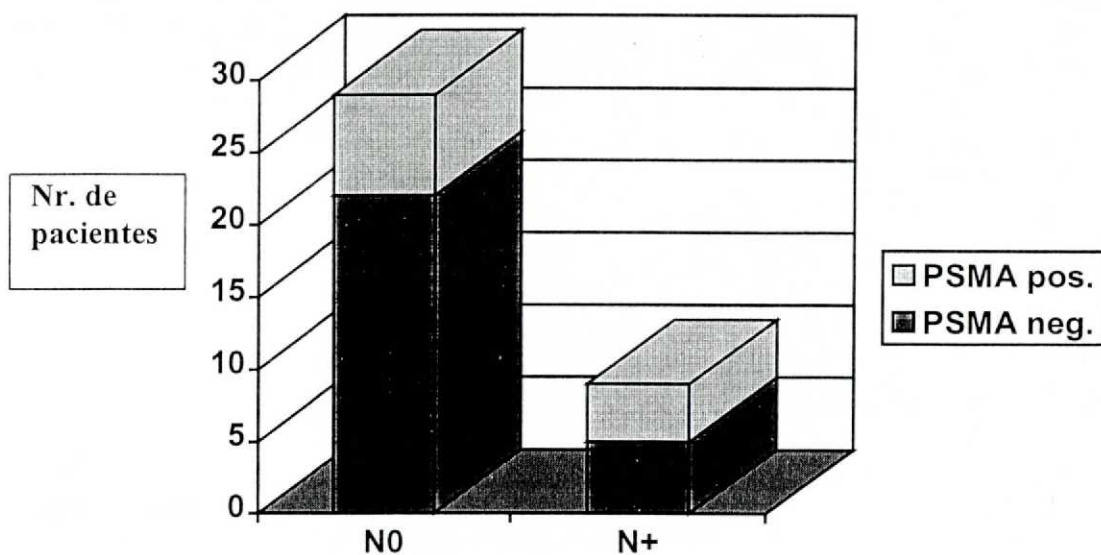
Ao se analisar os resultados de PSMA no período pré-operatório da RRP em relação ao estágio tumoral (T1-2 *versus* T3-4), não foi verificada diferença significativa ($p = 0,07$) (ver gráfico 1).

GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM OS RESULTADOS DE RT-PCR PARA PSMA E ESTADIAMENTO PATOLÓGICO T DA DOENÇA (classificação TNM 1998 – ver anexos) (p= 0,07)



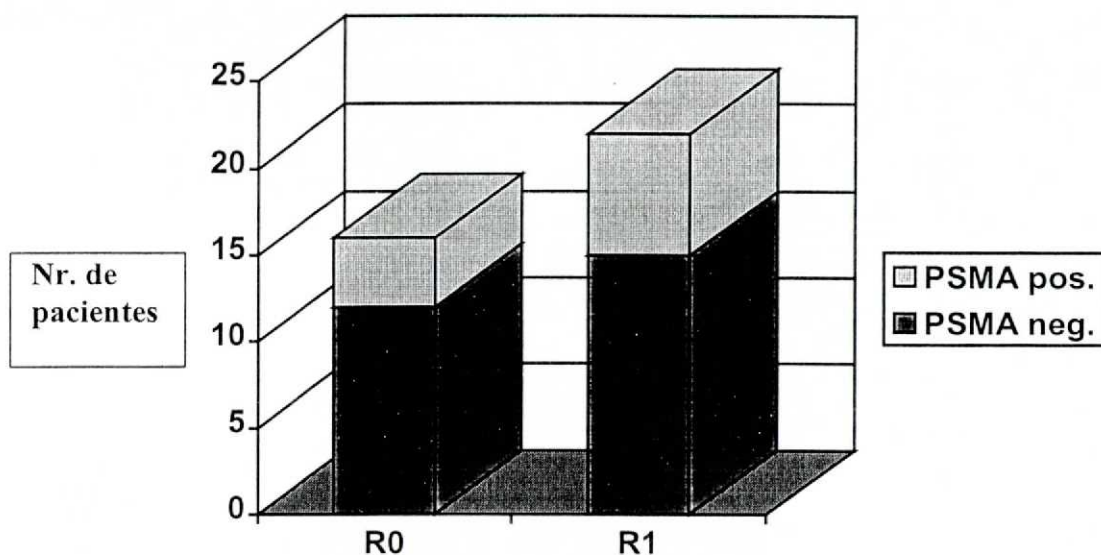
Ao se analisar os resultados de PSMA no período pré-operatório da RRP em relação à presença de doença nos linfonodos (N0 versus N+), não foi verificada diferença significativa ($p = 0,40$) (ver gráfico 2).

GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM OS RESULTADOS DE RT-PCR PARA PSMA E PRESENÇA DE DOENÇA EM LINFONODOS (classificação TNM 1998 – ver anexos) ($p = 0,40$)



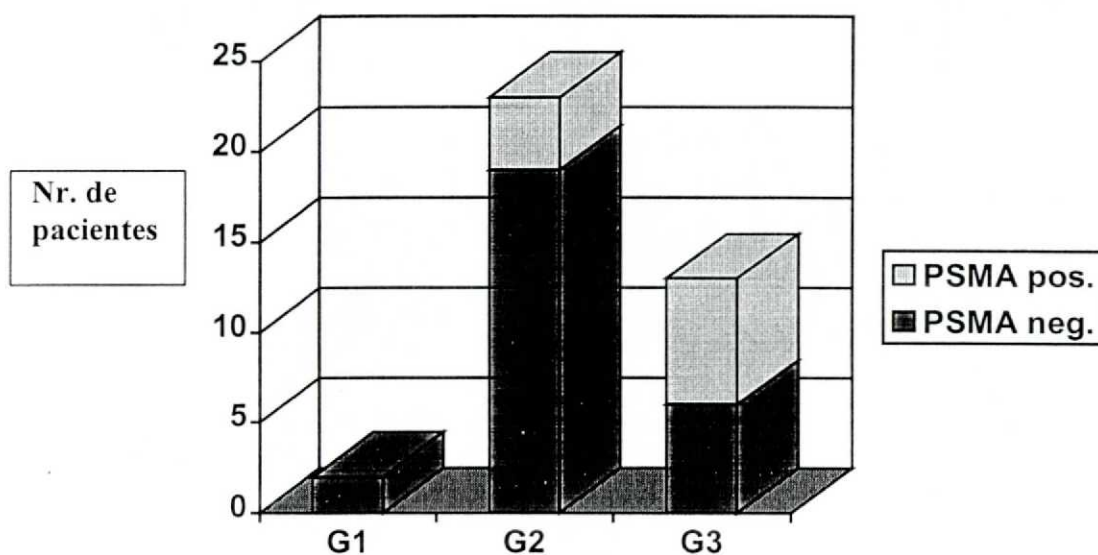
Ao se analisar os resultados de PSMA no período pré-operatório da RRP em relação às margens cirúrgicas (positivas *versus* negativas), não foi verificada diferença significativa ($p = 0,72$) (ver gráfico 3).

GRÁFICO 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM OS RESULTADOS DE RT-PCR PARA PSMA E MARGENS CIRÚRGICAS NEGATIVAS (R0) E POSITIVAS (R1) ($p = 0,72$)



Houve associação dos resultados de PSMA no período pré-operatório da RRP em relação ao grau de diferenciação celular (G1 *versus* G2 *versus* G3): 53,8% (7/13) dos tumores G3, 17,4% (4/23) dos tumores G2 e nenhum dos 2 pacientes com tumor G1 foram positivos (ver gráfico 4). Ao se estudar associação entre as variáveis, foi verificada uma diferença significativa ($p = 0,044$).

GRÁFICO 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM OS RESULTADOS DE RT-PCR PARA PSMA E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR (G1, G2 e G3 - ver anexos) ($p = 0,044$).



Considerando-se todos os pacientes com sinais positivos, 81,8% (= 9/11) se apresentavam com estádios \geq pT3, 72,7% (= 8/11) com Gleason score \geq 7 e 63,6% (7/11) com tumor G3.

4.3 DISSEMINAÇÃO HEMATOGENICA DE CÉLULAS PROSTÁTICAS PELA CIRURGIA, DETECTADA PELA RT-PCR PADRONIZADA

RT-PCR para PSMA do sangue de pacientes antes de ressecção trans-uretral da próstata (TUR-P) (n = 15) ou prostatectomia transvesical supra-púbica (n = 4) por BPH foi positiva em 3 casos, todos submetidos à TUR-P (3/19 = 16%) (tabelas 4 e A2 em anexos). Dois dos 3 pacientes inicialmente positivos antes da TUR-P se mantiveram desta forma após a cirurgia. Dois dos pacientes submetidos à TUR-P foram negativos antes e se tornaram positivos após a cirurgia, indicando disseminação de células prostáticas para o sangue periférico causada pelo tratamento. Nenhum dos pacientes submetidos à prostatectomia supra-púbica transvesical se tornou positivo após a cirurgia.

TABELA 4 - RESULTADOS POSITIVOS DE RT-PCR PARA PSMA DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO, OBTIDAS UM DIA ANTES (PRÉ-OPERATÓRIO), EM ATÉ 30 MINUTOS DEPOIS (INTRA-OPERATÓRIO) E 14 DIAS APÓS A CIRURGIA (PÓS-OPERATÓRIO). OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS EM %

		Pré-operatório (%)	Intra- operatório (%)	Pós-operatório (%)
BPH	TUR-P e PSP	15,8 [3/19]	21 [4/19]	n.d.
PCa	RRP	28,9 [11/38]	23,7 [9/38]	28,9 [11/38]

BPH = hiperplasia benigna da próstata; TUR-P = ressecção trans-uretral da próstata; PSP = prostatectomia supra-púbica; PCa = carcinoma da próstata; RRP = prostatectomia radical retro-púbica; n.d.= não determinado.

