

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina de Botucatu

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *STEAP1* E
STEAP2 EM ADENOCARCINOMAS DE PRÓSTATA POR
RT-PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL**

SHADIA MUHAMMAD IHLASEH

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista –
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Patologia

Botucatu - SP

2008

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina de Botucatu

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *STEAP1* E *STEAP2* EM
ADENOCARCINOMAS DE PRÓSTATA POR RT-PCR
QUANTITATIVA EM TEMPO REAL**

Mestranda: Shadia Muhammad Ihlaseh

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Co-orientadora: Prof. Dra. Silvia Regina Rogatto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia

Botucatu - SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Ihlaseh, Shadia Muhammad.

Análise da expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2* em adenocarcinomas de próstata por RT-PCR quantitativa em tempo real / Shadia Muhammad Ihlaseh.
– Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Co-orientadora: Silvia Regina Rogatto

Assunto CAPES: 40105008

1. Câncer - Próstata - Aspectos genéticos 2. Patologia

CDD 616.994

Palavras-chave: Adenocarcinoma de próstata; Correlação clínica; Gene *STEAP1*; Gene *STEAP2*; RT-PCR quantitativa em tempo real

Dedico este trabalho ao meu pai Muhammad e minha mãe Zilda (*in memoria*) pelo amor incondicional e pelo exemplo de perseverança, respeito e fé...

“O tempo não pára! Só a saudade é que faz as coisas pararem no tempo...”

(Mario Quintana)

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, Dr. João Lauro Viana de Camargo, pelos ensinamentos que nos faz ver mais claro e pelo exemplo diário de dedicação e honestidade à pesquisa.

À minha co-orientadora, Dra. Silvia Regina Rogatto, pela sua capacidade de instigar em mim o senso crítico de fazer ciência.

“Eu aprendi que para crescer como pessoa é preciso me cercar de gente mais inteligente do que eu.”

(William Shakespeare)

Agradecimentos

A Deus, que só pode estar em primeiro lugar na minha vida, por tudo... Obrigada!

Ao meu namorado Caio, pelo amor, cumplicidade e compreensão... essa conquista também é sua...

Àos meus avós, Faustino e Ana, e toda minha família, pelas orações e incentivo.

Aos meus amigos: Ivana, Carol, Diego, Rebeca, Renato, Mariana, Juliana, Cibele pela alegria que vocês me passam, tornando o dia seguinte sempre mais leve.

Aos amigos do laboratório Toxicam: Carla, Marize, Meire, Alexandre, Merielen, Tony, Paula, João, João Paulo, Bianca, Mitscheli, Ana Paula, Gabrielli, Cristina, Paulo, Mara, Viviane e Luciana pelo companheirismo e amizade.

Ao Dr. José Carlos de Souza Trindade Filho, à Dra. Maria Domingues e ao Dr. Fernando Soares por colaborarem com meu amadurecimento como pós-graduanda.

Aos funcionários do departamento de Patologia: Zé Carlos, Ronaldo, Du, Milena, Ivana, Cris, Marquinhos, Chico, Claudinei, Luciano, Cícera, Lúcia e Denise pela colaboração de alguma forma nesse trabalho.

Ao pessoal do NeoGene laboratório pelo apoio e amizade, em especial, Sandra, Fabíola, Rodrigo, Greicy, Carlos, Flávia, André e Fernanda que me ajudaram mais diretamente na execução do projeto.

Aos pacientes, que aceitaram participar desse estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

Índice

Revisão de Literatura

1. Epidemiologia do adenocarcinoma de próstata (CaP).....	01
2. Apectos clínicos e histopatológicos do CaP.....	02
3. Alterações genéticas e CaP.....	04
4. Genes <i>STEAP1</i> e <i>STEAP2</i>	06
5. RT-PCR quantitativa em tempo real.....	07

Referências Bibliográficas	09
---	----

Manuscrito	14
-------------------------	----

Resumo.....	15
-------------	----

Abstract.....	16
---------------	----

Introdução.....	17
-----------------	----

Material e Métodos.....	19
-------------------------	----

Resultados.....	22
-----------------	----

Discussão.....	23
----------------	----

Conclusão.....	25
----------------	----

Tabela I e Figuras.....	26
-------------------------	----

Referências Bibliográficas.....	29
---------------------------------	----

Apêndice

Tabela II	32
-----------------	----

Anexos

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	34
---	----

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	35
---	----

Revisão da Literatura

1. Epidemiologia do adenocarcinoma de próstata

O câncer de próstata (CaP) é considerado um sério problema de saúde pública devido suas altas taxas de incidência e mortalidade. É a segunda causa de óbitos por câncer em homens, superado apenas pelo câncer de pulmão e representa cerca de 10% do total de câncer no mundo. No Brasil, estima-se a ocorrência de 49.530 novos casos em 2008, contra 47.280 casos em 2006 (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2008). O aumento observado nas taxas de incidência verificado nos últimos anos pode ser parcialmente justificado pelo progressivo aumento da eficácia investigativa dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos programas de rastreamento e sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida do brasileiro.

Os principais fatores de risco para o câncer de próstata são idade avançada, etnia e predisposição familiar. O envelhecimento é considerado o fator de risco mais significativo. Estudos realizados principalmente em autópsias estimam que aos 80 anos, aproximadamente 70% dos homens devam possuir células neoplásicas na próstata (Soos et al., 2005). A incidência do CaP difere substancialmente entre os grupos étnicos. Os afro-americanos têm incidência de 10 a 40 vezes maiores que os asiáticos (Hsing et al., 2000). A magnitude estimada do risco relativo em parentes de primeiro grau de afetados não parece diferir significativamente entre os grupos raciais (africanos, caucasianos e asiáticos) embora, ocorram grandes diferenças na incidência da doença entre estes grupos. Parentes de primeiro grau de pacientes com CaP apresentam risco aumentado de 2 a 3 vezes, quando comparado a homens na população geral (Carter et al., 1990; Goldgar et al., 1994). Entre outros fatores de risco encontram-se a alimentação

altamente calórica e desequilíbrio nos níveis de hormônios masculinos (Epstein et al., 2005a).

2. Aspectos clínicos e histopatológicos do CaP

A próstata é uma glândula exócrina do sistema reprodutor masculino localizada na base da bexiga e envolvendo completamente um segmento da uretra. Apresenta estrutura compacta e nela podem ser consideradas quatro regiões anatômicas distintas: zona periférica, de transição, central e estroma fibromuscular anterior (Sampson et al., 2007). Aproximadamente 70% das neoplasias epiteliais prostáticas têm origem na zona periférica (McNeal, 1986; Che & Grignon, 2002), enquanto que a hiperplasia nodular da próstata (HNP) ocorre preferencialmente na zona de transição da glândula.

Em geral, o adenocarcinoma da próstata apresenta crescimento lento e sem manifestações clínicas, levando aproximadamente 15 anos para atingir 1 cm³, o que favorece a presença da doença local ampliada ao diagnóstico. Em vista disso, os estudos se voltaram para o diagnóstico precoce da doença. A implementação na rotina da determinação dos níveis séricos do PSA (antígeno específico da próstata) aumentou consideravelmente as taxas de detecção precoce do adenocarcinoma de próstata. Este antígeno é produzido pelas células epiteliais superficiais dos ácinos prostáticos e é secretado diretamente para o sistema de ductos da glândula; sua transcrição é regulada por andrógenos e, em geral, os seus níveis aumentam conforme o volume e extensão da neoplasia. Algumas críticas a esse exame referem-se à sua baixa sensibilidade para distinguir o câncer de doenças benignas, como hiperplasia nodular da próstata e prostatites, e detectar o CaP em indivíduos com valores baixos de PSA, como é o caso de pacientes com histórico familiar de adenocarcinoma prostático (De Marzo et al., 2007). Variações do PSA são utilizadas para aumentar sua especificidade diagnóstica,

como é o caso da velocidade de duplicação do PSA, ou ainda monitorar a recorrência do CaP após prostatectomia radical, pelo tempo livre da doença ou de recidiva bioquímica pós-cirúrgicos, i.e., valores de PSA iguais ou maiores que 0,4ng/mL indicam recorrência tumoral (Lang et al., 1989; Stephenson et al., 2006). Porém, esse valor de referência é controverso, pois em recente consenso europeu foi considerada a possibilidade de tratamento quando os valores de PSA são iguais ou maiores que 0,2 ng/mL, seguidos por elevação subsequente (Boccon-Gibod et al., 2004).

Quando diagnosticados, os adenocarcinomas de próstata são classificados pelo sistema TNM (T:tamanho do tumor, N: linfonodos comprometidos, M: metástase) para definição do seu estágio (tamanho e disseminação do tumor) (Epstein et al., 2004) e pelo sistema de Gleason, para sua graduação (diferenciação histológica da neoplasia) (Epstein et al., 2005b). Este sistema considera cinco padrões histológico do tumor, que apresentam indiferenciação crescente (padrões 1 a 5 de Gleason). O escore da graduação histológica é baseado na soma dos padrões mais prevalentes, de modo que a graduação varia de 2 (1+1), quando há um só padrão, bem diferenciado, até 10 (5+5), quando todo o tumor é praticamente indiferenciado. Em termos de prognóstico, os escores 2-4 são classificados como bem diferenciados; 5, 6 e 7 (3+4) como moderadamente diferenciado, e 7(4+3), 8, 10 como pouco diferenciados. O estadiamento inicialmente é feito pela extensão da doença ao exame anatomopatológico. Os tumores pT1 são do tipo incidental, encontrados em produtos de ressecção de hiperplasia nodular da próstata ou em necropsias. Quanto à capacidade invasiva do tumor pode-se considerar os tumores pT2 (confinados na glândula), subdivididos em pT2a (apresentam 50% ou menos de envolvimento de um lobo), pT2b (envolvem mais de 50% de um lobo) e pT2c (envolvem ambos os lobos), e os tumores pT3, que são subdivididos em pT3a (com extensão extra-prostática) e pT3b (invasão das vesículas

seminais). Os fatores prognósticos essenciais no CaP são estadiamento, grau histológico e níveis séricos de PSA. A combinação destas três variáveis permite uma melhor avaliação do prognóstico do que a análise de qualquer uma delas isoladamente (Partin et al., 1997). Outra característica com importância prognóstica é a capacidade do tumor invadir vasos sanguíneos e linfáticos, não contemplada pelo sistema TNM (Epstein et al., 2005a; Antunes et al., 2006).

