

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Avaliação de Marcadores Moleculares em Células
Neoplásicas de Próstata

Autor: Dr. Luigi Comiran Brescianini

Orientador: Prof. Dr. Walter Koff

Co-orientador: Prof. Dr. Milton Berger

Dissertação de Mestrado - 2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Avaliação de Marcadores Moleculares em Células
Neoplásicas de Próstata

Autor: Dr. Luigi Comiran Brescianini

Orientador: Prof. Dr. Walter Koff

Co-orientador: Prof. Dr. Milton Berger

Dissertação de Mestrado - 2008

B842a **Brescianini, Luigi Comiran**

Avaliação de marcadores moleculares em células neoplásicas de próstata / Luigi Comiran Brescianini ; orient. Walter Koff ; co-orient. Milton Berger. – 2008.
65 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Neoplasias da próstata 2. Marcadores biológicos de tumor 3. Racemases e epimerases 4. Perfilação da expressão gênica 5. Antígenos de neoplasias I. Koff, Walter II. Berger, Milton III. Título.

NLM: WJ 762

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

- À **minha família**, pelos valores e fundamentos ensinados.

À **Selma Golendziner**, por todo o seu companheirismo, ajuda e infinita paciência em casa nas muitas horas de digitação desse trabalho.

- Ao **Prof. Dr. Walter J. Koff**, pela sua orientação e crédito que me foram dados, mesmo antes de minha formação em urologia; pelo modelo de talento, idealismo, iniciativa e perseverança que me inspirou a seguir o caminho desta desafiante área na medicina; pelas oportunidades que me foram criadas.

- Ao **Prof. Dr. Milton Berger**, pelos ensinamentos transmitidos com toda a sua experiência; por todas as oportunidades que me foram dadas junto a sua equipe, pela cordialidade e pela paciência.

- À **Profª. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva**, que norteou a construção deste projeto com sua personalidade e raciocínio brilhantes, bem como serviu de guia em toda a parte laboratorial.

- Ao **Vanderlei Biolchi, Gisele Branchini, Lolita Schneider, Diego Bromfman Pianta e demais integrantes do laboratório de fisiologia**, por toda a dedicação, competência e brilhantismo na estruturação das coletas e análises bioquímicas envolvidas neste trabalho.

- Ao **Serviço de Urologia, seus professores, médicos contratados e funcionários**, pela colaboração na minha formação profissional.

- Aos **residentes e pós-graduandos** do Serviço de Urologia do HCPA, pela fundamental ajuda na coleta de material, além da oportunidade de descobrir bons amigos.

- Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da FAMED da UFRGS, seus professores e funcionários**, pelo aprendizado e pela atenção dispensada a cada um dos seus alunos.

- A **todos os pacientes** eu dedico esse trabalho, na esperança que, um dia, sua colaboração se traduza em tratamentos mais aprimorados.

“Há erros nesta dissertação. Não sei onde estão.

Se soubesse, não estariam lá.

Mas com cerca de doze mil palavras, tabelas, figuras, números e análises,
minha mente probabilística me diz que os erros são inevitáveis.

Desde já, minhas sinceras desculpas.”

Alan Greenspan

“Se enxerguei mais longe, foi porque
me apoiei nos ombros de gigantes.”

Sir Isaac Newton

SUMÁRIO

1. LISTA DAS ABREVIATURAS	09
2. INTRODUÇÃO	11
3. REVISÃO DA LITERATURA	16
4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO	
5. OBJETIVOS	30
5.1. OBJETIVO GERAL	30
5.2. OBJETIVO SECUNDÁRIO	30
6. ARTIGO EM PORTUGUÊS	53
6.1. RESUMO	53
6.2. INTRODUÇÃO	53
6.3. MATERIAIS E MÉTODOS	54
6.3.1. DELINEAMENTO E COLETA DE DADOS	54
6.3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	55
6.3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	
6.3.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	
6.3.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	
6.3.6. ASPECTOS ESTATÍSTICOS	
6.3.7. ASPECTOS ÉTICOS	
7. RESULTADOS	
7.1. ANÁTOMO-PATOLÓGICOS	
7.2. DD3	

7.3. RACEMASE

8. DISCUSSÃO

9. AGRADECIMENTOS

10. FINANCIAMENTO

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. ANEXOS

13. ARTIGO EM INGLÊS

LISTA DAS ABREVIATURAS

PSA – Antígeno Prostático Específico

CaP – Câncer de próstata

Hab: Habitantes

Curva-ROC – do inglês, *Receiver-operating Characteristics Curve*

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LaGOM – Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