Resultados da RT-PCR PSMA para alguns dos pacientes submetidos à RRP são demonstrados na figura 3. Amostras colhidas antes, durante e após a cirurgia foram

analisadas em 3 linhas vizinhas entre si. *Nested* RT-PCR para PSMA indica claramente a disseminação de células prostáticas para o sangue periférico durante a cirurgia no caso do paciente cujas amostras estão representadas por F1, F2 e F3. O paciente apresentava resultado negativo antes do procedimento (amostra F1). Trinta minutos após a retirada da próstata, um sinal bastante forte para PSMA foi detectado no sangue periférico (amostra F2) do mesmo paciente. Quatorze dias após a cirurgia somente um sinal fraco (negativo) foi observado (amostra F3). Dois pacientes cujas amostras estão representadas pelas lestras C e D foram positivos somente 14 dias após a cirurgia (amostras C3 e D3), o que indica disseminação de células prostáticas. Adicionalmente, a mesma figura mostra paciente (cujas amostras estão representadas pela letra A) que teve sinais positivos em todas as amostras e outro paciente (cujas amostras estão representadas pela letra B) com sinal positivo somente antes da RRP (amostra B1). O sangue de um homem sadio foi negativo (controle negativo). A linha celular de câncer da próstata LNCaP, conhecida por expressar PSA e PSMA, atingiu o sinal desejado em 234 bp.

Após padronização do método, 28.9% (11/38) dos pacientes com PCa foram positivos antes da RRP (tabela 4). Dentro de 30 minutos após a remoção da próstata, as amostras de sangue de 23.7% (9/38) dos pacientes se apresentaram com sinal positivo, indicando células prostáticas no sangue periférico. Quatorze dias após a remoção da próstata, 28.9% (11/38) permaneceram positivos. O sangue de 5 pacientes positivos no período pré-operatório se tornou negativo dentro de 14 dias, outros 6 pacientes se tornaram positivos após 2 semanas (tabelas 4 e A3 de anexos). Enquanto que 50% (19/38) dos pacientes com PCa submetidos à RRP nunca tiveram sinais positivos, 21.1% (8/38) dos pacientes foram negativos no pré-operatório e apresentaram amostras positivas 30 minutos após a remoção da próstata e/ou 14 dias após a cirurgia, ambos indicando uma disseminação de células. Adicionalmente, 2 dos pacientes com resultados positivos no pré-operatório obtiveram sinal de PSMA mais forte no intra-operatório, indicando maior quantidade de células prostáticas na corrente sanguínea.

Dos pacientes que permaneceram positivos mesmo 14 dias após a cirurgia, 63.6% (7/11) apresentavam estágio tumoral \geq pT3, 72.7% (8/11) *score* de Gleason \geq 7 e 63.6% (7/11) tumores de grau G3. Seis dos onze pacientes apresentaram amostras positivas mesmo antes da RRP.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O PSA e o PSMA são expressos exclusivamente no tecido prostático (WANG et al., 1979; ISRAELI et al., 1994b; SHEN et al., 1995). A especificidade desses marcadores, sobretudo do PSMA, fez surgir a idéia de usá-lo para definição do valor prognóstico em relação ao diagnóstico de disseminação metastática precoce em pacientes com PCa, somando-se a outros parâmetros tais como PSA sérico, positividade das biópsias por punção e grau tumoral, permitindo assim seleção específica dos pacientes que possam se beneficiar da cirurgia radical (SCHMIDT et al., 1998).

Analisando os marcadores tumorais PSA e PSMA como fator prognóstico para 235 pacientes com PCa, provenientes de vários centros norte-americanos, MURPHY et al. (1995b) concluíram que PSMA apresentou o maior valor prognóstico. Ao se considerar a sensibilidade da RT-PCR para PSA e PSMA, ISRAELI et al. (1993, 1994) demonstraram resultados mais favoráveis para o PSMA.

Relatos prévios demonstraram que a *nested* RT-PCR para PSMA foi mais freqüentemente positiva em amostras clínicas do que a técnica similar e sensível de *nested* RT-PCR para PSA (WRIGHT et al., 1996B; FAIR et al., 1997; KAWAKAMI e NAKAYAMA et al. 1997). Todavia, estudos de controle de qualidade recentemente publicados detectaram PSA e transcrições de PSMA em níveis ainda mais elevados em várias linhas celulares negativas de controle e de origem não prostática, inclusive no sangue de voluntários sadios (HENKE et al., 1996; GALA et al., 1998; LINTULA and STENMAN, 1997; SMITH et al., 1995).

Os dados de literatura indicam uma necessidade premente de controlar experimentos de PCR em relação à transcrição basal, ilegítima, quando do uso das *nested* RT-PCRs ou RT-PCRs intensificadas em combinação com ciclos elevados de

amplificação. Todavia, o simples uso de métodos menos sensíveis (ciclos de amplificação menores) determinaria o risco de deixar de identificar transcrições legítimas. Como resultado destas dificuldades, o benefício de reações de RT-PCR para a detecção de células prostáticas disseminadas com utilidade clínica ainda está sob discussão. Isto fez surgir a necessidade de RT-PCRs quantitativas.

A seguir serão apresentados alguns dos aspectos relacionados à construção e uso da padronização externa com a molécula PSMA MIMIC no sentido de controlar experimentos com PSMA RT-PCR para a transcrição basal e detecção de células prostáticas no sangue periférico de pacientes com PCa submetidos à RRP.

5.1 PSMA MIMIC COMO PADRÃO INTERNO

Para a construção da molécula controle foi realizada deleção de 85 bp no centro de uma molécula endógena de PSMA, amplificada a partir de uma metástase em linfonodo. O produto da primeira fase da *nested* PCR, a PSMA MIMIC de 562 bp, demonstra identidade de 87% em relação ao PSMA endógeno, de 647 bp. Na segunda parte da *nested* PCR, a qual amplifica a seqüência interna menor, a identidade da MIMIC de 149 bp e o PSMA endógeno de 234 bp perfaz 64%. O parâmetro mais importante para a eficiência e sucesso da reação de PCR é o conteúdo de pares de base GC. Na molécula de PSMA MIMIC, a quantidade de GC permaneceu inalterada. Utilizando o par de *primer* externo na *nested* PCR, a quantidade de GC do produto de PCR diminui de 43.7% para 43.3% na PSMA MIMIC; e utilizando o par de *primer* interno na segunda reação, reduz o conteúdo de GC de 42.2% para 40.1%. A vantagem desta estratégia de construção é que ambos os *primers* e a seqüência intermediária são idênticas em ambos os alvos de PCR, atingindo aproximadamente o mesmo padrão de amplificação e sucesso.

Um ponto de início semelhante para RT-PCRs para PSA utilizando mensagem de controle interno sintético com seqüências de *primer* para PSA em ambas as extremidades foi publicado por COREY et al. (1997). Todavia, este padrão interno para PSA foi construído através da introdução de seqüência não relacionada de 258 bp dentro do plasmídeo que continha cDNA de PSA. Refletindo a eficiência de PCR, esse padrão foi usado para interpretação semi-quantitativa dos resultados.

Em outro estudo recentemente publicado (YLIKOSKI et al., 1999), também sobre padronização de RT-PCRs para PSA, os autores descreveram o uso de um padrão interno de mRNA (IS mRNA), o qual contém uma deleção de 2 pares de base com relação ao mRNA alvo para PSA. Todavia, essa deleção de 2 pares de base não pode ser empregada para métodos com eletroforese em gel, habitualmente utilizados. Assim sendo, o grupo desenvolveu um método pouco diferente para detectar PSA e o padrão interno simultaneamente. Os produtos de PCR foram analisados em depósitos microtitulados recobertos com estreptavidina após hibridização específica com amostras ligadas a Eu^{3+} e a detecção realizada utilizando técnicas fluorescentes relacionadas ao tempo.

Como havia sido demonstrado previamente por COREY et al. (1997), tais construções de controles competem diretamente com a mensagem endógena de PSMA/PSA para amplificação. Se uma das formas de PSMA/PSA ou construção de controle é presente em quantidade maior que 10 vezes do que a outra, esta forma domina a reação de PCR e impede a detecção da outra. Todavia, PSMA MIMIC foi adicionada em concentrações bastante reduzidas no presente estudo e não influenciou o limite de detecção do PSMA endógeno. Além disso, mesmo o sinal mais elevado de PSMA endógeno não influenciou a detecção de PSMA MIMIC (ver figura 3).

5.2 SENSIBILIDADE DO MÉTODO

Os experimentos com PCR foram realizados usando a detecção altamente sensível com quimioluminescência após a incorporação de d-UTP digoxigenina durante a reação de PCR e aderência dos produtos em membranas. Foram realizados somente 2x18 ciclos, resguardando o limite de definição da amplificação em ambas as reações *nested* permitindo assim uma quantificação do método. Com estes ciclos limitados foram obtidos uma sensibilidade de 1 LNCaP/1x10⁷ leucócitos e um limite de detecção de 8 moléculas /reação para a PSMA MIMIC. Apenas poucos autores relataram sobre a alta sensibilidade de 1 célula de LNCaP em 1x10⁸ (COREY et al., 1997; ZARGHAMI et al., 1997).

Utilizando ciclos de amplificação mais altos para *nested* RT-PCR em combinação com detecção por quimioluminescência, também no presente estudo pode ser alcançada uma sensibilidade maior. Entretanto, no presente estudo, *nested* PCR foi utilizada somente para aumentar a especificidade da PCR, mas não a sensibilidade. Abdicou-se intencionalmente de mais ciclos de amplificação no sentido de suprimir a detecção da transcrição basal.

Recentemente, GALA et al. (1998) demonstraram redução até o zero dos resultados falso-positivos de RT-PCR para PSMA no sangue periférico de voluntários sadios e diferentes linhas celulares, ao se reduzir o número de ciclos de amplificação em PCRs *nested* de 2x25 para 2x19. Utilizando a detecção convencional com *ethidium bromide* os autores observaram redução do limite de detecção por um fator 50. Analisando os resultados do presente estudo pode-se concluir que somente a combinação de baixo número de ciclos de amplificação e detecção por quimioluminescência pode determinar sensibilidade suficiente e resultados confiáveis em métodos de RT-PCR para PSMA.