Segundo Nelson et al. (2004), baseando-se no modelo de progressão clínica altamente variável dos cânceres, o CaP é uma entidade que representa, na verdade, múltiplas doenças. O presente estudo procurou abranger apenas os fatores prognósticos mais utilizados na prática clínica, para serem correlacionados ao perfil de expressão de genes candidatos a marcadores moleculares do CaP.

Os CaPs são heterogêneos em seus aspectos clínico, morfológico e biomolecular. Apesar dos parâmetros clínicos e histológicos serem úteis para a classificação dos cânceres prostáticos, estes não são capazes de diferenciar adenocarcinomas prostáticos indolentes dos invasivos. Em geral, os marcadores utilizados ao diagnóstico e na avaliação da progressão da doença não correspondem de forma satisfatória à evolução dos pacientes e, portanto, há necessidade da identificação de novos marcadores.

3. Alterações genéticas e CaP

O CaP possui natureza multifocal dentro da glândula e se desenvolve devido ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas (Shand e Gelmann, 2006). Vários estudos identificaram alterações genômicas não-randômicas, isto é, regiões cromossômicas aparentemente envolvidas de modo não-casual com o início e progressão da neoplasia. Perdas cromossômicas em 1p, 5q, 6q, 8p, 8q, 10p, 10q, 13q,

16q, 17p, 18q e Y e ganhos em 1q, 2p, 7, 8q, 17p, 17q, 18q e Xq foram registradas pela técnica de hibridação genômica comparativa (CGH) (Zhang et al., 2003; Fromont et al., 2005). Ganho genômico do cromossomo 7 foi associado com comportamento agressivo do CaP (Das et al., 2005). Igualmente, vários genes foram relacionados com o CaP, como o *ERBB1*, *PAI*, *RAF* e o *EZH2*, mapeados no cromossomo 7 (Vogel et al., 2001); o gene *RB* (Maddison et al., 2004); o *APC* (Brewster et al., 1994; Gerstein et al., 2002); o *TP53* associado a CaP avançado ou metástase (Yang et al., 1996; Lin et al., 2005); o *BRCA1* (Langston et al., 1996; Horsburgh et al., 2005); o *TP16* (Jarrard et al., 2002); o *AR* (Visakorpi et al., 1995; Terry et al., 2006); os genes relacionados à atividade da telomerase (Zhang et al., 1998); os genes reguladores de apoptose, como o *BCL2* (McDonnell et al., 1997; Chi 2005); o gene *GST*, associado à biotransformação de drogas; o *NKX3.1*, localizado em 8p21 (Ju et al., 2006); o *PTEN*, localizado no cromossomo 10 e associado à regulação da fosfatidilinositol (Wang et al., 2006) e o gene da E-caderina (Bonilla et al., 2006). Esses dados mostram a existência de grande heterogeneidade no perfil de alterações genéticas no adenocarcinoma de próstata.

Em trabalho anterior desenvolvido no NeoGene Laboratório, coordenado pela Dra. Silvia Regina Rogatto nesta Faculdade de Medicina, foram identificados, pela metodologia de CGH-*array*, regiões contendo alto nível de ganho e perda genômica em adenocarcinomas prostáticos. Os genes *STEAP1* e *STEAP2* (*Six-transmembrane epithelial antigen of prostate1* e 2, respectivamente) estão mapeados em 7q21.13, uma das regiões que apresentaram alto nível de amplificação nesse estudo (Santos, 2007). Por esta razão estes genes foram selecionados como alvos potenciais de pesquisa para a compreensão de seu papel no desenvolvimento do adenocarcinoma de próstata.

4. Genes *STEAP1* e *STEAP2*

Os genes *STEAP1* (sinônimos: *MGC19484*, *PRSS24*, *STEAP*) e *STEAP2* (sinônimos: *IPCA1*, *PCANAP1*, *PUMPCn*, *STAMP1*, *STMP*) (*Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 1* e *2*, respectivamente) estão localizados no cromossomo 7q21.13 e pertencem a uma família gênica ainda pouco estudada, composta por esses dois genes e mais os genes *STEAP3* e *STEAP4* (Ohgami et al., 2006; National Center for Biotechnology Information – NCBI, 2007).

O gene *STEAP1* é predominantemente expresso em próstata humana normal, mas possui expressão aumentada em várias linhagens celulares de cânceres, como de próstata, bexiga, ovário, cólon, sarcoma de Ewing, rabiomiossarcoma e melanoma (Hubert et al., 1999; Rodeberg et al., 2005). Estudos clínico e experimental também demonstraram a expressão aumentada de *STEAP1* em metástases ósseas e linfonodais do CaP (Yang et al., 2001; Challita-Eid et al., 2007). Na próstata, seus produtos gênicos foram identificados nas junções celulares do epitélio acinar. A proteína contém seis domínios transmembrânicos e terminações intracelulares amino e carboxil, o que sugere se tratar de canais iônicos envolvidos com a comunicação celular (Hubert et al., 1999; Ohgami et al., 2006; Challita-Eid et al., 2007). Sanches-Pulido et al. (2004) relacionaram as proteínas *STEAP1* e *STEAP2* com o crescimento tumoral, ao demonstrar em suas estruturas a presença do domínio ACRATA (Apoptosis, Cancer e Redox Associated Transmembrane domain), homólogo ao encontrado na estrutura de bactérias NADPH-oxidase (Nox), envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio. As proteínas *STEAP1* e *STEAP2* reúnem características de antígenos tumorais: expressão aumentada em diversos tipos de cânceres, expressão reduzida em tecidos normais (exceto próstata) e localização na superfície celular. Nesse sentido,

estudos *in vitro* e *in vivo* estão sendo realizados para identificar peptídeos dessas proteínas capazes de provocar resposta imune antitumoral, mediada por linfócitos T (Rodeberg et al., 2005; Alves et al., 2006; Garcia-Hernandez et al., 2007). Aparentemente, andrógenos sintéticos não alteram a expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2* (Hubert et al., 1999; Porkka et al., 2002).

O produto de *STEAP2* também está predominantemente expresso em próstata normal e secundariamente em ovário, pâncreas, duodeno, cérebro e fígado fetal (Korkmaz et al., 2002; Ohgami et al., 2006). Porkka et al. (2002) identificaram aumento da expressão gênica de *STEAP2* em tumores primários de CaP em relação à hiperplasia nodular de próstata. A proteína *STEAP2* foi localizada por imunofluorescência no complexo de Golgi e em estruturas vesículo-tubulares citoplasmáticas, sugerindo estar envolvida em sistemas secretores/endocíticos (Korkmaz et al., 2002). Considerando sua estrutura protéica e localização celular, testes *in vitro* demonstraram o envolvimento do produto gênico de *STEAP2* em reações de oxidorredução, sugerindo uma provável função de metalorredutase (Ohgami et al., 2006; Knutson, 2007).

5. RT-PCR quantitativa em tempo real

A técnica de RT-PCR quantitativa em tempo real é um método cinético que usa moléculas marcadas com fluorocromos específicos para quantificar seqüências de cDNA à medida que são amplificadas (Seuáñez et al., 2004). Esta metodologia tem sido usada como ferramenta na análise do perfil de expressão gênica em tumores humanos, incluindo o CaP, e permitido a identificação de candidatos a marcadores tumorais.. Ji et al. (2005) observaram redução da expressão do gene receptor de estrógeno β (*ESR2*), sugerindo que esse receptor possa mediar sinais supressores, de modo que sua ausência

promova proliferação celular nos tumores de próstata. Utilizando a mesma técnica, pesquisadores japoneses identificaram expressão aumentada do gene *PCA-1* (*prostate cancer antigen-1*) no CaP, mas não na hiperplasia nodular prostática e em tecido normal adjacente ao tumor (Konishi et al., 2005). Para o nosso conhecimento, ainda não há dados sobre o papel dos genes *STEAP1* e *STEAP2* no desenvolvimento e progressão do câncer da próstata, a não ser que encontram-se amplificados (Hubert et al., 1999; Yang et al., 2001; Ohgami et al., 2006). Faltam informações sobre a correlação entre os achados moleculares com os aspectos anatomopatológicos dos tumores e com as características clínicas dos pacientes.

Referências Bibliográficas

1. Alves PMS, Faure O, Graff-Dubois S, Cornet S, Bolonakis I, Gross D-A, et al. *STEAP*, a prostate tumor antigen, is a target of human CD8+ cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55(12):1515-23.
2. Antunes AA, Srougi M, Dall'Oglio MF, Crippa A, Paranhos M, Cury J, et al. Microvascular invasion is an independent prognostic factor in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *International Braz J Urol.* 2006; 32(6):668-77.
3. Boccon-Gibod L, Djavan WB, Hammerer P, Hoeltl W, Kattan MW, Prayer-Galetti T, et al. Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: a European Consensus. *Int J Clin Pract.* 2004; 58(4):382-90.
4. Bonilla C, Mason T, Long L, Ahaghotu C, Chen W, Zhao A, et al. E-cadherin polymorphisms and haplotypes influence risk for prostate cancer. *Prostate.* 2006; 66(5):546-56
5. Brewster SF, Browne S, Brown KW. Somatic allelic loss at the DCC, APC, NM23-H1 and p53 tumor suppressor gene loci in human prostatic carcinoma. *J Urol.* 1994; 151:1073-7.
6. Carter BS, Carter HB, Isaacs JT. Epidemiologic evidence regarding predisposing factors to prostate cancer. *Prostate.* 1990; 16:187-97.
7. Challita-Eid PM, Morrison K, Etessami S, Morrison ZAKJ, Perez-Villar JJ, Raitano AB, et al. Monoclonal antibodies to six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 inhibit intercellular communication *in vivo* and growth of human tumor xenografts *in vivo*. *Cancer Res.* 2007; 67(12): 5798-805.
8. Che M, Grignon D. Pathology of prostate cancer. *Cancer Metast Rev.* 2002; 21:381-395.
9. Chi KN. Targeting Bcl-2 with oblimersen for patients with hormone refractory prostate cancer. *World J Urol.* 2005; 23(1):33-7.
10. Das K, Lau W, Sivaswaren CR, Tan PH, Fook-Chong SMC, Tien SL, et al. Chromosomal changes in prostate cancer: A fluorescence in situ hybridization study. *Clin Genet.* 2005; 68(1):40.
11. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 256-69.