PPG Medicina – Programa de Pós-Graduação em Medicina

AMACR – Alfa-Metil Coenzima A Racemase

PRR – Prostatectomia Radical Retropúbica

AP – Anátomo-patológico

ρ – Coeficiente de Correlação de Spearman

IC – Intervalo de Confiança

Cols – Colaboradores

TNM – Sistema de Estadiamento Oncológico, do inglês *Tumor, Nodes, Metastasis*

cm – Centímetros

nm – Nanômetros

μ l - Microlitros

ml – Mililitros

pb - Pares de Bases

RNA – Ácido Ribonucleico

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase a Partir de Transcrição Reversa

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CONEP – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

UA – Unidades Arbitrárias

FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) apresenta uma incidência estimada de aproximadamente 52 casos para 100.000 habitantes no Brasil em 2008. No Rio Grande do Sul, a estimativa é ainda maior, ficando em 80,63 casos em 100.000 habitantes. Sua incidência varia bastante de acordo com o local e com o grupo étnico estudado, sendo encontradas taxas de 1,9 casos por 100.000 hab. na Ásia até 272 casos por 100.000 hab. na América no Norte e na Escandinávia. Essas variações tem múltiplas causas, entre elas a facilidade de acesso da população a sistemas de saúde, a qualidade do registro epidemiológico local, quantidade da população submetida a programas de rastreamento periódicos. O CaP ocupa o segundo lugar na prevalência das neoplasias malignas em homens ficando somente atrás das neoplasias cutâneas tipo não-melanoma. É, ao mesmo tempo, a segunda causa de morte por câncer em homens, atrás apenas do câncer de pulmão. O grande número de pacientes acometidos por esta patologia e seu impacto populacional fazem com que seja considerada um problema de saúde pública, sendo alvo de numerosos estudos ao redor do mundo.

Desde a introdução do Antígeno Prostático-específico (PSA) na prática clínica (meados da década de 1980), o CaP teve uma verdadeira revolução no diagnóstico e tratamento. Aprimoramentos da técnica cirúrgica e a possibilidade de tratar pacientes cada vez mais precocemente permitiram uma melhora substancial na qualidade de vida dos pacientes. A investigação diagnóstica para rastreamento do CaP consiste na medição do nível sanguíneo do antígeno prostático específico (PSA) e no exame de toque retal. Na

vigência de alterações nesses exames, a biópsia de próstata se faz necessária para diagnóstico definitivo da doença. O PSA, apesar de ser um excelente marcador tumoral em muitas situações, apresenta baixa especificidade para a neoplasia maligna da próstata, podendo ter níveis anormalmente elevados em diversas condições, como na hiperplasia benigna da próstata e em patologias infecciosas.

Tem sido tema de discussão constante o risco de hereditariedade relacionada ao CaP. Atualmente, são apresentadas evidências de herança mendeliana em casos familiares de neoplasia maligna da próstata. Steinberg e cols relataram que parentes em primeiro grau de pacientes com diagnóstico de CaP apresentaram risco duas a três vezes maior de apresentar a patologia. Segundo Carter e cols a aglomeração de casos entre parentes de uma mesma família estaria relacionada à herança autossômica dominante de um alelo raro (frequência populacional = 0,003). Portadores deste alelo mutante apresentariam um risco cumulativo de 88% durante a vida de desenvolver CaP comparado com 5% dos que não são portadores. Embora seja dito que aproximadamente 10% dos casos de CaP ocorram em decorrência de herança de genes de alta penetrância, o estudo destes casos é de extrema importância, visto que há a possibilidade de rastreamento e prevenção dos pacientes com maior risco. Estudos epidemiológicos descobriram uma gama de associações entre polimorfismos genéticos específicos e o risco de desenvolver câncer de próstata. Também são fatores em estudos recentes a presença de determinados genes e receptores no CaP e sua correlação com o desfecho clínico e resposta terapêutica nesse grupo de pacientes. A presença de marcadores específicos no câncer de próstata, portanto, é vista como um campo promissor para o futuro.