5.3 VALOR DE CORTE E CÁLCULOS DO NÚMERO DE CÉLULAS NAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DA PRÓSTATA

Ao se comparar os (fracos) sinais de PSMA em RT-PCR de 14 pessoas sadias com os sinais de uma diluição seriada de PSMA MIMIC, foi possível definir um valor de corte de 560 moléculas de PSMA MIMIC/ml de sangue, no sentido de filtrar a transcrição basal. Este valor de corte é proporcional àquele obtido nos resultados de CHELLY et al. (1989), os quais descobriram nível semelhante de transcrição basal para o gene da distrofia muscular de Duchenne, do hormônio anti-Muelleriano e β -Globulina em fibroblastos e linfoblastos, ou seja, menos de uma molécula/500-1000 células. De modo interessante, as quantidades de transcrição ilegítima se mostraram mais elevadas em linfoblastos.

BIRD (1995) formulou a hipótese de que o nível de transcrição não programada de um gene silencioso é de cerca de 1 RNAm para cada 10.000 células. Isto significa que em 5×10^6 leucócitos (1ml de sangue) se encontram cerca de 500 transcritos ilegítimos de PSMA ou outro gene com um promotor não silenciado. Devido a isso, o valor de corte estabelecido de 560 moléculas de PSMA MIMIC/ml de sangue como apresentado na figura 3 parece ser adequado para filtrar a transcrição basal no método de determinação do PSMA utilizado.

Mesmo após padronização das reações de PCR, células que expressam PSMA puderam ser detectadas em 7.4% (2/27) das amostras controle. Um destes controles pertenceu a um paciente com tumor de células germinativas do testículo e o outro a uma paciente com carcinoma de células renais metastático. De acordo com o apresentado por DUMAS et al. (1999), a expressão de PSMA foi encontrada em uma variedade de tecidos renais normal e neoplásico (n = 20) e linhas celulares do rim.

Todavia, no grupo controle do presente estudo foi incluída a amostra de outra paciente com carcinoma renal metastático, sendo que esta não apresentou expressão de PSMA.

Foi calculada a expressão de uma célula LNCaP adicionada a 1ml de sangue periférico, ao se comparar os sinais de PCR de quantidades conhecidas de PSMA MIMICs externamente adicionadas a 500 moléculas de PSMA. Assim sendo, o valor de corte de 560 moléculas/ml de sangue permite classificação de resultado positivo da PCR somente se a PCR detecta mais do que uma célula prostática/ml de sangue. Como demonstrado na figura 3 e na tabela A1 (anexos), sinais positivos para PSMA endógeno de amostras sangüíneas de pacientes com carcinoma da próstata variam entre 850 e 9.900 moléculas transcritas, correspondendo a 2-20 células que expressam PSMA/ml de sangue e 10.000 - 100.000 células prostáticas no sangue total circulante.

Os dados do presente estudo confirmam os apresentados recentemente por YLIKOSKI et al. (1999). Eles estabeleceram método quantitativo de RT-PCR para a detecção de PSA e determinaram o número de PSA transcritos por célula prostática de até 1300 (em média). Usando este valor, os autores detectaram entre 900 e 44.000 cópias de mRNA para PSA/5ml de sangue em pacientes com câncer de próstata metastático correspondendo a 1-100 células que expressam PSA em cada 5 ml de sangue.

5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE PSMA E CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DO TUMOR

Os resultados de RT-PCR padronizada com PSMA MIMIC no período pré-operatório demonstraram estar associados ao grau de diferenciação das células tumorais (gráfico 4). Todavia, não foi verificada associação estatisticamente significativa entre os resultados de RT-PCR para PSMA e estágio tumoral, bem como para margens positivas.

Outros estudos (ISRAELI et al., 1994a; CAMA et al., 1995; LORIC et al., 1995; SOKOLOFF et al., 1996; NOGUCHI et al., 1997) apresentaram resultados semelhantes com relação à ausência de associação entre os resultados de RT-PCR para PSMA e o estágio tumoral. Nesses estudos também não foi verificada associação dos resultados da RT-PCR para PSMA com o *score* de Gleason.

No sentido de melhorar a definição do estadiamento patológico no período pré-operatório, ZHANG et al. (1997) utilizaram métodos combinados de RT-PCR para PSA e PSMA, atingindo sensibilidade de 67% e especificidade de 91% para previsão de doença extra-prostática. Em outro estudo com 136 pacientes e utilizando o mesmo princípio, GRASSO et al. (1998) verificaram positividade de 37,5% para os pacientes com doença restrita ao órgão, enquanto que 81,5% com doença extra-prostática apresentaram resultados positivos para RT-PCR PSA/PSMA. Esta diferença foi estatisticamente significativa. Os autores concluíram que a RT-PCR PSA/PSMA apresenta vantagens em relação ao PSA sérico, estadiamento clínico e *score* de Gleason da biópsia, no sentido de previsão da presença de doença extra-prostática.

Outro estudo recentemente publicado (OKEGAWA et al., 2000), analisando os resultados de *nested* RT-PCR para PSA e PSMA de linfonodos ou do sangue periférico, verificou associação estatisticamente significativa em relação à recidiva bioquímica da doença após o tratamento cirúrgico de pacientes com estágio pT3N0

(ver anexos). De acordo com os autores, esse método pode ajudar a identificar grupos de pacientes de risco para recidiva e progressão do carcinoma da próstata.

5.5 DISSEMINAÇÃO DE CÉLULAS PROSTÁTICAS DURANTE CIRURGIA

Vários grupos de estudo relataram aumento do número de células que expressam PSA e/ou PSMA no sangue periférico de pacientes examinados e/ou tratados por BPH e PCa através de biópsia dirigida por ultra-sonografia, TUR-P e prostatectomia radical retropúbica (RRP) (KASSABIAN et al., 1993; ESCHWEGE et al., 1995; OEFELEIN et al., 1996; MORENO et al., 1996; PRICE et al., 1998).

Qualquer comparação entre os resultados do presente estudo e os de outros autores é extremamente questionável, pois são utilizados protocolos diversos (*primers*, número de ciclos, RT-PCR para PSA) e poucos estudos apresentam resultados relacionados à RT-PCR para PSMA.

Utilizando RT-PCR padronizada para PSMA foram analisados os efeitos da TUR-P e RRP na detecção de células prostáticas circulantes antes e após o procedimento cirúrgico. Enquanto que a prostatectomia supra-púbica transvesical para tratamento de BPH não influenciou a detecção de células que expressam a PSMA, 2 dos 15 pacientes submetidos à ressecção transuretral se tornaram positivos após o procedimento (tabela A2 - anexos). Os sinais positivos no pré-operatório de outros 2 pacientes com BPH aumentaram significativamente, indicando uma disseminação de células prostáticas também durante o tratamento cirúrgico. Em resumo, 26.7% dos pacientes submetidos à TUR-P apresentaram disseminação de células prostáticas.

quais consistiram na infusão de líquidos e transfusão sangüínea em quantidade mais elevada. A adição de 5 a 6 litros (em média) de solução de Ringer lactato, concentrado de hemácias e plasma fresco congelado determina uma diluição do sangue periférico através de um fator 2 e diminui a concentração de células prostáticas disseminadas por ml de sangue de modo importante. Como demonstrado na tabela A1 (anexos), o número de células prostáticas nas amostras sanguíneas positivas variou entre 2 e 20 células/ml de sangue. Devido à padronização de RT-PCR em relação à transcrição ilegítima, as amostras com a concentração de 1 célula prostática/ml se transformarão, como resultado de diluição, em amostras negativas. Esta explicação pode ser responsável pelos achados em três pacientes, os quais foram positivos antes da cirurgia e 14 dias após, porém negativos no intra-operatório, e por outros 4 pacientes, os quais foram positivos somente no período pós-operatório.

Outros supostos fatores influenciando a variabilidade dos resultados intra-operatórios da RT-PCR podem incluir a duração da cirurgia, complicações intra-operatórias e a experiência do cirurgião.

Analisando os resultados do presente estudo pode-se concluir que a disseminação de células prostáticas ocorre durante a prostatectomia radical, mas este efeito pode ser mascarado pelo volume de soluções líquidas infundidas durante a cirurgia. A importância da disseminação de células durante a cirurgia deve ser determinada pela evolução dos pacientes e com os resultados positivos da RT-PCR para PSMA 14 dias após a cirurgia. Com relação a este aspecto, no entanto, a única associação significativa foi para o grau de diferenciação celular, na qual tumores pouco diferenciados apresentaram, mais freqüentemente que tumores G1 e G2, resultados positivos de RT-PCR para PSMA.

Estudos futuros devem investigar o significado clínico dos resultados obtidos mediante RT-PCR para PSMA em relação à evolução dos pacientes, em termos de recidiva bioquímica e comportamento clínico da doença. Amostra com maior número

de pacientes e longo período de seguimento (acima de 10 anos) serão imprescindíveis.

Outros estudos com PSMA se encontram em desenvolvimento. Recentemente, GONG et al. (2000) publicaram revisão sobre as possíveis utilidades do PSMA. PSMA é alvo potencial para anticorpos no sentido de estabelecer exames de imagem e tratamento (MURPHY et al., 1998), assim como para terapia genética em pacientes com PCa devido apresentar expressão elevada, sobretudo naqueles submetidos à deprivação androgênica.

Devido à expressão restrita de PSMA pelas células prostáticas e sua natural associação à membrana, o anticorpo 7E11.C5 marcado com ^{111}In (CYT 356) tem sido empregado para estudos de imagem *in vivo* no sentido de detectar lesões metastáticas ocultas do PCa utilizando o *scan* ProstascintTM [Cytogen, Princeton, NJ] (WYNANT et al., 1991; ABDEL-NABI et al., 1992; MAGUIRE et al., 1993; BABAIAN et al., 1994; SANFORD et al., 1994; MURPHY et al., 1995C; KAHN et al., 1994; HASEMAN et al., 1996; KAHN et al., 1998).

Conceitos aplicados em estudos clínicos fase I e II, nos quais foram utilizados peptídeos de PSMA como agentes imunoterápicos, representam novas perspectivas para o tratamento do PCa (MURPHY et al., 1996b; TJOA et al., 1997).