12. Epstein JI, Algaba F, Allsbrook Jr WC, Bastacky S, Boccon-Gibod L, De Marzo AM, et al. Tumours of the prostate: Acinar adenocarcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World health organization classification of tumours - Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC; 2004. p. 159-92.
13. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Humphrey PA, Mikuz G, et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2005a; 216:34-63.
14. Epstein JI, Allsbrook-Jr WC, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2005b; 29(9): 1228-42.
15. Fromont G, Valeri A, Cher M, Pontes JE, Vallancien G, Validire P, et al. Allelic loss at 16q23.2 is associated with good prognosis in high grade prostate cancer. *Prostate.* 2005; 9999:1-6.
16. Garcia-Hernandez M L, Gray A, Hubby B, Kast WM. In vivo effects of vaccination with six-transmembrane epithelial antigen of the prostate: a candidate antigen for treating prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1344-51.
17. Gerstein AV, Almeida TA, Zhao G, Chess E, Shih IeM, Buhler K, et al. APC/CTNNB1 (beta-catenin) pathway alterations in human prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; 34(1):9-16.
18. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86:1600-8.
19. Horsburgh S, Matthew A, Bristow R, Trachtenberg J. Male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a pilot study investigating medical characteristics of patients participating in a prostate cancer prevention clinic. *Prostate.* 2005; 65(2):124-9.
20. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer.* 2000; 85:60-7.
21. Hubert RS, Vivanco I, Chen E, Rastegar S, Leong K, Mitchell SC, et al. STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(25):14523-8.

22. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Tipos de câncer. Próstata. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2008 [cited 2008 jan 28]. Available from: <http://www.inca.gov.br/>.
23. Jarrard DF, Modder J, Fadden P, Fu V, Sebree L, Heisey D, et al. Alterations in the p16/pRb cell cycle checkpoint occur commonly in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Lett.* 2002; 185(2):191-9.
24. Ji Q, Liu PI, Elshimali Y, Stolz A. Frequent loss of estrogen and progesterone receptors in human prostatic tumors determined by quantitative real-time PCR. *Mol Cell Endocrinol.* 2005; 229(1-2):103-10.
25. Ju JH, Maeng JS, Zemedkun M, Ahronovitz N, Mack JW, Ferretti JA, et al. Physical and functional interactions between the prostate suppressor homeoprotein NKX3.1 and serum response factor. *J Mol Biol.* 2006; 360(5):989-99.
26. Knutson MD. Steap proteins: implications for iron and copper metabolism. *Nutr Reviews.* 2007;65(7): 335-40.
27. Konishi N, Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Mitsui E, Yoshikawa R, et al. High expression of a new marker PCA-1 in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(14):5090-7.
28. Korkmaz KS, Elbi C, Korkmaz CG, Loda M, Hager GL, Saatcioglu F. Molecular cloning and characterization of STAMP1, a highly prostate-specific six transmembrane protein that is overexpressed in prostate Cancer. 2002; 277(39):36689-96.
29. Lang PH, Ercole CJ, Lightner DJ, Fraley EE, Vessella R. The value of serum prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy. *J Urol.* 1989; 141(4): 873-9.
30. Langston AA, Stanford JL, Wicklund KG, Thompson JD, Blazej RG, Ostrander EA. Germ-line BRCA1 mutations in selected men with prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 1996; 58(4):881-5.
31. Lin JT, Wang JS, Jiann BP, Yu CC, Tsai JY, Huang JK, et al. Correlation of p53 protein accumulation and Bcl-2 overexpression with histopathological features in prostatic cancer. *J Formos Med Assoc.* 2005; 104(11):864-7.
32. Maddison LA, Sutherland BW, Barrios RJ, Greenberg NM. Conditional deletion of Rb causes early stage prostate cancer. *Cancer Res.* 2004; 64(17):6018-25.

33. McDonnell TJ, Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Conti C, von Eschenbach AC, et al. Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. *J Urol.* 1997; 157(2):569-74.
34. McNeal JE, Bostwick DG, Kindrachuk RA, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Patterns of progression in prostate cancer. *Lancet.* 1986; 1: 60-3.
35. National Center for Biotechnology Information – NCBI. [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2008 [last update 2008 jan 25; cited 2007 nov 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> .
36. Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol.* 2004; 172: 6-11.
37. Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metallo-reductases. *Blood.* 2006; 108(4):1388-94. (*in press*).
38. Partin AW, Kattan MW, Subong EN, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, et al. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. *Jama.* 1997; 227(18): 1445-51.
39. Porkka KP, Helenius MA, Visakorpi T. Cloning and characterization of a novel six-transmembrane protein STEAP2, expressed in normal and malignant prostate. *Lab Invest.* 2002; 82(11):1573-82.
40. Rodeberg DA, Nuss RA, ElSawa SF, Celis E. Recognition of six-transmembrane epithelial antigen of the prostate – expressing tumor cells by peptide antigen – induced cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(12):4545-52.
41. Sampson N, Untergasser G, Plas E, Berger P. The ageing male reproductive tract. *J Pathol.* 2007; 211: 206-18.
42. Sanches-Pulido L, Rojas AM, Valencia A, Martinez-A C, Andrade MA. ACRATA: a novel electron transfer domain associated to apoptosis and cancer. *BMC Cancer.* 2004; 4:98.
43. Santos RM. Assinatura genética em adenocarcinomas de próstata e suas metástases. [tese]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2007.
44. Seuánez HN, Moreira MAM, Otazú IB, Braggio E, Renault IZ. Métodos moleculares de diagnóstico. In: Ferreira CG, Rocha JC, editors. *Oncologia molecular.* São Paulo: Atheneu; 2004. p.13-27.

45. Shand RL, Gelmann EP. Molecular biology of prostate cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol.* 2006; 16: 123-31.
46. Soos G, Tsakiris I, Szanto J, Turzo C, Haas PG, Dezso B. The prevalence of prostate carcinoma and its precursor in Hungary: an autopsy study. *Eur Urol.* 2005; 48: 739-44.
47. Stephenson AJ, Kattan MW, Eatham JA, Dothan ZA, Bianco FI Jr, Lilja H, et al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 3973-8.
48. Terry S, Yang X, Chen MW, Vacherot F, Buttyan R. Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2006; 99(2):402-10.
49. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, et al. *In vivo* amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet.* 1995; 9(4):401-6.
50. Vogel W, Maier C, Paiss T. Prostate cancer and the problem of genotype phenotype correlation. *Cytogenet Cell Genet.* 2001; 93:162-7.
51. Wang S, Garcia AJ, Wu M, Lawson DA, Witte ON, Wu H. *PTEN* deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1480-5.
52. Yang G, Stapleton AM, Wheeler TM, Truong LD, Timme TL, Scardino PT, et al. Clustered p53 immunostaining: a novel pattern associated with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res.* 1996; 2(2):399-401.
53. Yang D, Holt GE, Velders MP, Kwon ED, Kast M. Murine six-transmembrane epithelial antigen of the prostate, prostate stem cell antigen, and prostate-specific membrane antigen: prostate-specific cell-surface antigens highly expressed in prostate cancer of transgenic adenocarcinoma mouse prostate mice. *Cancer Res.* 2001; 61: 5857-60.
54. Zhang W, Kapusta LR, Slingerland JM, Klotz LH. Telomerase Activity in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign prostatic epithelium. *Cancer Res.* 1998; 58(4):619-21.
55. Zhang KQ, Salzman SA, Reding DJ, Suarez BK, Catalona WJ, Burmester JK. Genetics of prostate cancer. *Clin Med & Res.* 2003; 1(1):21-8.

Expressão aumentada do gene *STEAP1* como marcador prognóstico em adenocarcinomas de próstata

Ihlaseh SM¹, Gambarini GHR², Trindade Filho JCS³, João Lauro Viana de Camargo⁴
Silvia Regina Rogatto⁵.

¹Mestranda, Laboratório TOXICAM, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brasil.

²Doutoranda, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brasil.

³Professor Assistente Doutor, Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brasil.

⁴Professor Titular de Patologia, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brasil.

⁵Professora Adjunta Doutora, NeoGene Laboratório, Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brasil.

Trabalho desenvolvido nos Departamentos de Patologia e de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP, SP, Brasil.

Correspondência: Dr. João Lauro Viana de Camargo

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP

Distrito de Rubião Júnior, s/n. Botucatu – SP. Brasil.

Cep: 18.618-000

e-mail: decam@fmb.unesp.br

Auxílios: Auxílio FAPESP (Processo 2006/58091-8); CNPq (Bolsa PQ - Processo 302361/2003); Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM); NeoGene Laboratório.