O tratamento da neoplasia maligna da próstata depende basicamente do estadiamento da mesma. Quando o CaP ainda está restrito na próstata, tratamentos são usualmente feitos com a cirurgia de prostatectomia radical retropúbica (PRR) ou radioterapia. Menos comumente, são utilizados a prostatectomia radical perineal e a braquiterapia. Os resultados de todos os tratamentos a longo prazo ainda são controversos, sendo sugerido que a PRR pode ter melhor sobrevida após 10 anos de seguimento. Após o CaP invadir a cápsula prostática a doença é considerada avançada. Para esse grupo de pacientes, usualmente não se consegue a cura, mas existem vários tratamentos que ajudam a controlar a doença paliativamente; entre eles, a hormonioterapia, quimioterapia e – mais recentemente – a imunoterapia.

É reconhecido que o ponto mais importante no tratamento das neoplasias de próstata é o estadiamento do paciente (tabela 1). Embora o estadiamento completo TNM tenha várias subdivisões, os pacientes podem ser subdivididos em doença localizada (engloba estádios T1 e T2) e doença avançada (T3, T4, N+, M+). Um marcador que pudesse auxiliar no estadiamento do paciente poderia ser de grande valia na decisão terapêutica. A avaliação de novos marcadores específicos para a neoplasia maligna da próstata é extremamente importante, tanto para avaliação de novos critérios diagnósticos quanto para prognóstico.

Tabela 1: Estadiamento patológico do câncer de próstata

T0	Sem evidência de neoplasia
T1a	Tumor encontrado após cirurgia benigna, 5% ou menos do tecido, Gleason <7
T1b	Tumor encontrado após cirurgia benigna, >5% Gleason 7 ou maior
T2a	Menos da metade de um lobo, unilateral
T2b	Mais da metade de um lobo, unilateral
T2c	Tumor bilateral
T3a	Extensão extra-capsular unilateral
T3b	Extensão extra-capsular bilateral
T3c	Invasão de vesículas seminais
T4a	Invasão do colo vesical, esfíncter externo ou reto
T4b	Invasão do elevador do ânus e/ou fixa à pelve
N+	Invasão de linfonodos
M+	Metástase à distância

Nos últimos anos, o grande avanço da biologia molecular fez com que fosse possível estudar uma gama enorme de genes que começam a se expressar em determinadas doenças prostáticas. Muitas pesquisas estudam a expressão e a distribuição desses genes expressos no CaP, com resultados iniciais bastante promissores.

O DD3(PCA3) foi descrito pela primeira vez em 1994, com análises prostáticas laboratoriais através da então nova técnica do *differential display*, que identificava expressões gênicas em diferentes tecidos. Estudos subsequentes demonstraram que o DD3 é um RNA não-codificante mapeado no cromossoma 9q21-22. Desde o início de seu

estudo, o DD3 tem sido relacionado e encontrado em células modificadas de câncer de próstata, alguns autores o consideram como sendo o marcador mais específico para essa doença. Hessels e cols. demonstraram valor preditivo negativo de 90% e sensibilidade de 67% em biópsias de câncer de próstata quando comparadas com células saudáveis. A posterior detecção do DD3 em diversos fluidos corporais – como sangue, urina e secreção prostática – fez com que houvesse um grande estímulo para o estudo desse gene. O DD3 tem sido estudado como marcador promissor para diagnóstico do CaP em substituição ao PSA, que apresenta especificidade reduzida.

A AMACR (alfa-metil coenzima A racemase) codifica uma enzima que catalisa a racemização dos tioésteres carboxílicos ramificados coenzima A, sendo localizada nos peroxissomos e mitocôndrias. A AMACR tem importante função na biossíntese de ácidos biliares e beta-oxidação de ácido graxos de cadeia ramificada. Mutações no gene AMACR têm demonstrado serem causadoras de neuropatia motora-sensorial em adultos. Estudos têm demonstrado um aumento da expressão da AMACR nas células malignas da próstata, atuando como um marcador sensível e específico para o câncer, até mesmo nos casos precoces, estando presente em cerca de 80-100% dos casos. Além disso, a AMACR tem sido estudada como fator auxiliar para diagnóstico de neoplasias em biópsias de próstata e como marcador sorológico. A avaliação de espécimes de biópsias de próstata com imuno-histoquímica demonstrou alta relação com tumores de próstata tanto com escore de Gleason alto quanto baixo. Não foi encontrada correlação entre os níveis de AMACR com recorrência do PSA após cirurgia em um estudo realizado em 120 pacientes submetidos à prostatectomia radical com seguimento por três anos. A alta

especificidade e sensibilidade da AMACR nos tumores malignos de próstata indicam que esse marcador pode vir a se transformar em um método auxiliar para confirmação diagnóstica de pacientes submetidos à biópsia de próstata.