Além disso, PSMA está relacionado ao desenvolvimento de novo receptor híbrido para célula T, o qual combina a especificidade de anticorpos anti-PSMA com a do receptor celular ativado quando introduzido em linfócitos por meio de transferência genética mediada por retrovírus. Descobertas recentes sobre a expressão de gene *PSMA-like* permitirão melhorar a utilização do PSMA como alvo (GONG et al., 2000).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1 PSMA MIMIC apresenta a mesma seqüência que o PSMA endógeno com exceção de uma deleção central de 85bp, o que permite a amplificação de ambos os alvos simultaneamente. No sentido de eliminar a transcrição ilegítima de PSMA se define o valor de corte de 560 moléculas/ml de sangue. Controles internos e externos (PSMA MIMIC) definindo um valor de referência, assim como controles positivos e amostras controle negativas são pré-requisitos deste método e devem ser incluídos em cada determinação. A avaliação de células circulantes no sangue periférico de pacientes com PCa localizado com o uso de RT-PCR para PSMA padronizada com PSMA MIMIC confere confiabilidade a esta técnica de biologia molecular como método diagnóstico.
- 2 Sem a padronização do método com a molécula PSMA MIMIC, 42% dos pacientes com PCa localizado apresentam, no período pré-operatório, RT-PCR positiva para PSMA e a taxa de falso-positivos no grupo controle é de 33% (especificidade de 67%). Com o método padronizado utilizando PSMA MIMIC, os resultados positivos para pacientes com PCa localizado representam cerca de 25% e a especificidade aumenta para 93%.
- 3 No período intra-operatório verifica-se pequena redução dos resultados positivos para PSMA em pacientes com PCa, atribuível à diluição do volume sangüíneo circulante pela infusão de líquidos e transfusão sangüínea. Quatorze dias após a prostatectomia radical, o índice de positividade atinge o mesmo nível verificado no período pré-operatório.
- 4 Os resultados de RT-PCR para PSMA no período pré-operatório demonstram estar associados ao grau de diferenciação das células tumorais ($p= 0,044$). Há tendência de associação entre os resultados de RT-PCR para PSMA e o estágio tumoral (T), porém não significativa. Não há associação entre a presença de

células prostáticas no sangue periférico e doença nos linfonodos, assim como em relação às margens positivas. A maioria dos pacientes que permaneceram positivos 14 dias após a cirurgia apresenta doença extracapsular (\geq pT3) e tumores pouco diferenciados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-NABI, H.; WRIGHT, G.L.; GULFO, J.V.; PETRYLAK, D.P.; NEAL, C.E.; TEXTER, J.E.; BEGUN, F.P.; TYSON, I.; HEAL, A.; MITCHELL, E. Monoclonal antibodies and radioimmunoconjugates in the diagnosis and treatment of prostate cancer. **Semin. Urol.**, v. 10, n. (1), p. 45-54, feb, 1992.
2. ACKERMANN, R. **Die klinische Bedeutung der Tumorimmunologie bei Malignomen des Urogenitaltraktes**, p. 352-355, 1980.
3. ACKERMANN, R.; SCHMITZ DRAGER, B.J. Molecular biology of genitourinary cancer [editorial]. **World J. Urol.**, v. 12, p. 63, 1994.
4. AMIN, M.B.; REUTER, V.E. **Contemporary classifications of neoplasms of the genitourinary tract: a comprehensive review of clinically significant pathologic features**. Instructional/Postgraduate and AM/PM Course Handouts. 95th Annual Meeting, Atlanta, Georgia 2000. Merck, 2000. CD-ROM.
5. BABAIAN, R.J.; FRITSCH, H.A.; EVANS, R.B. Prostate-specific antigen and prostate gland volume: Correlation and clinical application. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 4, p. 135-137, 1990.
6. BABAIAN, R.J.; SAYER, J.; PODOLOFF, D.A.; STEELHAMMER, L.C.; BHADKAMKAR, V.A.; GULFO, J.V. Radioimmunoscintigraphy of pelvic lymph nodes with 111indium-labeled monoclonal antibody CYT-356. **J. Urol.**, v. 152, n. 6 Pt 1, p. 1952-5, 1994.
7. BEDUSCHI, M.C.; BEDUSCHI, R.; OESTERLING, J.E. **Molecular forms of PSA, PSA density, age-/race-specific ranges, and PSA- velocity**. In: *Molecular Biology of Prostate Cancer*, p. 169-180. Ed.: With, M.; Altwein, J.E.; Schmitz-Dräger, B.; Kuptz, S. Walter de Gruyter. Berlin, New York, 1998.
8. BENDHACK, M.L. **Die Isoenzyme der plazentaren alkalischen Phosphatase als Tumormarker bei männlichen Keimzelltumoren**. Tese de Doutorado. Departamento de Urologia, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, República Federativa da Alemanha, 1999a.
9. BENDHACK, M.L. **Fosfatase alcalina placentária como marcador tumoral para neoplasias seminomatosas do testículo**. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 1999b.

10. BENDHACK, M.L.; MILLER, S.; ACKERMANN, R. Surgical therapy of locally confined prostate Carcinoma. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.*, 12, v. 86, n. (46), p. 1819-1824, nov, 1997a.
11. BENDHACK, M.L.; MILLER, S.; ACKERMANN, R. Operative Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms. Em: **Klinische Onkologie**, 1997B, pp. 269a-f. Ed.: Roth SL, Ackermann R, Aul C, Bender HG, Göbel U, Müller-Gärtner HW, Röher HD. Hans Huber Verlag, Bern.
12. BIRD, A.P. Gene number, noise reduction and biological complexity. **Trends in Genetics**, v. 11, p. 94-100, 1995.
13. BIRKENMEIER, G.; STRUCK, F.; GEBHARDT, R. Clearance mechanism of prostate specific antigen and its complexes with alpha2-macroglobulin and alpha1-antichymotrypsin. **J. Urol.**, v. 162, n. (3 Pt 1), p.897-901, sep, 1999.
14. BRAWER, M.K.; CHETNER, M.P.; BEATIE, J. Screening for prostate carcinoma with prostate specific antigen. **J. Urol.**, v. 147, p. 841-848, 1992.
15. BREWSTER, D.H.; FRASER, L.A.; HARRIS, V.; BLACK, R.J. Rising incidence of prostate cancer in Scotland: increased risk or increased detection? **BJU International**, v. 85, p. 463-473, 2000.
16. CAMA, C.; OLSSON, C.A.; RAFFO, A.J.; PERLMAN, H.; BUTTYAN, R.; O'TOOLE, K. Molecular staging of prostate cancer. II. A comparison of the application of an enhanced reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for prostate specific antigen versus prostate specific membrane antigen. **J. Urol.**, v.153, p. 1373-1378, 1995.
17. CARTER, H.P.; PEARSON, J.D.; METTER, E.J. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. **JAMA**, v. 267, p. 2215-2219, 1992.
18. CARTER, H.B.; PARTIN, A.W. **Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Campbell's Urology**. P. 2519-2537. Editors: P.C. Walsh, A.B. Retik, E.D. Vaughan Jr. And A.J. Wein. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1998.
19. CATALONA, W.J.; SMITH, D.S.; RATLIFF, T.L. Measurements of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. **N. Eng. J. Med.**, v. 324, p. 1156-1161, 1991.
20. CATALONA, W.J.; SMITH, D.S.; RATLIFF, T.L.; BASLER, J.W. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. **JAMA**, v. 270, p. 948-954, 1993.

21. CATALONA, W.J.; RICHIE, J.P.; AHMANN, F.R. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: Results of a multicenter trial of 6630 men. **J. Urol.**, v. 151, p. 1283-1290, 1994.
22. CATALONA, W.J.; SMITH, D.S.; WOLFERT, R.L. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. **JAMA**, v. 274, p. 1214-1220, 1995.
23. CHELLY, J.; CONCORDET, J.P.; KAPLAN, J.C.; KAHN, A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 2617-21, 1989.
24. CHRISTENSSON, A.; LAURELL, C.B.; LILJA, H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. **Eur. J. Biochem**, v. 194, p. 755-763, 1990.
25. CLEMENTS, J.; MUKHTAR, A. Glandular kallikreins and prostate-specific antigen are expressed in the human endometrium. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 8, p. 536-9, 1994.
26. COONER, W.H.; MOSLEY, B.R.; RUTHERFORD, C.L. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. **J. Urol.**, v. 143, p. 1146-1154, 1990.
27. COREY, E.; ARFMAN, E.W.; LID, A.Y.; VESSELLA, R.L. Improved reverse transcriptase-polymerase chain reaction protocol with exogenous internal competitive control for prostate-specific antigen mRNA in blood and bone marrow. **Clin. Chem.**, v. 43, p. 443-52, 1997.
28. COREY, E.; COREY, M.J. Detection of disseminated prostate cells by reverse transcription polymerase chain reaction (rt-pcr): technical and clinical aspects. **Int. J. Cancer**, V. 77, P. 655-73, 1998.
29. DEGUCCI, T.; DOI, T.; EHARA, H.; ITO, S.; TAKAHASHI, Y.; NISHINO, Y.; FUJIHIRO, S.; KAWAMURA, T.; KOMEDA, H.; HORIE M, et al. Detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Cancer Res.**, v. 53, p. 5350-4, 1993.
30. DENIS, L.J.; MURPHY, G.P.; SCHRÖDER, F.H. Report on the consensus workshop on screening and global strategy for prostate cancer. **Cancer**, v. 75, p. 1187-1207. 1995.