Manuscrito segundo as normas do Periódico *Prostate* (ISSN: 0270-4137) – fator de impacto 3.7.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é um problema de saúde pública devido suas altas taxas de incidência e de mortalidade. Atualmente, os marcadores disponíveis para o diagnóstico e prognóstico não são capazes de diferenciar os CaPs indolentes dos que progridem mais agressivamente. Estudos moleculares usando análises em larga escala, como hibridação genômica comparativa baseada em arrays (aCGH), permitem a identificação de vários genes candidatos a marcadores. Estudos prévios de nosso grupo usando hibridação aCGH em CaP demonstraram amplificação em 7q21.13, onde estão mapeados os genes *STEAP1* e *STEAP2* (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 1 e 2*). Esses genes apresentam expressão aumentada em diversas linhagens de células neoplásicas, incluindo as de próstata. No entanto, seu papel no desenvolvimento e progressão do CaP permanece desconhecido. Há evidências de que eles codificam antígenos tumorais com potencial para serem utilizados como marcadores prognósticos. O presente trabalho visou determinar o perfil de expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2* por RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) em adenocarcinomas primários de próstata, em amostras de tecido não-neoplásico adjacente aos tumores e em hiperplasias nodulares da próstata (HNP). Amostras de próstatas avaliadas histologicamente como normais foram obtidas de necropsias e usadas como controles. Os pacientes foram agrupados em três classes segundo o risco de recorrência do tumor (baixo, moderado e alto) de acordo com o PSA (antígeno prostático sérico), a graduação histológica e o estadiamento dos tumores. Foi observado aumento de expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2* em 28% e 38% das amostras, respectivamente; em três pacientes com alto risco de recorrência houve aumento simultâneo da expressão dos dois genes. A expressão do gene *STEAP2* mostrou correlação positiva com a expressão do gene *STEAP1* no CaP (Spearman $r=0,63$; $p<0,0001$) e no tecido não neoplásico adjacente ao tumor (Spearman $r=0,78$; $p=0,0002$). Houve aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão do gene *STEAP1* nas amostras de CaP com escore de Gleason $\geq 7(4+3)$ em relação ao tecido não-neoplásico adjacente ao tumor e também nos casos que apresentavam invasão angiolinfática. Esses dados sugerem que a expressão do gene *STEAP1* está associada a parâmetros anatomo-clínicos de pacientes com CaP e pode ser considerado um marcador de pior prognóstico.

Palavras-chave: *STEAP1*, *STEAP2*, adenocarcinoma de próstata, RT-PCR quantitativa em tempo real, correlação clínica

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is a public health problem due to the high incidence and mortality rates. Available prognostic markers as serum PSA levels, Gleason differentiation scores and tumor staging have not been able to discriminate indolent from aggressive tumors. Increased expressions of *STEAP1* and *STEAP2* genes (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 1 e 2*) have been shown in neoplastic cell lineages from prostate, urinary bladder, ovary and other tumors. Previously, using comparative genomic hybridization based in arrays in prostate adenocarcinomas and their metastasis, we described genomic gains at the 7q21.13. In this region are mapped the *STEAP1* and *STEAP2* genes. The involvement of these genes in PCa development and progression remains to be clarified. These genes possibly express tumoral antigens and are putative molecular markers. The objective of the present study was to determine the gene expression profiles of the *STEAP1* e *STEAP2* genes by real time quantitative PCR in primary prostate adenocarcinomas, surrounding non-neoplastic tissues, and in nodular hyperplasia of the prostate. The results were associate with tumor pathologic characteristics and patients clinical features. Samples from histologically confirmed normal prostates obtained from necropsies were used as normal controls. According to potential risk for tumor recurrence (low, moderate and high risk) patients were classified in three groups depending on the serum PSA levels, Gleason scores, and tumor stages. Increased expression of *STEAP1* e *STEAP2* genes were registered in 28% and 38% of samples, respectively; both genes presented simultaneously increased expression level in three high-risk cases. Similar pattern of expression were detected in the majority of CaP (Spearman $r=0,63$; $p<0,0001$) and non-neoplastic surrounding tissue (Spearman $r=0,78$; $p=0,0002$) samples. Compared to the non-neoplastic surrounding tissues there was significant increase of *STEAP1* gene expression in PCa samples with Gleason scores $\geq 7(4+3)$ and also in the cases with vascular invasion ($p < 0,05$). Besides, there was a trend for increased *STEAP1* expression in the high risk when compared to the moderate risk group. The present data suggest that increased *STEAP1* gene expression is related to clinical and pathological parameters of PCa patients and may be considered a poor prognostic marker.

Key- words: *STEAP1*, *STEAP2*, prostate adenocarcinoma, real time quantitative RT-PCR, clinical correlation.

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% de todos os cânceres⁽¹⁾. As taxas de incidência deste tipo de câncer são aproximadamente seis vezes maiores nos países desenvolvidos comparados aos países em desenvolvimento⁽¹⁾. Os CaPs são heterogêneos em seus aspectos clínico, morfológico e biomolecular. Os fatores primários para o prognóstico do CaP são estadiamento, grau histológico e PSA⁽²⁾. Quando diagnosticados, os adenocarcinomas de próstata são classificados pelo sistema TNM para definição do seu estágio (tamanho e disseminação do tumor)⁽³⁾ e pelo sistema de Gleason, para sua graduação (diferenciação histológica da neoplasia)⁽⁴⁾. A determinação dos níveis séricos do PSA (antígeno específico da próstata) é considerada normal até 4,0ng/mL. Algumas críticas à eficácia desse exame referem-se à sua baixa sensibilidade para distinguir o câncer de doenças benignas, como hiperplasia nodular da próstata e prostatites, e à existência de casos de CaP com valores baixos de PSA, como é o caso de pacientes com histórico familiar para esta neoplasia e tumores hormônio-independentes⁽⁵⁾. Em pacientes com CaP submetidos à prostatectomia radical, valores de PSA acima de 0,4ng/mL após a cirurgia indicam pior prognóstico⁽⁶⁾. Um método para melhorar a sensibilidade do PSA em prever o risco do paciente é pelo cálculo do PSA *doubling-time* (PSADT), i.e., um cálculo usando regressão linear logarítmica que estima o tempo de duplicação do PSA em meses após a cirurgia; quanto menor o PSADT maior a chance de recorrência tumoral⁽⁷⁾. O risco de recorrência do tumor pode ser estimado pela combinação destas três variáveis; sendo mais fidedigno do que a análise de qualquer uma delas isoladamente⁽⁸⁾. Outra característica com importância prognóstica é a capacidade do tumor invadir as estruturas angiolinfáticas, não contemplada pelo sistema TNM^(9,10). Apesar de os parâmetros clínicos e histológicos serem úteis para a classificação dos cânceres prostáticos, estes não são capazes de diferenciar adenocarcinomas prostáticos indolentes dos invasivos. Em geral, os marcadores utilizados ao diagnóstico e no monitoramento da progressão da doença não correspondem de forma satisfatória à evolução dos pacientes e, portanto, há a necessidade da identificação de novos marcadores.

Os genes *STEAP1* e *STEAP2* (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate 1 e 2*) são, predominantemente, expressos na próstata normal e apresentam expressão aumentada em diversas linhagens de células neoplásicas, como de próstata, bexiga, ovário, e outros^(11,12). A expressão aumentada de *STEAP1* foi descrita em metástases

ósseas e linfonodais do CaP^(13,14). Na próstata, os produtos gênicos de *STEAP1* e *STEAP2* foram identificados nas junções celulares do epitélio acinar e no complexo de Golgi, respectivamente^(11,12). Eles contêm um domínio hexa-transmembrana e terminações intracelulares amino e carboxil, o que sugere se tratar de canais iônicos envolvidos com a comunicação celular^(14,15,16). Sanches-Pulido et al. (2004)⁽¹⁷⁾ relacionaram as proteínas *STEAP1* e *STEAP2* com o crescimento tumoral, ao demonstrar em suas estruturas o domínio ACATA (apoptosis, cancer and redox associated transmembrane domain), homólogo ao encontrado na estrutura das bactérias NADPH-oxidase (Nox), envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio.

Alterações no número de cópias do DNA têm sido extensivamente caracterizadas em cânceres de próstata e incluem regiões recorrentes de perdas, indicando a localização de genes conhecidos ou candidatos a supressores tumorais no CaP como em 13q (*RBI*), 10q (*PTEN*), 16q (*CDHI*) assim como regiões recorrentes de ganhos como em 8q (*MYC*) e 7, entre outros, como candidatos a oncogenes^(18,19). Em estudo prévio, utilizamos CGH-array para avaliar o número de cópias do DNA em tumores primários de CaP e suas metástases. Análise hierárquica supervisionada revelou que os genes *STEAP1* e *STEAP2*, mapeados em 7q21.13, eram classificadores quanto ao risco de progressão para metástase. Para avaliar essa hipótese, o presente estudo foi delineado para validar os achados preliminares usando análise de expressão gênica quantitativa em tempo real para os dois genes. Os produtos desses genes reúnem características que os tornam possíveis antígenos tumorais: expressão aumentada em diversos tipos de cânceres, expressão reduzida em tecidos normais (exceto próstata) e, no caso do *STEAP1*, localização na superfície celular⁽²⁰⁾. Nesse sentido, estudos *in vitro* e *in vivo* estão sendo realizados com o objetivo de identificar os peptídeos capazes de provocar resposta imune antitumoral, mediada por linfócitos T^(20,21, 22). Aparentemente, a expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2* não é alterada por andrógenos sintéticos^(11,12).

O papel dos genes *STEAP1* e *STEAP2* no desenvolvimento e progressão do câncer da próstata não está bem estabelecido. Para o nosso conhecimento, a única informação disponível em literatura é o fato de estarem amplificados no CaP^(11,13,16). O presente trabalho visou determinar o padrão de expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2* em CaP, no tecido não-neoplásico adjacente ao tumor e na hiperplasia nodular da próstata (HNP) particularmente no sentido identificar potencial associação entre o perfil clínico dos pacientes, os aspectos anatomo-patológicos dos tumores e de validar os achados preliminares de ganhos em 7q21.13.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Caracterização das amostras

Neste estudo estão incluídos fragmentos *a fresco* de 33 casos de adenocarcinomas de próstata, 17 amostras de tecido não-neoplásico adjacente ao tumor e cinco amostras de hiperplasia nodular (HNP). Essas 55 amostras foram obtidas de produtos de prostatectomias radicais de pacientes com CaP. Duas amostras de próstatas normais provenientes de necropsias de pacientes que foram a óbitos por outras causas foram usadas como controle. Todos os pacientes e/ou familiares foram informados da pesquisa e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo CEP nº 446/2005).