Apesar de todos esses notáveis progressos em direção a marcadores mais eficientes para o CaP, ainda há muitas etapas a serem realizadas até que o real papel desses genes esteja completamente estabelecida. A expressão desses genes em pacientes portadores de neoplasia de próstata e a sua relação com o estadiamento da neoplasia ainda não foi completamente estabelecida. O estudo da distribuição gênica de DD3 e AMACR entre diversos estadiamentos de CaP é muito importante no conhecimento do prognóstico da doença, uma vez que o estágio anátomo-patológico é o fator mais importante no seguimento posterior dos pacientes.

O conhecimento desses marcadores moleculares em células de câncer de próstata da população de pacientes submetidos a PRR no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) proporcionará melhor avaliação da população estudada, bem como poderá, no futuro, auxiliar a distinguir pacientes com câncer de próstata localizado ou avançado.

REVISÃO DA LITERATURA

Cada vez mais a biologia molecular interage com a prática médica. O atendimento a pacientes é permeado, diariamente, com aspectos técnicos relacionados à análise gênica. Diversas doenças são descritas e tratadas conforme sua caracterização molecular, e os avanços desse campo permitiram uma verdadeira revolução em diversas áreas da medicina. A neoplasia de próstata é uma das doenças que se beneficiam com esse avanço, tendo havido um enorme progresso em seu tratamento desde a introdução do PSA na prática clínica (1-3). Apesar de seu enorme sucesso, o PSA apresenta várias falhas no câncer de próstata, especialmente na especificidade (4). A busca por novos marcadores é contínua, uma vez que se trata de uma doença de grande incidência na população masculina, com alto impacto na sobrevida e na qualidade de vida (5).

Diversos novos marcadores genéticos vem sendo descritos com resultados bastante promissores. Porém, ainda não foi completamente verificada sua validação para o uso clínico rotineiro. de Kok e cols. descrevem o DD3 como um dos mais promissores marcadores gênicos específicos para CaP, com potencial para uso diagnóstico futuramente, tanto em amostras de biópsia de próstata quanto em outros fluidos corporais como sangue, urina e secreção prostática (6). Nesse trabalho, os autores utilizaram a curva-ROC para análise de sensibilidade e especificidade, chegando a uma área sobre a curva de 0,98%. Laxman e cols. analisaram diversos marcadores, entre eles o DD3, em amostras de sedimento de urina, chegando a conclusão que a expressão gênica pode ser medida na urina e que a associação desses marcadores pode incrementar o poder

diagnóstico do PSA (7). Hessels e cols. compararam a expressão de DD3 e outro marcador (TMPRSS2-ERG) no sedimento urinário de 78 pacientes com CaP e 30 pacientes sem câncer, com resultados de sensibilidade de 62% para DD3 e 73% usando-se os dois marcadores combinados (8). Gils e cols. também estudaram DD3 em amostras de sedimento urinário, concluindo que DD3 aumenta a especificidade no diagnóstico de CaP (9).

O uso do DD3 como marcador prognóstico foi muito pouco estudado até o momento.

REFERÊNCIAS

1. Rohel KA, Han M, Ramos CG, Antenor JA, Catalona WJ. Cancer Progression and Survival Rates Following Anatomical Radical Retropubic Prostatectomy in 3478 Consecutive Patients: Long Term Results. *J Urol* 2004; 172(3):910-4.
2. Galper SL, Chen MH, Catalona WJ, Rohel KA, Richiet JP, D'Amico AV. Evidence to Support a Continued Stage Migration and Decrease in Prostate Cancer Specific Mortality. *J Urol* 2006; 175(3):907-12.
3. Freedland SJ, Mangold LA, Walsh PC, Partin AW. The Prostatic Specific Antigen Era Is Alive and Well: Prostatic Specific Antigen and Biochemical Progression Following Radical Prostatectomy. *J Urol* 2005; 174(4):1276-81.
4. Kwiatkowski M, Stieber P, Huber AR, Recher F. Selective Application of Tumor Markers PSA. *Ther Umsch* 2008; 65(9):493-501.
5. Hernandez J, Canby-Hagino E, Thompson IM. Biomarkers for the Detection and Prognosis of Prostate Cancer. *Curr Urol Rep* 2005; 6(3):171-6
6. de Kok JB, Verhaegen GW, Roelofs RW, Hessels D, Lambertus AK, Aalders TW e cols. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 2003; 63(15):4747-9.
7. Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, e cols. A First-Generation Multiplex Biomarker Analysis of Urine for the Early Detection of Prostate Cancer. *Cancer Res* 2008; 68:645-49.