31. DIAMANDIS, E.P.; YU, H. New biological functions of prostate-specific antigen? [Editorial]. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, p. 1515-7, 1995.
32. DUMAS, F.; ESCHWEGE, P.; BERTEAU, P.; BRASSEUR, F.; PARADIS, V.; LACOUR, B.; LORIC, S. Molecular expression of PSMA mRNA and protein in primary renal tumors. **Int. J. Cancer**, v. 80, p. 799-803, 1999.
33. DUMAS, F.; ESCHWEGE, P.; LE MARIE, V.; BLANCHET, P.; PARADIS, V.; BENOIT, G.; JARDIN, A.; LACOUR, B.; LORIC, S. Spillage of prostate epithelial cells into the blood during radical surgery and transurethral resection of the prostate. **Molecular Urology**, v. 1, p. 293-8. 1996.
34. EBERT, T.; BENDHACK, M.L. [Prostatic carcinoma--diagnosis, hormone therapy, radio- and chemotherapy]. **Urologe A**, v. 36, n. (6), p. 570-7, nov., 1997.
35. ELGAMAL, A.A.; HOLMES, E.H.; SU, S.L.; TINO, W.T.; SIMMONS, S.J.; PETERSON, M.; GREENE, T.G.; BOYNTON, A.L.; MURPHY, G.P. Prostate-specific membrane antigen (PSMA): current benefits and future value. **Semin. Surg. Oncol.** 2000, v. 18, n. (1), p. 10-6, jan-feb, 2000.
36. ELLIS, W.J.; CHETNER, M.P.; PRESTON, S.D.; BRAWER, M.K. Diagnosis of prostatic carcinoma: The yield of serum prostate specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography. **J. Urol.**, v. 52, p. 1520-1525, 1994.
37. ERCOLE, C.J.; LANGE, P.H.; MATHIESEN, M. Prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in the monitoring and staging of patients with prostatic cancer. **J. Urol.**, v. 138, p. 1181-1184, 1987.
38. Von ESCHENBACH, A; HO, R.; MURPHY, G.P., e cols. American Cancer Society Guidelines for the early detection of prostate cancer: update, june 10, 1997. **Cancer**, v. 80, p. 1805-1807, 1997.
39. ESCHWEGE, P.; DUMAS, F.; BLANCHET, P.; MAIRE, V.L.; BENOIT, G.; JARDIN, A.; LACOUR, B.; LORIC, S. Hematogenous dissemination of prostatic epithelial cells during radical prostatectomy. **Lancet**, v. 346, p. 1528-30, 1995.
40. GLEASON, D.F. Classification of prostatic carcinomas. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 50, p. 125-128, 1966.

41. HASEMAN, N.K.; REED, N.L. Rosenthal As. Monoclonal antibody imaging of occult prostate cancer in patients with elevated prostate specific antigen: positron emission tomography and biopsy correlation. **Clin. Nucl. Med.**, v. 21, p. 703-713, 1996.
42. HOROSZEWICZ, J.S.; LEONG, S.S.; KAWINSKI, E.; KARR, J.P.; ROSENTHAL, H.; CHU, T.M.; MIRAND, E.A.; MURPHY, G.P. LNCaP model of human prostatic carcinoma. **Cancer Res.**, v. 43, p. 1809-1818, 1983.
43. HOROSZEWICZ, J.S.; KAWINSKI, E.; MURPHY, G.P. Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. **Anticancer Res.**, v. 7, p. 927-936, 1987.
44. ISRAELI, R.S.; POWELL, C.T.; FAIR, W.R.; HESTON, W.D. Molecular cloning of a complementary dna encoding a prostate-specific membrane antigen. **Cancer Res.**, v. 3, p. 227-230, 1993.
45. ISRAELI, R.S.; MILLER, W.H.; SU, S.L.; POWELL, C.T.; FAIR, W.R.; SAMADI, D.S.; HURYK, R.F.; DE BLASIO, A.; EDWARDS, E.T.; WISE, G.J.; HESTON, W.D. Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction of circulating prostatic tumor cells: comparisons of prostatic-specific membrane antigen and prostatic-specific antigen based assays. **Cancer Res.**, v. 54, p. 6306-10, 1994A.
46. ISRAELI, R.S.; POWELL, C.T.; CORR, J.G.; FAIR, W.R.; HESTON, W.D.W. Expression of the prostate-specific membrane antigen. **Cancer Res.**, v. 54, p. 1807-11, 1994b.
47. FAIR, W.R.; ISRAELI, R.S.; HESTON, W.D. Prostate-specific membrane antigen. **Prostate**, v. 32, p. 140-8, 1997.
48. GALA, J.L.; HEUSTERSPREUTE, M.; LORIC, S.; HANON, F.; TOMBAL, B.; Van CANGH, P.; NAYER, P.; PHILIPPE, M. Expression of prostate specific membrane antigen transcripts in blood cells: implications for the detection of hematogenous prostate cells and standardization. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 472-81, 1998.
49. GANN, P.H.; HENNEKENS, C.H.; STAMPFER, M.J. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection prostatic cancer. **JAMA**, v. 273, p. 289-294, 1995.

50. GHOSSEIN, R.A.; SCHER, H.I.; GERALD, W.L.; KELLY, W.K.; CURLEY, T.; AMSTERDAM, A.; ZHANG, Z.F.; ROSAI, J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. **J. Clinic. Oncology**, p. 1195-1200, 1995.
51. GOMELLA, L.G.; RAJ, G.V.; MORENO, J.G. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen in the management of prostate cancer. **J. Urol.** v. 158, p. 326-37, 1997.
52. GONG, M.C.; CHANG, S.S.; WATT, F.; O'KEEFE, D.S.; BACICH, D.J.; UCHIDA, A.; BANDER, N.H.; REUTER, V.E.; GAUDIN, P.B.; MOLLOY, P.L.; SADELIAN, M.; HESTON, W.D. Overview of evolving strategies incorporating prostate-specific membrane antigen as target for therapy. **Mol. Urol.** 2000 Fall, v. 4, n. 3, p. 217-222, 2000.
53. GRASSO, Y.Z.; GUPTA, M.K.; LEVIN, H.S.; ZIPPE, C.D.; KLEIN, E.A. Combined nested RT-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in prostate cancer patients, correlation with pathological stage. **Cancer Res.**, v. 58, p. 1456-1459, 1998.
54. HARA, M.; KOYANNAGI, Y.; INOUE, T. Some physicochemical characteristics of "Y-seminoprotein," an antigenic component specific for human seminal plasma. **Japanese Journal of Legal Med.**, v. 25, p. 322-326, 1971.
55. HEISE, J.; DIZIOL, P.; ZIERGOBEL, R. **Tumormarker, praktischer Einsatz und klinische Bedeutung**, v. 6, p. 85, 1994.
56. HENKE, W.; JUNG, M.; JUNG, K.; LEIN, M.; SCHLECHTE, H.; BERNDT, C.; RUDOLPH, B.; SCHNORR, D.; LOENING, S.A. Detection of PSA mRNA in blood by RT-PCR does not exclusively indicate prostatic tumor cells [letter]. **Clin. Chem.**, v. 42, p. 1499-1500, 1996.
57. HENKE, W.; JUNG, M.; JUNG, K.; LEIN, M.; SCHLECHTE, H.; BERNDT, C.; RUDOLPH, B.; SCHNORR, D.; LOENING, S.A. Increased analytical sensitivity of RT-PCR of PSA mRNA decreases diagnostic specificity of detection of prostatic cells in blood. **Int. J. Cancer**, v. 70, p. 52-6, 1997.
58. HENTTU, P.; LIAOS, S.; VIHKO, P. Androgens upregulate the human prostate specific antigen messenger ribonucleic acid mRNA but downregulate the prostatic acid phosphatase in the LNCaP cell line. **Endocrinology**, v. 130, p. 766-72, 1992.

59. HERMANEK, P.; SOBIN, L.H. (ed.). **TNM Classification of Malignant Tumours**. 4. Ed. 2. Revisão. 1992. International Union Against Cancer Geneva.
60. HESTON, W.D.W. Detection of hematogenous dissemination of prostatic cancer by RT-PCR with primers specific for prostate-specific membrane antigen. **Clin. Chem.**, v. 41, n. 12, p. 1687-1688, 1995.
61. HUDSON, M.A.; BAHNSON, R.R.; CATALONA, W.J. Clinical use of prostate-specific antigen in patients with prostate cancer. **J. Urol.**, v. 142, p. 1011-1017, 1989.
62. KAHN, D.; WILLIAMS, R.D.; SELDIN, D.W.; LIBERTINO, J.A.; HIRSCHHORN, M.; DREICER, R.; WEINER, G.J.; BUSHNELL, D.; GULFO, J. Radioimmunoscintigraphy with 111indium labeled CYT-356 for the detection of occult prostate cancer recurrence. **J. Urol.**, v. 152 (5 Pt 1), p. 1490-5, nov., 1994.
63. KAHN, D.; WILLIAMS, R.D.; MANYAK, M.J.; HASEMAN, M.K.; SELDIN, D.W.; LIBERTINO, J.A.; MAGUIRE, R.T. 111Indium-capromab pendetide in the evaluation of patients with residual or recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. The ProstaScint Study Group. **J. Urol.**, v. 159, n. 6, p. 2041-7, jun., 1998.
64. KASSABIAN, V.S.; BOTTLES, K.; WEAVER, R.; WILLIAMS, R.D.; PAULSON, D.F.; SCARDINO, P.T. Possible mechanism for seeding of tumor cells during radical prostatectomy. **J. Urol.**, v. 150, p. 1169, 1993.
65. KATZ, A.E.; OLSSON, C.A.; RAFFO, A.J.; CAMA, C.; PERLMAN, H.; SEAMAN, E.; O'TOOLE, K.M.; MCMAHON, D.; BENSON, M.C.; BUTTYAN, R.E. Molecular staging of prostate cancer with the use of enhanced reverse transcription pcr assay. **Urology**, v. 43, P. 765-75, 1994.
66. KAWAKAMI, M.; NAKAYAMA, J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. **Cancer Res.**, v. 57, p. 2321-2324, 1997.
67. LABRIE, F.; DUPONT, A.; SUBURU, R. Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate cancer. **J. Urol.**, v. 147, p. 846-852, 1992.
68. LANDIS, S.H.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P.A. Cancer statistics, 1999. **CA Cancer J. Clin.**, v. 49, n. 1, p.:8-10, 1999.