Os pacientes não receberam qualquer tratamento hormonal ou radioterápico precedendo este estudo. Imediatamente após a cirurgia, amostras das regiões das próstatas referidas nos laudos das biópsias prévias como sítio de neoplasias foram confirmadas histologicamente em cortes de congelação por um único patologista (JLVC). Os tumores foram macrodissecados de modo a evitar contaminação pelo tecido normal adjacente e os fragmentos obtidos foram estocados a -80°C até o momento do uso.

A graduação histológica dos tumores seguiu o sistema de Gleason⁽⁴⁾ e o estadiamento foi dado pelo sistema TNM⁽³⁾. A caracterização clínica e as informações sobre o seguimento dos pacientes foram obtidos dos prontuários hospitalares. A idade média dos casos foi de 64 anos (variação de 48 a 75anos) e a idade dos dois casos controles foi de 49 anos. O tempo de seguimento médio dos pacientes foi de 12,6 meses (variação de 1 à 46 meses). Os pacientes com CaP foram agrupadas segundo o PSA pré-cirúrgico, a graduação histológica e o estágio dos tumores em três grupos quanto ao risco de recorrência do tumor (baixo, moderado e alto) (Tabela I). Naturalmente, as amostras de tecido não-neoplásico adjacente ao tumor e as HNP não podem ser classificadas quanto ao escore de Gleason e conseqüentemente, o risco de recorrência para esses casos foi realizado segundo as características anatomopatológicas presentes nos laudos das prostatectomias radicais.

Os resultados da expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2* obtidos por RT-PCR quantitativa em tempo real nos diferentes tecidos analisados foram comparados entre si nos três grupos de pacientes em relação aos parâmetros clínico-laboratoriais (história familiar, idade e PSA pós-cirúrgico) e anatomopatológicos (escore de Gleason,

estadiamento, invasão angiolinfática, comprometimento de margem cirúrgica e extensão extra-prostática) isolados. Para a análise do escore de Gleason isolado, as amostras de CaP com escore $\leq 7(3+4)$ foram classificadas como de baixo grau e as amostras de CaP com escore $\geq 7(4+3)$ como de alto grau⁽²³⁾. O PSADT foi obtido somente em quatro casos que possuíam todas as informações necessárias para o cálculo *on line*⁽²⁴⁾.

2. Extração do RNA e obtenção do cDNA

O RNA total foi extraído de tecido tumoral congelado e pulverizado utilizando o *Rneasy mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram estocadas em água destilada livre de RNase, a -70°C . A qualidade das amostras de RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas de RNA, 18S e 28S, foram visualizadas em luz ultravioleta. Para evitar contaminação com DNA, as amostras foram digeridas com 1 unidade de *Dnase I Amplification Grade* (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* e 25 mM de EDTA pH 8.0. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (Peltier - Effect Cycling - MJ Research, Inc., USA) por 15 min em temperatura ambiente e a enzima foi inativada pelo aquecimento das reações a 70°C por 10 min. O RNA foi transcrito em um volume final de 20 μl contendo 5x *First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2), 10 mM de cada dNTP, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Oligo (dT)₁₈, 0.1 M ditiotreitol e 200 unidades da transcriptase reversa *SuperScriptTM II* (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60 min e a reação foi subsequentemente inativada por 15 min a 70°C . Na análise qualitativa, os controles negativos consistiram de reações com os mesmos reagentes, exceto a ausência da enzima de transcriptase reversa. O cDNA foi estocado a -70°C .

3. RT-PRC quantitativa em tempo real (q-RT-PCR)

Foram avaliadas 55 amostras para os genes *STEAP1* e *STEAP2*. As etapas da PCR foram realizadas em termociclador automático (*ABI Prism 7000 Sequence Detection System*) e processadas pelo sistema de detecção após número variável de ciclos em fase exponencial. Os valores de cada amostra foram normalizados pela razão entre os valores obtidos para o gene de interesse e para o gene referência, *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase). Este gene é comumente adotado em estudos de

quantificação de DNA e RNAm em diferentes tipos tumorais⁽²⁵⁾, incluindo o carcinoma de próstata. Os ensaios dos *primers* e da sonda para os genes *STEAP1* (Hs00185180_m1), *STEAP2* (Hs00537784_m1) e *GAPDH* (4326317E) foram delineados pela *Applied Biosystems* (Protocolo *Assay on Demand* - Applied Biosystems). Os fragmentos amplificados para os genes *STEAP 1*, *STEAP 2* e *GAPDH* foram de 78pb, 70pb e 122pb, respectivamente. Para a amplificação foi utilizado o TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), que contém todos os reagentes necessários para a reação. O experimento foi realizado com volume final de reação de 10µL. A condição de ciclagem para os genes foi de 50°C-2min; 95°C-10min; 95°C-15s e 40 ciclos de 60°C-1min. Para garantir a ausência de contaminação, em cada reação de amplificação foi utilizado um controle negativo (ausência de cDNA) contendo os iniciadores do gene amplificado. Como controle foram utilizadas amostras de próstatas de necropsias, comprovadas histologicamente como normais.

Para determinar a eficiência de amplificação dos iniciadores foram construídas curvas-padrão com diluições em série de um *pool* de RNA de amostras tumorais e normais adjacentes de próstata. Para esta etapa foi utilizado 1µg de RNA diluído em água DEPC nas seguintes concentrações: 100, 20, 4, 0.8 e 0.16ng/µl. A eficiência de amplificação foi calculada pela fórmula: $E=10^{-1/\text{slope}} - 1$.

A quantificação do RNA obtido utilizou os valores de Ct (*Cycle Threshold*) pela fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Para cada amostra, o valor de ΔCt foi determinado subtraindo a média das duplicatas dos valores de Ct do gene de interesse da média das duplicatas dos valores de Ct do gene referência (*GAPDH*). Posteriormente, para determinar o $\Delta\Delta Ct$, o valor de ΔCt de cada amostra foi subtraído do valor da média de ΔCt das amostras normais. Este último valor foi adicionado à fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Para cada amostra foi determinada a quantidade relativa de transcrito (QR) (n vezes maior ou menor que o normal).

4. Análise dos dados

Os genes foram considerados como tendo aumento da expressão nas amostras de CaP, no tecido não neoplásico adjacente ou nas HNP quando apresentavam $QR \geq 2,0$ ou diminuição da expressão quando o valor de $QR \leq 0,5$, em relação às amostras de próstatas normais. As comparações dos valores de expressão (QR) com as variáveis clínicas e histopatológicas foram realizadas pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney quando duas categorias foram avaliadas, e pelo teste de Kruskal-Wallis quando

três categorias foram comparadas. As análises de correlação utilizaram o teste não-paramétrico de Spearman (r). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Para a análise foi utilizado o *software* Graphpad Prism versão 3.0.

RESULTADOS

Os dados de expressão gênica foram comparados com os parâmetros clínicos e anatomo-patológicos para os genes alvo (Tabela 2- Apêndice). A variação do QR das amostras normais de pacientes sem câncer de próstata foi de 0,97 a 1,26 para o gene *STEAP1* e de 0,86 a 1,20 para o gene *STEAP2*. Nove CaP (16,1%) para o gene *STEAP1* e 12 CaP (21,4%) para o gene *STEAP2* apresentaram aumento de expressão. Duas amostras de tecido adjacente ao tumor (casos 172 e 214), e três amostras de CaP de um mesmo paciente (caso 222) apresentaram aumento de expressão dos dois genes. Esses pacientes estão incluídos no grupo de alto risco de recorrência, com escore de Gleason ≥ 7 , estágio $\geq pT3$ e presença de invasão angiolinfática. Os casos 172 e 222 tinham PSA pré-cirúrgico de 29,0 ng/mL. O caso 172, que está em seguimento clínico há 21 meses apresentou recidiva bioquímica inferior a seis meses, i.e., PSA pós-cirúrgico $\geq 0,4$ ng/mL, e foi submetido a terapia adjuvante no décimo primeiro mês pós-cirúrgico. Os valores do PSA pós-cirúrgico dos casos 214 e 222 estão abaixo dos níveis detectáveis, porém esses casos estão em seguimento há somente 4 e 2 meses, respectivamente. Os genes *STEAP1* e *STEAP2* apresentaram diminuição de expressão em nove e 12 amostras, respectivamente, sendo que em cinco delas ocorreu diminuição da expressão de ambos os genes. Todos esses casos apresentavam escore de Gleason $\leq 7(3+4)$, ou seja, eram tumores mais diferenciados (Tabela II- Apêndice).

O gene *STEAP1* apresentou aumento significativo da expressão em CaP de alto grau, com escores de Gleason ≥ 7 (4+3) em relação ao tecido adjacente ao tumor ($p < 0,05$). As amostras de HNP apresentaram expressão do gene *STEAP1* dentro da faixa de normalidade, exceto um caso em que houve diminuição de sua expressão (Figura 1).

As expressões dos genes *STEAP1* e *STEAP2* mostraram correlação positiva nas amostras de CaP (Spearman $r=0,63$; $p < 0,0001$) e nas amostras de tecido adjacente (Spearman $r=0,78$; $p=0,0002$), ou seja, para a maioria das amostras a expressão do gene *STEAP2* acompanhou a expressão do gene *STEAP1* e vice-versa.