8. Hessels D, Smit FP, Verhaegh J, Witjes A, Cornel EB, Schalken JA. Detection of TMPRSS2-ERG Fusion Transcripts and Prostate Cancer Antigen 3 in Urinary Sediments May Improve Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, 2007; 13:5103-8.

9. van Gils MPMQ, Hessels D, van Hooij O, Jannink SA, Peelen P, Hanssen SLJ et al. The Time-Resolved Fluorescence-Based PCA3 Test on Urinary Sediments after Digital Rectal Examination; a Dutch Multicenter Validation of the Diagnostic Performance. *Clin Cancer Res* 2007 13: 939-943.

OBJETIVOS

Objetivo principal: quantificar a expressão gênica de DD3 e racemase em pacientes com neoplasia de próstata submetidos à prostatectomia radical retropúbica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Objetivos secundários: correlacionar a expressão gênica com o exame anátomo-patológico dos pacientes e avaliar as diferenças dos genes encontradas em pacientes com neoplasia de próstata localizada e avançada.

ARTIGO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE DD3 E RACEMASE EM CÂNCER DE PRÓSTATA

*Brescianini LC¹, Koff W², Brum IS³, Pianta DB⁴, Biolchi V⁵, Schneider L⁵, Branchini G⁵
Berger M⁶*

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Serviço de Urologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral – Departamento de Fisiologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – UFRGS.

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular (LaGOM) – HCPA.

Endereço para Correspondência:

Luigi Comiran Brescianini

Rua Doutor Alcides Cruz, 346/404 – Santa Cecília – CEP 90630-160 – Porto Alegre - RS

Telefone: (55 51) 21018286 (55 51) 92831743

Fax: (55 51) 33433500

E-mail: luigicb@hotmail.com

1- Médico Urologista, Mestrando do PPG Medicina: Ciências Cirúrgicas - UFRGS; 2- Chefe do Serviço de Urologia, Professor Titular do Departamento de Cirurgia – UFRGS, Orientador do Mestrado; 3- Professora Associada do Departamento de Fisiologia – UFRGS, Pesquisadora do LaGON – Centro de Pesquisas HCPA; 4- Doutorando da Faculdade de Medicina UFRGS, Membro do PPG Fisiologia UFRGS, 5-

Membros do PPG Fisiologia UFRGS; 6- Médico Urologista, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia UFRGS, Co-Orientador do Mestrado

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é uma doença de grande impacto na população masculina após os 40 anos. Novos marcadores diagnósticos como DD3 e a racemase (AMACR) vem sendo estudados no câncer de próstata, mas seu uso como fator prognóstico ainda não foi descrito. Objetivos: descrever e correlacionar a expressão gênica do DD3 e AMACR nos pacientes com CaP submetidos à prostatectomia radical retropúbica (PRR); comparar sua expressão entre os pacientes com CaP localizado e avançado. Método: foram coletadas amostras de 42 pacientes; a expressão gênica de DD3 e AMACR foi medida por RT-PCR. PSA, biópsia de próstata e anátomo-patológicos foram obtidos do prontuário do paciente. Resultados: os níveis de DD3 e AMACR não obtiveram correlação com o estadiamento do tumor. O coeficiente de correlação de Spearman (ρ) foi -0,15 para DD3 ($p = 0,39$) e $\rho = 0,17$ para racemase ($p = 0,49$). A diferença média no DD3 entre CaP localizado e avançado foi de 0,74 (IC -0,70 – 0,21; $p = 0,30$); a diferença média da AMACR entre CaP localizado e avançado foi de 0,11 (IC -0,32 – 0,10; $p = 0,28$). Conclusões: Os resultados desse estudo demonstram que a expressão gênica de DD3 e AMACR não tem correlação significativa entre os diversos estadiamentos de CaP. A expressão gênica foi semelhante comparando-se os grupos de CaP localizado e avançado. Os dados desse estudo não nos permitem utilizar esses genes como marcadores prognósticos no CaP.

Palavras-chave: Câncer de próstata, marcadores tumorais, estadiamento.