69. LEHRER, S.; TERK, M.; PICCOLI, S.P.; SONG, H.K.; LAVAGNINI, P.; LUDERER, A.A. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prostate specific antigen may be a prognostic indicator in breast cancer. **Brit. J. Cancer**, v. 74, p. 871-873, 1996.
70. LI, T.S.; BELING, C.G. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. **Fertil Steril.**, v. 24, p. 134-138, 1973.
71. LILJA, H. A kallikreine-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p.1899-1903, 1985.
72. LILJA, H. Christensson A, Dahlen U – Prostate-specific antigen in human serum occurs predominantly in complex with alpha₁-antichymotrypsin. **Clin. Chem.**, v. 37, p. 1618-1625, 1991.
73. LINTULA, S.; STENMAN, U.H. Expression of prostate-specific membrane antigen in peripheral blood leukocytes **J. Urol.**, v.157, p. 1969-1972, 1997.
74. LIOTTA, L.A.; KOHN, E.; STEEG, P.S.; STETLER-STEVENSON, W. Molecular biology of metastasis. In: S. Broder (ed.), **Molecular Foundations of Oncology**, Ed. 1, pp. 57-81. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991.
75. LITTRUP, P.J.; KANE, R.A.; WILLIAMS, C.R.; METTLIN, C.J. Determination of prostate volume with transrectal US for cancer screening. **Radiology**, v. 178, p. 537-542, 1991.
76. LITTRUP, P.J.; KANE, R.A.; METTLIN, C.J. Cost-effective prostate cancer detection. **Cancer**, v.74, p. 3146-3158, 1994.
77. LOPES, A.D.; DAVIS, W.L.; ROSENSTRAUS, M.J.; UVEGES, A.J.; GILMAN, S.C. Immunohistochemical and pharmacokinetic characterization of the site-specific immunoconjugate CYT-356 derived from antiprostata monoclonal antibody 7E11-C5. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6423-6429, 1990.
78. LORIC, S.; DUMAS, F.; ESCHWEGE, P.; BLANCHET, P.; BENOIT, G.; JARDIN, A.; LACOUR, B. Enhanced detection of hematogenous circulating prostatic cells in patients with prostatic adenocarcinoma by using nested reverse transcription polymerase chain reaction assay based on prostate-specific membrane antigen. **Clin. Chem.**, v. 41, p. 1698-1704, 1995.
79. LUDERER A.A.; CHEN, Y.T.; SORIANO, T.F. Measurements of the proportion of free to total prostate-specific antigen improves diagnostic performance of prostate-specific antigen in the diagnostic gray zone of total prostate-specific antigen. **Urology**, v. 146, p. 187-194, 1995.

80. LUNDWALL, A.; LILJA, H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. **FEBS Letters**, v. 214, p. 317-322, 1987.
81. MAGUIRE, R.T.; PASCUCCHI, V.L.; MAROLI, A.N.; GULFO, J.V. Immunoscintigraphy in patients with colorectal, ovarian, and prostate cancer. Results with site-specific immunoconjugates. **Cancer**, v. 1, n. 72 (11 Suppl), p. 3453-62, dec., 1993.
82. MAJEED, A.; BABB, P.; JONES, J.; QUINN, M. Trends in prostate cancer incidence, mortality and survival in England and Wales 1971-1998. **BJU International**, v. 85, p. 1058-1062, 2000.
83. MANN, K. Tumormarker beim Hodenkarzinom. **Urologe**, v. A 29, p. 77-86, 1990.
84. McGEE, R.S.; HERR, J.C. Human seminal vesicle-specific antigen is a substrate for prostate-specific antigen (or P-30). **Biol. Reprod.**, v. 39, p. 499-510, 1988.
85. MENON, M. Editorial: Predicting biological aggressiveness in prostate cancer – desperately seeking a marker. **J. Urol.**, v. 157, p. 228-229, jan., 1997.
86. METTLIN, C.; JONES, G.W.; AVERETTE, H.; GUSBERG, S.B.; MURPHY, G.P. Defining and updating the American Cancer Society guidelines for the cancer related check-up: prostate and endometrial cancer. **CA Cancer J. Clin.**, v. 43, p. 42-46, 1993.
87. MONNE, M.; CROCE, C.; YU, H.; DIAMANDIS, E.P. Molecular characterization of prostate-specific antigen messenger RNA expressed in breast tumors. **Cancer Res.**, v. 54, p. 6344-7, 1994.
88. MORENO, J.G.; CROCE, C.M.; FISCHER, R.; MONNE, M.; VIKHO, P.; MULHOLLAND, S.G.; GOMELLA, L.G. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. **Cancer Res.**, v. 52, p. 6110-2, 1992.
89. MORENO, J.G.; SHENOT, P.J.; SHUPP-BYRNE, D.; CORNELIA, L.G. Analysis of tumor spillage during radical prostatectomy using rt-pcr of prostate specific antigen. **Tech. Urol.**, v. 2, p. 54-7, 1996.

90. MURPHY, G.P.; HOLMES, E.H.; BOYNTON, A.L.; KENNY, G.M.; OSTENSON, R.C.; ERICKSON, S.J.; BARREN, R.J. Comparison of prostate specific antigen, prostate specific membrane antigen, and Incap-based enzyme-linked immunosorbent assays in prostatic cancer patients and patients with benign prostatic enlargement. **Prostate**, v. 26, n. 3, p. 164-8, mar., 1995a.
91. MURPHY, G.P.; RAGDE, H.; KENNY, G.; BARREN, R.J.; ERICKSON, S.J.; TJOA, B. Comparison of prostate specific membrane antigen and prostate specific antigen levels in prostatic cancer patients. **Anticancer Res.**, v. 15, n. 4, p. 1473-1479, 1995b.
92. MURPHY, G.P. Radioscintiscanning of prostate cancer. **Cancer**, v. 75, p. 1819-1822, 1995c.
93. MURPHY, G.P.; BARREN, R.J.; ERICKSON, S.J.; BOWES, V.A.; WOLFERT, R.L.; BARTSCH, G.; KLOCKER, H.; POINTNER, J.; REISSIGL, A.; MCLEOD, D.G.; DOUGLAS, T.; MORGAN, T.; KENNY, G.M.; RAGDE, H.; BOYNTON, A.L.; HOLMES, E.H. Evaluation and comparison of two new prostate carcinoma markers. free-prostate specific antigen and prostate specific membrane antigen. **Cancer**, v. 15, n. 78 (4), p. 809-18, aug., 1996a.
94. MURPHY, G.; TJOA, B.; RAGDE, H.; KENNY, G.; BOYNTON, A. Phase i clinical trial: t-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with hla-a0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. **Prostate**, v. 29, n. 6, p. 371-80, dec., 1996b.
95. MURPHY, G.P.; ELGAMAL, A.A.A.; SU, S.L.; BOSTWICK, D.G.; HOLMES, E.H. Current evaluation of the tissue localization and diagnostic utility of prostate specific membrane antigen. **Cancer**, v. 83, n. 11, p. 2259-2269, dec., 1998.
96. NOGUCHI, M.; MIYAJIMA, J.; ITOH, K.; NODA, S. Detection of circulating tumor cells in patients with prostate cancer using prostate specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction. **Int. J. Urol.**, v. 4, p. 374-379, 1997.
97. OEFELEIN, M.G.; KAUL, K.; HERZ, B.; BLUM, M.D.; HOLLAND, J.M.; KEELER, T.C.; COOK, W.A.; IGNATOFF, J.M. Molecular detection of prostate epithelial cells from the surgical field and peripheral circulation during radical prostatectomy. **J. Urol.**, v. 155, p. 238-42, 1996.

98. OEFELEIN, M.G.; KAUL, K.; HERZ, B.; BLUM, M.D.; HOLLAND, J.M.; KEELER, T.C.; COOK, W.A.; IGNATOFF, J.M. Molecular detection of prostate epithelial cells from the surgical field and peripheral circulation during radical prostatectomy. **J. Urol.**, v. 155, p. 238-42, 1996.
99. OESTERLING, J.E.; CHAN, D.W.; EPSTEIN, J.I. Prostate-specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. **J. Urol.**, v. 139, p. 766-772, 1988.
100. OESTERLING, J.E.; JACOBSEN, S.J.; CHUTE, C.G. Serum prostate specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. **JAMA**, v. 270, p. 860-865, 1993.
101. O'KEEFE, D.S.; SU, S.L.; BACICH, D.J.; Horiguchi, Y.; LUO, Y.; POWELL, C.T.; ZANDVLIET, D.; RUSSELL, P.J.; MOLLOY, P.L.; NOWAK, N.J.; SHOWS, T.B.; MULLINS, C.; VONDER HAAR, R.A.; FAIR, W.R.; HESTON, W.D. Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. **Biochim Biophys Acta.**, v. 26, n. 1443(1-2), p. 113-27, nov., 1998.
102. O'HARA, M.; NING, X.; VELTRI, R. W.; HEDICAN, S.P.; PARTIN, A.W.; SUBONG, E.N.P.; WALSH, P.C. Quantitative reverse transcriptase pcr for prostate specific antigen (q-rt-pcr-psa) detects basal psa mrna levels in peripheral blood from subjects without prostate cancer. *proc. amer. ass. Cancer Res.*, v. 37, p. 200, 1996.
103. OKEGAWA, T.; NODA, H.; KATO, M.; MIYATA, A.; NUTAHARA, K.; HIGASHIHARA, E. Value of reverse transcription polymerase chain reaction assay in pathological stage T3N0 prostate cancer. **Prostate 2000**, v. 1, n. 44 (3), p. 210-8, aug., 2000.
104. OLSSON, C.E.; GOLUBOFF, E.T. Detection and treatment of prostate cancer: perspective of the urologist. **J. Urol.**, v. 152, p. 1695-1699, 1994.
105. OLSSON, C.A.; VRIES, G.M.; RAFFO, A.J.; BENSON, M.C.; O'TOOLE, K.; CAO, Y.; BUTTYAN, R.E.; KATZ, A.E. Preoperative reverse transcription polymerase chain reaction for prostatic-specific antigen predicts treatment failure following radical prostatectomy. **J. Urol.**, v. 155, p. 1557-62, 1996.
106. OLSSON, C.A.; BUTTYAN, R.E. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used for molecular staging of prostate cancer patients. In: **Molecular Biology of Prostate Cancer**, p. 181-199. Ed.: With M, Altwein JE, Schmitz- Dräger B, Kuptz S. Walter de Gruyter. Berlin, New York, 1998.