Em relação aos parâmetros individuais, a expressão do gene *STEAP1* apresentou aumento significativo nos casos com invasão angiolinfática ($p= 0,02$) (Figura 2A). A expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2* apresentaram aumento significativo em

amostras com margem cirúrgica comprometida ($p= 0,0003$ e $p = 0,02$, respectivamente). Não foi observada diferença significativa na comparação entre a expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2* e o risco de recorrência. Embora estatisticamente não significativa, a expressão do gene *STEAP1* apresentou mediana aumentada nos casos com PSA pós-cirúrgico acima de $0,4\text{ng/mL}$, considerando o último exame realizado em pacientes com mais de quatro meses de seguimento clínico (Figura 2B). Além disso, tumores com escore de Gleason elevado, assim como tumores com alto risco de recorrência, estavam associados com expressão aumentada do *STEAP1* (Figuras 2C e 2D, respectivamente).

Em apenas quatro casos pudemos calcular o PSADT (casos 88, 184, 188, 193), porém em nenhum desses houve aumento da expressão dos genes *STEAP1* e *STEAP2*. Um caso (188) apresentou diminuição de expressão para os dois genes; seu primeiro PSA pós-cirúrgico elevado provavelmente dependeu de comprometimento de margem. O tempo de seguimento para esses casos variou de 16 a 46 meses.

DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho demonstraram aumento significativo da expressão do gene *STEAP1* em amostras de CaP quando foram considerados três fatores reconhecidamente relacionados a pior prognóstico: escore de Gleason $\geq 7(4+3)$ em relação ao tecido não-neoplásico adjacente ao tumor, nos casos com invasão angiolinfática e em amostras de pacientes com margem cirúrgica comprometida^(9,10,23). Este último parâmetro estava também relacionado a aumento significativo da expressão do gene *STEAP2*.

Hubert et al. (1999)⁽¹¹⁾ foram os primeiros a relatar um aumento da expressão da proteína *STEAP1* por imunistoquímica em tumores primários de próstata e sua relação com altos escores de Gleason. Recentemente, Challita-Eid et al. (2007)⁽¹⁴⁾ demonstraram expressão aumentada de *STEAP1* em metástases ósseas e linfonodais de CaP e em linhagem de câncer de bexiga e de pulmão. Utilizando um modelo de ratos transgênicos que receberam células neoplásicas de camundongo denominados TRAMP (*transgenic adenocarcinoma mouse prostate*), Yang et al. (2001)⁽¹³⁾ identificaram aumento da expressão do gene *STEAP1* em tumores primários de próstata e em metástases em linfonodos, fígado e vísceras por RT-PCR. O gene *STEAP1* humano tem homologia de sequência em 80% com o gene de camundongos⁽¹³⁾.

Os dados do presente estudo também mostram aumento da expressão de *STEAP1* no CaP primário em relação ao tecido não-neoplásico adjacente. Essa diferença parece

se restringir para CaPs com escores de Gleason elevados, quando comparados aos tumores mais bem diferenciados (escores de Gleason ≤ 6). Um achado interessante, é que nenhum dos 12 casos de CaPs com escores de Gleason $\geq 7(4+3)$ mostraram diminuição da expressão do gene *STEAPI*. Considerando o número limitado de casos analisados, esse achado precisa ser comprovado.

A invasão angiolinfática pela neoplasia é referida em laudos patológicos de prostatectomia radical desde 1994⁽²⁶⁾, e tem sido considerada um fator prognóstico independente na seleção de pacientes para receber terapia adjuvante após a cirurgia, além de ter se mostrado fortemente relacionada ao tempo de recidiva bioquímica⁽¹⁰⁾. O gene *STEAPI* apresentou aumento significativo de sua expressão nos casos com invasão angiolinfática ($p= 0,02$) (Figura 2A). Dos oito pacientes deste estudo que apresentavam invasão angiolinfática, seis eram do grupo de alto risco de recorrência tumoral, apresentavam extensão extra-prostática da neoplasia e ainda, dois deles apresentaram recidiva bioquímica. Este achado sugere que estes pacientes devem ser acompanhados cuidadosamente, considerando que o tempo de seguimento até o presente é inferior a quatro meses.

Os genes *STEAPI* e *STEAP2* apresentaram aumento significativo de suas expressões em amostras com margens cirúrgicas comprometidas. O comprometimento de margens cirúrgicas é considerado um fator de pior prognóstico, pois provavelmente representa tumor residual no paciente. Ocorre principalmente em situações em que o cirurgião quer preservar o paciente em algumas de suas funções e em tumores volumosos, mais difíceis de ressecar⁽⁹⁾. Esses dados sugerem que os tumores com aumento da expressão desses genes são mais agressivos e podem comprometer regiões de feixes nervosos e de maior vascularização. Infelizmente, as informações disponíveis nos laudos anatomo-patológicos, não permitiram esclarecer o volume do tumor na glândula com precisão e quais regiões anatômicas das próstatas apresentavam as margens cirúrgicas comprometidas pelo tumor.

Também, ocorreu tendência de aumento da expressão do gene *STEAPI* em pacientes com tempo de seguimento superior a quatro meses, com PSA pós-cirúrgico $\geq 0,4\text{ng/mL}$ (considerando o último exame após a prostatectomia radical) antes de qualquer tratamento adjuvante (radioterapia, quimioterapia ou hormonioterapia). A expressão dos genes *STEAPI* e *STEAP2* não foi estatisticamente significativa quanto ao risco de recorrência tumoral. Mesmo assim, houve tendência de aumento de expressão do gene *STEAPI* nas amostras de CaP de pacientes com alto risco de recorrência em

relação aos pacientes com risco moderado de recorrência. Esta casuística não possuía amostras de CaP de pacientes com baixo risco de recorrência. O caso 213, pertencente ao grupo de alto risco que apresentou menor expressão, tinha quatro meses de seguimento clínico, escore de Gleason 6(3+3) e PSA pós-cirúrgico = 0 e, o caso que apresentou expressão mais elevada pertencente ao grupo de baixo risco foi o caso 187, com seguimento de 21 meses, Gleason 7(3+4), PSA pós-cirúrgico de 1,08ng/mL, indicação de radioterapia, e no mesmo lobo prostático do fragmento estudado apresentou Gleason 7(4+3) em biópsia anterior (Figura 2D).

Os genes *STEAP1* e *STEAP2* estão localizados na região cromossômica 7q21.13, distando aproximadamente 50kb um do outro⁽²⁷⁾. No presente trabalho, foi identificada correlação positiva significativa entre a expressão dos transcritos de *STEAP1* e *STEAP2*, tanto em tecido neoplásico como no tecido adjacente ao tumor, sugerindo a formação de um amplicon. Em alguns casos, a amplificação e conseqüentemente o aumento da expressão gênica fornecem vantagens adaptativas à célula neoplásica. Desse modo, a amplificação geralmente se associa a comportamento agressivo e estágio avançado⁽²⁸⁾.

Nesse sentido, nove casos apresentaram aumento de expressão para o gene *STEAP1* e 12 casos para o gene *STEAP2*, sendo que nos casos 172, 214 de tecido adjacente ao tumor e no caso 222 de CaP houve aumento de expressão em ambos os genes. Os pacientes que mostraram aumento de expressão para os genes *STEAP1* e *STEAP2* pertencem ao grupo de alto risco de recorrência, com escore de Gleason ≥ 7 , estágio \geq pT3 e presença de invasão angiolinfática. Esses dados sugerem que os casos com aumento de expressão de *STEAP1* e *STEAP2* estão relacionados a características de pior prognóstico.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou relação direta da expressão do gene *STEAP1* com presença de invasão angiolinfática e tendência de aumento da expressão deste gene em pacientes com alto risco de recorrência tumoral. A expressão do gene *STEAP1* foi mais específica aos parâmetros clínicos analisados do que o gene *STEAP2*. Aumento da casuística de pacientes e análise protéica por imunistoquímica em casos com informações clínicas detalhadas, assim como longo tempo de seguimento clínico, poderão confirmar o potencial destes genes a marcadores de agressividade no câncer de próstata.

Tabela I: Risco de recorrência de adenocarcinoma de próstata em pacientes submetidos a prostatectomia radical, segundo o estadiamento pelo sistema TNM, graduação de Gleason e valor de PSA pré-cirúrgico.

Risco de recorrência	Características clínicas e morfológicas
Baixo risco	pT1-pT2a e escore de Gleason 2 – 6 e PSA < 10 ng/mL
Risco moderado	pT2b-pT2c ou escore de Gleason 7 ou PSA = 10-20 ng/mL
Alto risco	pT3a ou pTxN1 ou pTxNxM1 ou Score de Gleason 8-10 ou PSA > 20 ng/mL

Adaptado de NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™: Prostate Cancer, Version 2. 2007.

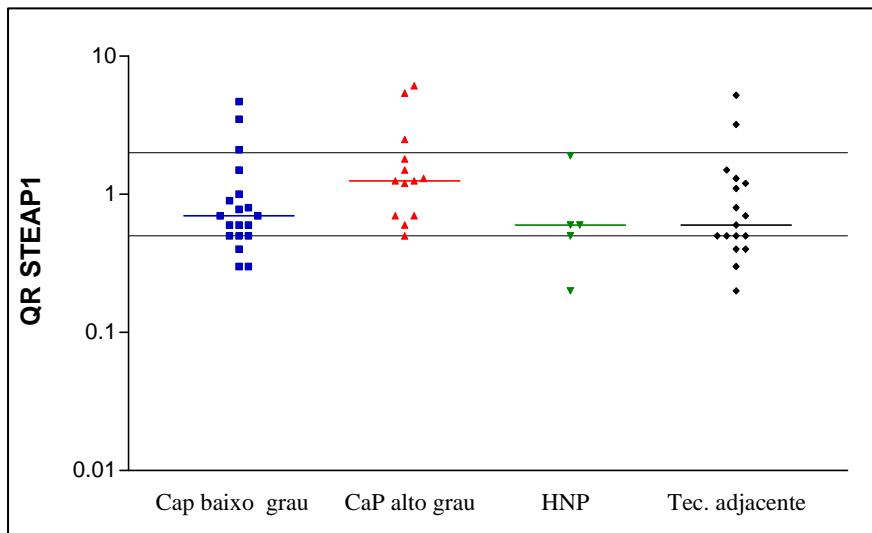


Figura 1: Quantificação relativa (QR) do gene *STEAP1* em amostras de CaP de baixo e alto grau, tecido adjacente ao tumor e HNP em relação à expressão em próstatas normais. As barras em cada grupo indicam as medianas de QR; As barras pontilhadas indicam os limites de QR=0,5 e QR=2,0.

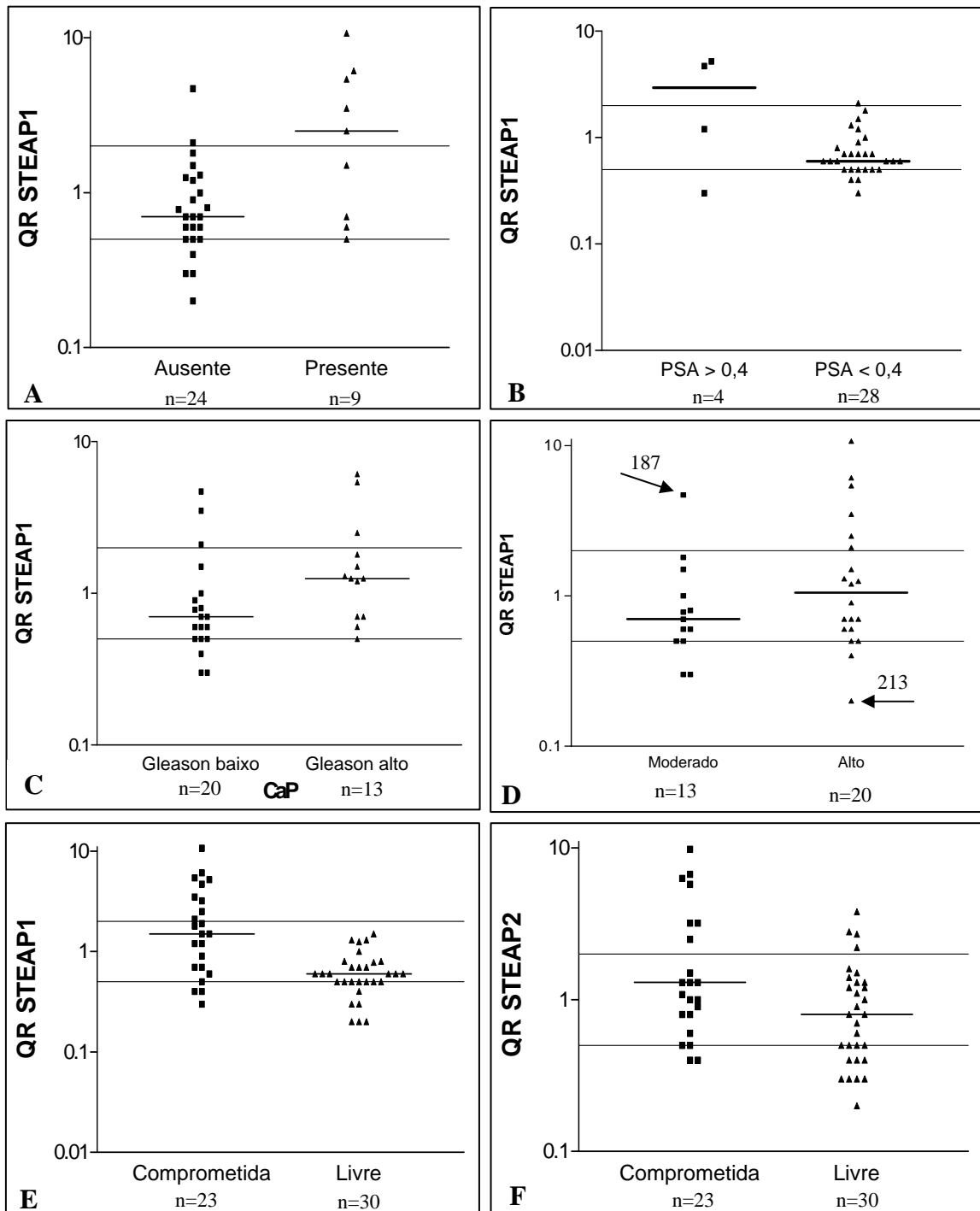


Figura 2: Quantificação relativa (QR) do gene *STEAP1* em amostras de CaP de acordo com (A) presença de invasão angiolinfática referida em laudo anatomopatológico ($p=0,02$); (B) níveis séricos de PSA pós-cirúrgico ($< 0,4$ ng/mL e $\geq 0,4$ ng/mL) em amostras de pacientes com seguimento acima de quatro meses; (C) escore de Gleason baixo ($\leq 7(3+4)$) e alto ($\geq 7(4+3)$) e (D) risco de recorrência tumoral; (E) comprometimento de margem cirúrgica ($p=0,0003$). (F) Quantificação relativa (QR) do gene *STEAP2* de acordo com comprometimento de margem cirúrgica ($p=0,02$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Tipos de câncer. Próstata. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2008 [cited 2008 jan 28]. Available from: <http://www.inca.gov.br/>.
2. Koff WJ, Pompeo ACL, Damião R, Carrerette FB, editors. Diretrizes em uro-oncologia. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Urologia; 2005. 261p.
3. Epstein JI, Algaba F, Allsbrook Jr WC, Bastacky S, Boccon-Gibod L, De Marzo AM, et al. Tumours of the prostate: Acinar adenocarcinoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World health organization classification of tumours - Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC; 2004. p. 159-92.
4. Epstein JI, Allsbrook-Jr WC, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005a; 29: 1228-42.
5. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 256-69.
6. Stephenson AJ, Kattan MW, Eatham JA, Dothan ZA, Bianco FI Jr, Lilja H, et al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 3973-8.
7. Roberts SG, Blute ML, Bergstralh EJ, Slezak JM, Zincke H. PSA Doubling Time as a Predictor of Clinical Progression After Biochemical Failure Following Radical Prostatectomy for Prostate Cancer. *Mayo Clin Proc*. 2001; 76:576-581.
8. Partin AW, Kattan MW, Subong EN, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, et al. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. *Jama*. 1997; 227: 1445-51.
9. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Humphrey PA, Mikuz G, et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2005b; 216: 34-63.
10. Antunes AA, Srougi M, Dall'Oglio MF, Crippa A, Paranhos M, Cury J, et al. Microvascular invasion is an independent prognostic factor in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *International Braz J Urol*. 2006; 32: 668-77.

11. Hubert RS, Vivanco I, Chen E, Rastegar S, Leong K, Mitchell SC, et al. STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 14523-8.
12. Porkka KP, Helenius MA, Visakorpi T. Cloning and characterization of a novel six-transmembrane protein STEAP2, expressed in normal and malignant prostate. *Lab Invest*. 2002; 82(11):1573-82.
13. Yang D, Holt GE, Velders MP, Kwon ED, Kast M. Murine six-transmembrane epithelial antigen of the prostate, prostate stem cell antigen, and prostate-specific membrane antigen: prostate-specific cell-surface antigens highly expressed in prostate cancer of transgenic adenocarcinoma mouse prostate mice. *Cancer Res*. 2001; 61: 5857-60.
14. Challita-Eid PM, Morrison K, Etessami S, Morrison ZAKJ, Perez-Villar JJ, Raitano AB, et al. Monoclonal antibodies to six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 inhibit intercellular communication in vivo and growth of human tumor xenografts in vivo. *Cancer Res*. 2007; 67: 5798-805.
15. Korkmaz KS, Elbi C, Korkmaz CG, Loda M, Hager GL, Saatcioglu F. Molecular cloning and characterization of STAMP1, a highly prostate-specific six transmembrane protein that is overexpressed in prostate Cancer. *REVISTA* 2002; 277: 36689-96.
16. Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*. 2006; 108: 1388-94.
17. Sanches-Pulido L, Rojas AM, Valencia A, Martinez-A C, Andrade MA. ACRATA: a novel electron transfer domain associated to apoptosis and cancer. *BMC Cancer*. 2004; 4:98.
18. Strohmeyer DM, Berger AP, Moore DH 2nd, Bartsch G, Klocker H, Carroll PR, Loening SA, Jensen RH. Genetic aberrations in prostate carcinoma detected by comparative genomic hybridization and microsatellite analysis: association with progression and angiogenesis. *Prostate*. 2004; 59(1): 43-58.
19. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, Ferrari M, Hernandez-Boussard T, Brooks JD, Pollack JR. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007; 67(18): 8504-10.
20. Rodeberg DA, Nuss RA, Elsawa SF, Celis E. Recognition of six-transmembrane epithelial antigen of the prostate – expressing tumor cells by peptide antigen – induced cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 4545-52.

21. Alves PMS, Faure O, Graff-Dubois S, Cornet S, Bolonakis I, Gross D-A, et al. STEAP, a prostate tumor antigen, is a target of human CD8⁺ cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55: 1515-23.
22. Garcia-Hernandez M L, Gray A, Hubby B, Kast WM. In vivo effects of vaccination with six-transmembrane epithelial antigen of the prostate: a candidate antigen for treating prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 1344-51.
23. McDonnell TJ, Chari NS, Cho-Vega JH, Troncoso P, Wang X, Bueso-Ramos CE, et al. Biomarker expression patterns that correlate with high grade features in treatment naive, organ-confined prostate cancer. 2008; 1:1.
24. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center – MSKCC. Prostate nomogram – PSA doubling time [homepage on the internet]. New York: MSKCC; 2007 [last update 2007 may 7; cited 2008 jan 20]. Available from: <http://www.mskcc.org/>.
25. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 1999; 75: 291-5.
26. Henson DE, Hutter RV, Farrow G. Practice protocol for the examination of specimens removed from patients with carcinoma of the prostate gland. A publication of the cancer committee, college of American pathologists. Task Force on the Examination of Specimens Removed From Patients With Prostate Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 1994; 118: 779-83.
27. National Center for Biotechnology Information – NCBI. [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2008 [last update 2008 jan 25; cited 2007 nov 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
28. Camargo JVL, Oliveira DE, editors. *Patologia geral: abordagem multidisciplinar.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. 160p.