107. PAPSIDERO, L.D.; WANG, M.C.; VALENZUELA, L.A. A prostate antigen in sera of prostate cancer patients. **Cancer Res.**, v. 40, p. 2428-2432, 1980.
108. PARKER, S.L.; TONG, T.; BOLDEN, B.; WINGO, P.A. Cancer Statistics, 1996. **CA Cancer J. Clin.**, v. 46, n. 1, p. 5-27, jan-feb., 1996.
109. PARTIN, A.W.; KELLY, C.A.; SUBONG, E.N.P. Measurement of the ratio of free PSA to total PSA improves prostate cancer detection for men with total PSA levels between 4.0-10.0 ng/ml (Abstract n°. 266). **J. Urol.**, v. 153, p. 295a, 1995.
110. POTOSKY, A.L.; MILLER, B.A.; ALBERTSEN, P.C.; KRAMER, B.S. The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. **JAMA**, v. 273, p. 548-552, 1995.
111. PRICE, K.D.; CLONTZ, D.R.; WOODWARD, W.L.; KAUFMAN, J.S.; DANIELS, J.M.; STOLZENBERG, S.J.; TEIGLAND, C.M. Detection and clearance of prostate cells subsequent to ultrasound-guided needle biopsy as determined by multiplex nested reverse transcription polymerase chain reaction assay. **Urology**, v. 52, p. 261-67, 1998.
112. ROBLES, J.M.; MORELL, A.R.; REDORTA, J.P. Clinical behavior of prostatic specific antigen and prostatic acid phosphatase: A comparative study. **Eur. Urol.**, v. 14, p. 360-366, 1988.
113. ROCHON, Y.P.; HOROSZEWICZ, J.S.; BOYNTON, A.L.; HOLMES, E.H.; BARREN, R.J.; ERICKSON, S.J.; KENNY, G.M.; MURPHY, G.P. Western blot assay for prostate-specific membrane antigen in serum of prostate cancer patients. **Prostate**, v. 25, n. 4, p. 219-23, oct., 1994.
114. ROSENSTROUS, M.J.; DAVIS, W.J.; LOPES, A.D.; D'ALEO, C.; GILMAN, S. In vitro and in vivo reactivity of anti-prostate monoclonal antibody immunoconjugate 7E11.C5.3-GYK-DTPA. **Antibody Immunoconjugates Radiopharm**, v. 3, p.54, 1990.
115. SANFORD, E.; GRZONKA, R.; HEAL, A.; HELAL, M.; PERSKY, L.; TYSON, I. Prostate cancer imaging with a new monoclonal antibody: a preliminary report. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 1, n. 5, p. 400-4, sep., 1994.
116. SEMJONOW, A.; HAMM, M.; RATHERT, P. Elimination kinetics of prostate-specific antigen serum and urine. **Int. J. Biol. Markers**, v. 9, n. 1, p. 15-20, 1994.

117. SENSABAUGH, G.F. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. **J. Forensic Sci.**, v. 23, p. 106-109, 1978.
118. SHEN, R.; SU, Z.Z.; OLSSON, C.A. et al. Identification of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression cloning and RNA differential display. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 6778-82, 1995.
119. SCARDINO, P.T.; WEAVER, R.; HUDSON, M.A. Early detection of prostate cancer. **Hum. Path.**, v. 23, p. 211-215, 1992.
120. SCHMIDT, B.; BENDHACK, M.L.; ACKERMANN, R.; SCHMITZ-DRÄGER, B.J. Special aspects of PSMA and PSA RT-PCR for the detection of disseminated prostate cells. In: **Molecular Biology of Prostate Cancer**, p. 161-167. Ed.: With M, Altwein JE, Schmitz- Dräger B, Kuptz S. Walter de Gruyter. Berlin, New York, 1998.
121. SCHOENFELD, A.; LUQMANI, Y.; SMITH, D.; O'REILLY, S.; SHOUSHA, S.; SINNET, H.D.; COOMBES, R.C. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. **Cancer Res.**, v. 54, p. 2286-90, 1994.
122. SHOCK, N.W.; GREULICH, R.C.; ANDRES, R. **Normal human aging: The Baltimore Longitudinal Study of Aging**. Washington DC, US Government Printing Office (NIH publication n. 84-2450), 1984.
123. SILVER, D.A.; PELLICER, I.; FAIR, W.R.; HESTON, W.D.W.; CORDON-CARDO, C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. **Clin. Cancer Res.**, v. 3, p. 81-85, 1997.
124. SLAWIN, K.M.; OHORI, M.; DILLIOGLUGIL, O.; SCARDINO, P.T. Screening for prostate cancer: an analysis of the early experience. **CA Cancer J. Clin.**, v. 45, p. 134-145, 1995.
125. SMITH, M.R.; BIGGAR, S.; HUSSAIN, M. Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: implications for the detection of micrometastases. **Cancer Res.**, v. 55, p. 2640-4, 1995.
126. SMITH, D.S.; CATALONA, W.J. The nature of prostate cancer detected through prostate specific antigen based screening. **J. Urol.**, v. 152, p. 1732-1736, 1994

127. SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. **Tumores Prostáticos, I Consenso Brasileiro – Câncer da Próstata, II Encontro de Consenso Nacional - HPB – Hiperplasia Prostática Benigna**. BG Cultural, São Paulo – SP, 1998.
128. SOKOLOFF, M.H.; TSO, C.L.; KABOO, R.; NELSON, S.; KO, J.; DOREY, F.; FIGLIN, R.A.; PANG S, D.E.; KERNION, J.; BELLDEGRUN, A. Quantitative polymerase chain reaction does not improve preoperative prostate cancer staging: a clinicopathological molecular analysis of 121 patients. **J. Urol.**, v. 156, p. 1560-6, 1996.
129. SOKOLOFF, M.H.; PATEL, A.; TSO, C.L.; DEKERNION, J.; BELLDEGRUN, A. Surgical manipulation does not result in hematogenous dissemination of prostate cancer [PC] cells. **J. Urol.**, v. 155, p. 528A, abstract 869, 1996.
130. SPAPEN, S.J.J.C.; DAMHUIS, R.A.M.; KIRKELS, W.J. Trends in the curative treatment of localized prostate cancer after the introduction of prostate-specific antigen: data from Rotterdam Cancer Registry. **BJU International**, v. 85, p. 474-480, 2000.
131. STAMEY, T.A.; YANG, N.; HAY, A.R. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 909-916, 1987.
132. STAMEY, T.A. **Prostate Cancer: Predicting Outcomes. Highlights of the American Urological Association's 2000 Annual Meeting in Atlanta, Georgia**. Marathon Multimedia, 2000. CD-ROM.
133. STENMAN, U.H.; LEINONEN, J.; ALFTHAN, H. A complex between prostate-specific antigen and alpha1-antichymotrypsin is the major form of prostate specific antigen in serum of patients with prostate cancer: Assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. **Cancer Res.**, v. 51, p. 222-226, 1991.
134. STONE, K,R,; MICKEY, D.D.; WUNDERLI, H.; MICKEY, G.H.; PAULSON, D.F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU-145). **Int. J. Cancer**, v. 21, p. 274-281, 1998.
135. STONE, N.N.; DEANTONI, E.P.; CRAWFORD, E.D. Screening for prostate cancer by digital rectal examination and prostate-specific antigen: Results of prostate cancer awareness week, 1989-1992. **Urology**, v. 44, p.18-25, 1994.

136. SU, S.L.; BOYNTON, A.L.; HOLMES, E.H.; ELGAMAL, A.A.; MURPHY, G.P. Detection of extraprostatic prostate cells utilizing reverse transcription-polymerase chain reaction. **Semin. Surg. Oncol.** 2000, v. 18, n. 1, p. 17-28, jan-feb., 2000.
137. TIBBLIN, G.; WELIN, L.; BERGSTRON, R. The value of prostate specific antigen in early diagnosis of prostate cancer: The study of men born in 1913. **J. Urol.**, v. 154, p.1386-1389, 1995.
138. TJOA, B.A.; ERICKSON, S.J.; BOWES, V.A.; RAGDE, H.; KENNY, G.M.; COBB, O.E.; IRETON, R.C.; TROYCHAK, M.J.; BOYNTON, A.L.; MURPHY, G.P. Follow-up evaluation of prostate cancer patients infused with autologous dendritic cells pulsed with PSMA peptides. **Prostate**, v. 1, n.32 (4), p. 272-8, sep., 1997.
139. TROYER, J.K.; BECKETT, M.L.; WRIGHT Jr., G.L. Detection and characterization of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) in tissue extracts and body fluids. **Int. J. Cancer**, v. 62, p. 552-558, 1995.
140. Van STRAALEN, J.P.; BOSSENS, M.M.; REIJKE, T.M.; SANDERS, G.T. Biological half-life of prostate-specific antigen after radical prostatectomy. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 32, n. 2, p. 53-5, feb., 1994.
141. WANG, M.C.; VALENZUELA, L.A.; MURPHY, G.P. Purification of the human prostate specific antigen. *investigative*. **Urology**, v 17, p. 159-63, 1979.
142. WANG, M.C.; PAPSIDERO, L.D.; KURIYAMA, M. Prostate antigen: A new potential marker for prostatic cancer. **Prostate**, v. 2, p. 89-96, 1981.
143. WRIGHT, G.L.; MAYER GROB, B.; HALEY, C.; GROSSMAN, K.; NEWHALL, K.; PETRYLAK, D.; TROYER, J.; KONCHUBA, A.; SCHELLHAMMER, P.F.; MORIARTY, R. Upregulation of prostate specific membrane antigen after androgen deprivation therapy. **Urology**, v. 48, p. 326-34, 1996a.
144. WRIGHT, G.L.; HALEY, C.; BECKETT, M.L.; SCHELLHAMMER, P.F. Expression of prostate specific membrane antigen in normal, benign and malignant prostate tissues. **Urol. Oncol.**, v. 1, p. 18-28, 1996b.

145. WYNANT, G.E.; MURPHY, G.P.; HOROSZEWICZ, J.S.; NEAL, C.E.; COLLIER, B.D.; MITCHELL, E.; PURNELL, G.; TYSON, I.; HEAL, A.; ABDEL-NABI, H. Immunoscintigraphy of prostatic cancer: preliminary results with ¹¹¹In-labeled monoclonal antibody 7E11-C5.3 (CYT-356). **Prostate**, v. 1, n. 18(3), p. 229-41, 1991.
146. YLIKOSKI, A.; SJÖROOS, M.; LUNDWALL, A.; KARP, M.; LÖVGREN, T.; LILJA, H.; LITIÄ, A. Quantitative reverse transcription PCR Assay with internal standard for the detection of Prostate-specific antigen mRNA. **Clin. Chem.**, v. 45, p. 1397-07, 1999.
147. YU, H.; DIAMANDIS, E.P.; LEVESQUE, M.; ASA, S.L.; MONNE, M.; CROCE, C.M. Expression of the prostate-specific antigen gene by a primary ovarian carcinoma. **Cancer Res.**, v. 55, p. 1603-7, 1995.
148. ZAHNG, Y.; ZIPPE, C.D.; Van LENTE, F.; KLEIN, E.A.; GUPTA, M.K. Combined nested reverse transcription-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in detecting circulating prostatic cells. **Clin. Cancer Res.**, v. 3, p. 1215-1220, 1997.
149. ZARGHAMI, N.; DIAMANDIS, E.P. Detection of prostate-specific antigen mRNA and protein in breast tumors. **Clin. Chem.**, v. 3, p. 361-6, 1996.
150. ZARGHAMI, N.; LEVESQUE, M.; D`COSTA, M.; ANGELPOULOU, K.; DIAMANDIS, E.P. Frequency of expression of prostate-specific antigen mRNA in lung tumors. **Amer. J. Clin. Path.**, v. 108, p. 84-90, 1997.