Tabela II: Expressão relativa dos genes *STEAP1* e *STEAP2* e parâmetros clínico-histopatológicos de amostras de CaP, tecido não-neoplásico adjacente ao tumor e HNP.

Caso	Tecido	QR <i>STEAP1</i>	QR <i>STEAP2</i>	Idade	PSA pré (ng/mL)	Score Gleason	pTNM	Risco de recorrência	Invasão angiolinfática	Extensão extra- prostática	Margem Cirúrgica	PSA pos (ng/mL)	Seguimento (meses)	Tempo livre da doença (meses)	PSADT
88	CaP	0,6	0,7	65	5,82	7(4+3)	pT3a	alto	+	+	-	0	46	1*	5,7
	Tec adj.	0,6	1,4			7(4+3)	pT3a	alto	+	+	-				
205	CaP	0,3	0,8	67	5,96	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	0	8	8	
	Tec adj.	0,8	1,6			7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-				
208	HNP	0,2	0,4	72	8,56	5(2+3)	pT2c	moderado	-	-	-	2,1	3	3*	
	Tec adj.	1,3	2,8			5(2+3)	pT2c	moderado	-	-	-				
211	HNP	0,6	2,7	67	7,8	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	0	8	8	
	Tec adj.	0,2	0,2			6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-				
213	CaP	0,2	0,3	65	7	6(3+3)	pT3a	alto	-	+	-	0	3	4	
	HNP	0,5	0,4			6(3+3)+ areas 5	pT3a	alto	-	+	-				
214	HNP	0,6	0,8	68	8	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	+	0	4	4	
	Tec adj.	3,2	17,5			7(3+4)	pT3a	alto	-	+	+				
217	CaP	0,5	0,3	62	6,95	6(3+3)	pT3a	alto	-	+	-	s.i.	s.i.	si	
	Tec adj.	1,1	0,7			6(3+3)	pT3a	alto	-	+	-				
218	CaP	1,5	2,5	74	4,84	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	+	s.i.	1	si	
	HNP	1,9	3,2			6(3+3) *7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	+				
222F1	CaP	3,5	1,08	57	29	6(3+3)	ppT4	alto	+	+	+	0,01	2	1	
222F3a	CaP	5,4	6,30			10(5+5)	ppT4	alto	+	+	+				
222F4	CaP	10,7	6,70			7(3+4)	ppT4	alto	+	+	+				
222Fb	CaP	6,1	5,76			8(3+5)	ppT4	alto	+	+	+				
162	CaP	0,6	1,2	58	>4,0	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	-	0,06	34	si	
168	CaP	0,5	0,5	70	4,45	8(5+3)	pT3a	alto	+	+	-	0	30	28	
170	CaP	1,3	2,2	70	4,98	8(5+3)	pT2c	alto	-	-	-	0,1	6	6	
174	CaP	0,6	0,5	60	8,09	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	0	23	23	
176	CaP	1,5	1	62	37,21	7(4+3)	pT3a	alto	+	+	+	0,2	15	15	
181	CaP	0,7	0,9	71	9,5	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	0,02	9	2	
182	CaP	0,6	1	65	5,38	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	0	19	19	
184	CaP	1,2	1,3	64	7,39	8(5+3)	pT3a	alto	-	+	+	0,8	24	3*	8,72

Caso	Tecido	QR STEAPI	QR STEAP2	Idade	PSA pré (ng/mL)	Score Gleason	pTNM	Risco de recorrência	Invasão angiolinfática	Extensão extra- prostática	Margem Cirurgica	PSA pos (ng/mL)	Seguimento (meses)	Tempo livre da doença (meses)	PSADT
186	CaP	0,7	0,8	53	11,36	8(3+5)	pT3a	alto	-	+	+	0	18	18	
187	CaP	4,7	0,5	63	5,48	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	+	1,08	21	1*	
188	CaP	0,3	0,4	65	7,22	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	+	1,3	16	1*	6,14
189	CaP	0,4	0,6	70	6,87	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	+	0	19	19	
190	CaP	0,5	0,4	71	3,1	6(3+3)	pT2c	moderado	+	-	-	0	20	20	
195	CaP	0,9	1,3	59	21,4	7(3+4)	pT2c	alto	-	-	+	0,04	7	7	
198	CaP	1	0,8	49	4,1	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	0	11	11	
199	CaP	0,5	1,3	65	7,3	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	0	10	10	
200	CaP	0,7	0,5	60	11,67	7(3+4)	pT3a	alto	-	+	+	0	4	4	
201	CaP	2,5	1,3	64	37,95	7(4+3)	pT3b	alto	+	+	+	0,14	3	3	
202	CaP	1,8	3,2	71	13,75	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	+	0	7	7	
203	CaP	0,7	0,5	69	>4,0	8(3+5)	pT3a	alto	+	+	-	0	4	4	
207	CaP	0,8	0,5	56	8,5	7(3+4)	pT2c	moderado	-	-	-	0,1	10	10	
209	CaP	2,1	1,5	52	4,5	6(3+3)	pT3a	alto	-	+	+	0	7	7	
220	CaP	1,25	0,3	48	4	8(3+5)	pT2a	alto	-	-	-	0	1	1	
223	CaP	0,78	0,3	50	4	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	0,1	1	1	
70	Tec adj.	0,4	1,2	71	9,94	7(4+3)	pT2c	moderado	-	-	-	0,03	30	30	
172	Tec adj.	5,2	9,8	67	28,64	8(3+5)	pT3c	alto	-	+	+	0,8	21	1*	
173	Tec adj.	0,4	0,4	71	17,68	7(3+4)	pT3b	alto	+	+	+	0,1	26	2*	
179	Tec adj.	0,5	1	64	5,63	7(3+4)+ áreas 5	pT3a	alto	-	+	+	0	21	21	
193	Tec adj.	1,2	0,9	69	19,36	7(3+4)+ áreas 5	pT2c	moderado	-	-	+	0,1	18	18	1,52
204	Tec adj.	0,5	0,3	63	6,97	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	0	3	3	
206	Tec adj.	0,5	1,1	61	7,77	7(3+4)	pT2a	moderado	+	-	-	0	10	10	
210	Tec adj.	0,7	1,5	68	11,08	6(3+3)	pT2b	moderado	-	-	-	0	10	10	
212	Tec adj.	0,3	0,6	52	-	6(3+3)	pT2a	baixo	-	-	-	0,29	2	1	
215	Tec adj.	0,5	1,3	52	3,97	6(3+3)	pT2a	baixo	-	-	-	0	4	4	
216	Tec adj.	1,5	3,8	75	9,44	6(3+3)	pT2c	moderado	-	-	-	0	1	1	

QR: quantificação relativa dos genes alvo; CaP: adenocarcinoma de próstata; HNP: hiperplasia nodular da próstata; Tec. Adj: tecido não-neoplásico adjacente ao tumor; s.i.: sem informação; (+) presença; (-) ausência. Os casos nº 88 ao nº 222 possuem mais de um fragmento analisado. O caso Nº 218 possui em outro fragmento tumoral não estudado graduação de Gleason 7(3+4). Os escores de Gleason nos fragmentos de HNP e tecido adjacente correspondem ao escore dado ao tumor no laudo anatomopatológico. *pacientes com primeiro PSA pós-cirúrgico acima de 0,4ng/mL.



Botucatu, 05 de dezembro de 2.005

OF. 446/2005-CEP


*Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. João Lauro Vianna de Camargo
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezada Prof. João Lauro,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Análise da expressão gênica e protéica de candidatos a marcadores tumorais em cânceres de próstata", de autoria de Shádia Muhammad Thlaseh, orientada por Vossa Senhoria, com a participação dos Drs. Sílvia Regina Rogatto e José Carlos de Souza Trindade Filho, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05/12/2005.

Situação do Projeto: APROVADO

Atenciosamente,


*Alberto Santos Capellupi
Secretário do CEP*

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA UNESP – BOTUCATU
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo admitido neste hospital para exames ou cirurgia de próstata. Como parte do tratamento, você será submetido a uma biópsia ou cirurgia, sendo prática rotineira a remoção de fragmentos que serão utilizados em exames clínicos laboratoriais necessários para um diagnóstico definitivo.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico das neoplasias, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica e científica. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca, em neoplasias, de novos genes ou lesões genéticas em genes já existentes.

Muitas destas pesquisas exigem material proveniente de neoplasias a fresco no lugar de células neoplásicas cultivadas em laboratório, pois estas não estão sob as mesmas influências que aquelas no corpo humano (hormônios, fatores de crescimento, outros). Assim, a obtenção de material proveniente de neoplasias humanas é desejável e fundamental, bem como pequena amostra de sangue.

Após a cirurgia ou biópsia, o seu médico irá remover um fragmento de seu tecido prostático, que não seria usado para diagnóstico. O material biológico (sangue e fragmento de tecido coletado) será congelado e posteriormente utilizado para pesquisa científica. A obtenção deste fragmento e da amostra de sangue não implicará em riscos adicionais na sua cirurgia e não implicará em aumento no tempo da operação, do exame, ou na extensão da cirurgia. O estudo proposto abrange vários projetos relacionados, que foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital (protocolos CEP342/2004; CEP446/2005).

Este fragmento de tecido será identificado no laboratório NeoGene por códigos formados por números e letras e portanto sua privacidade e identidade serão preservadas. O tecido será preservado no laboratório por até cinco anos e poderá, sob nova autorização, ser utilizado em eventuais pesquisas futuras; caso isso ocorra, seus familiares serão avisados. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com a retirada e uso deste fragmento, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o fragmento da peça para pesquisa, sua decisão não influenciará, de modo algum, o seu tratamento.

Nome do paciente ou responsável legal

Data

Médico responsável