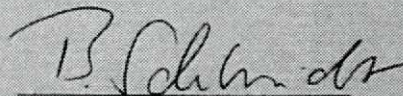
ANEXOS

DECLARAÇÃO DA UNIVERSIDADE HEINRICH-HEINE DE DÜSSELDORF

Düsseldorf, March 1st 2000

TO WHOM IT MAY CONCERN

I, Bettina Schmidt Ph.D., agree that Marcelo Luiz Bendhack – M.D. - presents the scientific work „Detection of prostate cells from peripheral blood of patients with prostate carcinoma using RT-PCR assays” at the University of Parana, in Curitiba (Brazil).


Bettina Schmidt, Ph.D.

CLASSIFICAÇÃO TNM 1998 E GLEASON

Para uma melhor compreensão a respeito dos tumores da próstata e sua classificação alguns aspectos de interesse são apresentados.

Durante um encontro de consenso os patologistas participantes definiram os seguintes tipos de neoplasia maligna possíveis de detecção na próstata (DENIS et al., 1995):

- adenocarcinoma acinar,
- adenocarcinoma ductal,
- adenocarcinoma mucinoso,
- carcinoma de células transicionais,
- carcinoma de células escamosas,
- tumor neuroendócrino,
- carcinoma anaplástico de pequenas células,
- carcinoma indiferenciado.

O estadiamento é válido somente para adenocarcinomas. O diagnóstico histológico é necessário (HERMANEK e SOBIN, 1992).

Classificação clínica TNM dos tumores de acordo com a “União Internacional Contra o Câncer” (AMIN e REUTER, 2000):

T – tumor primário.

TX O tumor primário não pode ser avaliado.

T0 Ausência de tumor primário.

T1 Tumor clinicamente não detectável, não palpável e não visível aos métodos de imagem.

T1a Tumor incidental em 5% ou menos do tecido ressecado ou enucleado.

T1b Tumor incidental em mais do que 5% do tecido ressecado ou enucleado.

T1c Tumor diagnosticado através de biópsia da próstata com agulha, indicada devido a valores elevados de PSA. Um tumor diagnosticado

através de biópsia por agulha em ambos os lobos porém impalpável ou invisível aos métodos de imagem também é classificado como T1c.

- T2 Tumor confinado à próstata.
- T2a Tumor acomete um lobo prostático.
- T2b Tumor acomete os dois lobos da próstata.
- T3 Tumor se estende através da cápsula prostática, no tecido extracapsular. Invasão do ápice prostático ou na cápsula prostática (mas não além desta em tecido periprostático) é classificado como T2.
- T3a Extensão extra-capsular uni ou bilateral.
- T3b Tumor infiltra vesícula(s) seminal(is).
- T4 Tumor fixo ou infiltra outras estruturas vizinhas que não a vesícula seminal.
- T4a Tumor infiltra colo vesical, e/ou esfíncter externo e/ou reto.
- T4b Tumor infiltra músculo elevador e/ou é fixo à parede pélvica.
- N** – linfonodos regionais. Linfonodos regionais são aqueles da pequena bacia, referentes sobretudo abaixo da bifurcação das artérias ilíacas comuns. A lateralidade não influencia a classificação N (linfonodos).
- NX** Sem informações a respeito dos linfonodos regionais.
- N0** Ausência de metástases em linfonodos regionais.
- N1** Metástase em linfonodo único de 2cm ou menos no maior diâmetro.
- N2** Metástases em linfonodo único de mais de 2 cm, porém menor ou igual a 5cm no maior diâmetro, ou em múltiplos linfonodos, nenhum deles com mais do que 5cm no maior eixo.
- N3** Metástase(s) em linfonodo(s) com mais do que 5cm no maior eixo.
- M** – Metástases à distância.
- MX** A presença de metástases à distância não pode ser avaliada.
- M0** Ausência de metástases à distância.
- M1** Metástases à distância.
- M1a Linfonodo(s) não regional(is).
- M1b Ossos
- M1c Outras localizações.

Obs.: Quando metástases em mais do que uma localização se faz presente, deve-se utilizar a maior classificação.

pTNM: Classificação patológica. As classificações pT, pN e pM correspondem às classificações T, N e M, respectivamente.

G: Gradação histopatológica.

GX A diferenciação histopatológica não pode ser avaliada.

G1 Bem diferenciado (anaplasia leve).

G2 Moderadamente diferenciado (anaplasia moderada).

G3-4 Pouco ou indiferenciado (anaplasia acentuada).

A classificação de **Gleason** e seu *score* ou soma também foram utilizados.

O soma de Gleason é calculada através da seguinte equação:

Grau primário (1 a 5) + Grau secundário (1 a 5)

O grau primário é o padrão histológico mais prevalente e o secundário o seguinte, mais comum. Se o padrão mais alto não é o mais predominante, ou o seguinte, isto deve ser mencionado pelo patologista.

A soma ou *score* de Gleason (sG) revela as seguintes possibilidades:

2 – 4 Tumor bem diferenciado.

5 – 6 Tumor moderadamente diferenciado.

7 Tumor moderadamente / pouco diferenciado.

8 – 10 Tumor pouco diferenciado.

TABELA A1 - NÚMERO DE TRANSCRITOS DE PSMA ENDÓGENO E CÉLULAS PROSTÁTICAS QUE EXPRESSAM PSMA NAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES SUBMETIDOS À RRP E MOSTRADOS NA FIGURA 3; CALCULADOS PELA RT-PCR PADRONIZADA

Amostra	Intensidade do sinal comparada à quantidade de MIMIC / reação	Intensidade do sinal comparada à quantidade de MIMIC / ml de sangue	Comparação com o número de células da próstata / ml sangue
A1	270	6750	13.5
A2	190	4750	9.4
A3	220	5500	11
B1	240	6000	12.1
B2	100	2500	5
B3	0	0	0
C1	0	0	0
C2	0	0	0
C3	34	850	1.7
D1	9.2	230	0.5
D2	0	0	0
D3	270	6750	13.5
E1	30	750	1.5
E2	0	0	0
E3	0	0	0
F1	23	575	1.1
F2	396	9900	19.8
F3	14	350	0.7
Controle negativo	0	0	0
10 x LNCaP/ml de sangue	200	5000	10

TABELA A2 – RESULTADOS DE RT-PCR PARA PSMA DE PACIENTES SUBMETIDOS À TUR-P POR BPH. AS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO FORAM OBTIDAS UM DIA ANTES (PRÉ-OPERATÓRIO) E EM ATÉ 30 MINUTOS APÓS O TÉRMINO DA CIRURGIA (INTRA-OPERATÓRIO)

Nr. do paciente	Pré-operatório	Intra-operatório
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	+
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	+	+
11	-	-
12	+	-
13	+	+
14	-	-
15	-	+
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-

TABELA A3 – RESULTADOS DE RT-PCR PARA PSMA DE PACIENTES SUBMETIDOS À RRP POR PCA. AS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO FORAM OBTIDAS UM DIA ANTES (PRÉ-OPERATÓRIO), EM ATÉ 30 MINUTOS (INTRA-OPERATÓRIO) E 14 DIAS APÓS A CIRURGIA (PÓS-OPERATÓRIO)

PCa / RRP (Nr.)	pT	pN	R	Score de Gleason	Grau	Pré	Intra	Pós
1	2b	0	1	4	1	-	-	-
2	2b	0	1	4	2	-	-	-
3	2b	0	1	4	2	-	-	-
4	2a	0	0	5	2	-	-	-
5	2a	2	0	5	2	-	-	-
6	3a	0	1	5	2	-	-	-
7	3a	0	0	5	2	-	-	-
8	2a	0	0	6	2	-	-	-
9	2b	0	0	6	2	-	-	-
10	2a	0	0	7	2	-	-	-
11	2a	0	0	7	2	-	-	-
12	3a	0	1	7	2	-	-	-
13	3b	0	1	7	2	-	-	-
14	3b	0	1	7	2	-	-	-
15	3a	0	1	9	3	-	-	-
16	4a	0	1	9	3	-	-	-
17	3a	1	1	9	3	-	-	-
18	3a	0	0	7	2	-	-	-
19	2b	2	1	8	3	-	-	-
20	2b	0	0	5	2	-	-	+
21	2a	0	0	4	1	-	-	+
22	2a	0	1	6	2	-	-	+
23	3a	0	0	7	2	-	-	+
24	2a	1	1	5	2	-	+	-
25	3a	0	1	7	2	-	+	-
26	3b	0	0	9	3	-	+	-
27	3a	1	1	8	3	-	+	+
28	3a	0	1	5	2	+	-	-
29	3b	0	1	8	3	+	-	-
30	3a	0	0	5	2	+	-	-
31	3b	0	0	7	3	+	-	+
32	3a	1	1	8	3	+	-	+
33	3a	1	1	9	3	+	-	+
34	2a	0	1	5	2	+	+	-
35	4a	1	1	7	2	+	+	-
36	2a	0	0	8	3	+	+	+
37	3b	0	0	8	3	+	+	+
38	3a	1	1	8	3	+	+	+

PCa = carcinoma da próstata; RRP = prostatectomia radical retro-púbica; pT = estadiamento patológico do tumor [TNM 1998 (ver anexos)]; pN = estadiamento relacionado ao linfonodo (TNM 1998); R = situação da margem cirúrgica da peça de prostatectomia radical; Pre, Intra e Pos = referente ao tempo de cirurgia.