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) apresenta uma incidência estimada de aproximadamente 52 casos para 100.000 habitantes no Brasil em 2008. No Rio Grande do Sul, a estimativa é ainda maior, ficando em 80,63 casos em 100.000 habitantes (1). Ocupa o segundo lugar na prevalência das neoplasias malignas em homens ficando somente atrás das neoplasias cutâneas tipo não-melanoma. É, ao mesmo tempo, a segunda causa de morte por câncer em homens, atrás apenas do câncer de pulmão. O grande número de pacientes acometidos por esta patologia e seu impacto populacional fazem com que seja considerada um problema de saúde pública, sendo alvo de numerosos estudos (2).

A investigação diagnóstica para rastreamento do CaP consiste na medição do nível sanguíneo do antígeno prostático específico (PSA) e no exame de toque retal. Na vigência de alterações nesses exames, a biópsia de próstata se faz necessária para diagnóstico da doença (3). O PSA, apesar de ser um excelente marcador tumoral em muitas situações, apresenta baixa especificidade para a neoplasia maligna da próstata, podendo ter níveis anormalmente elevados em diversas condições, como na hiperplasia benigna da próstata e em patologias infecciosas (4).

Tem sido tema de discussão constante o risco de hereditariedade relacionada ao CaP. Atualmente, são apresentadas evidências de herança mendeliana em casos familiares de neoplasia maligna da próstata. Steinberg e cols relataram que parentes em primeiro grau de pacientes com diagnóstico de CaP apresentaram risco duas a três vezes maior de

apresentar a patologia (5). Segundo Carter e cols a aglomeração de casos entre parentes de uma mesma família estaria relacionada à herança autossômica dominante de um alelo raro (frequência populacional = 0,003). Portadores deste alelo mutante apresentariam um risco cumulativo de 88% durante a vida de desenvolver CaP comparado com 5% dos que não são portadores (6). Embora seja dito que aproximadamente 10% dos casos de CaP ocorram em decorrência de herança de genes de alta penetrância, o estudo destes casos é de extrema importância, visto que há a possibilidade de rastreamento e prevenção dos pacientes com maior risco. Estudos epidemiológicos descobriram uma gama de associações entre polimorfismos genéticos específicos e o risco de desenvolver câncer de próstata (7,8). Também são fatores em estudos recentes a presença de determinados genes e receptores no CaP e sua correlação com o desfecho clínico e resposta terapêutica nesse grupo de pacientes. A presença de marcadores específicos no câncer de próstata, portanto, é vista como um campo promissor para o futuro(9).

O tratamento da neoplasia maligna da próstata depende basicamente do estadiamento da mesma, sendo sugerido tratamento cirúrgico ou radioterápico para doença confinada à próstata e hormonioterapia, quimioterapia e – mais recentemente – a imunoterapia para as doenças avançadas. É reconhecido que o ponto mais importante no tratamento das neoplasias de próstata é o estadiamento do paciente (tabela 1) (10). Embora o estadiamento completo TNM tenha várias subdivisões, os pacientes podem ser subdivididos em doença localizada (engloba estádios T1 e T2) e doença avançada (T3, T4, N+, M+). Um marcador que pudesse auxiliar no estadiamento do paciente poderia ser de grande valia na decisão terapêutica. A avaliação de novos marcadores específicos para

a neoplasia maligna da próstata é extremamente importante, tanto para avaliação de novos critérios diagnósticos quanto para prognóstico (11).

Tabela 1: Estadiamento patológico do câncer de próstata

T0	Sem evidência de neoplasia
T1a	Tumor encontrado após cirurgia benigna, 5% ou menos do tecido, Gleason <7
T1b	Tumor encontrado após cirurgia benigna, >5% Gleason 7 ou maior
T2a	Menos da metade de um lobo, unilateral
T2b	Mais da metade de um lobo, unilateral
T2c	Tumor bilateral
T3a	Extensão extra-capsular unilateral
T3b	Extensão extra-capsular bilateral
T3c	Invasão de vesículas seminais
T4a	Invasão do colo vesical, esfíncter externo ou reto
T4b	Invasão do elevador do ânus e/ou fixa à pelve
N+	Invasão de linfonodos
M+	Metástase à distância

Nos últimos anos, muitas pesquisas estão tentando demonstrar diversos genes que podem, de alguma forma, estar ligados a doenças prostáticas. O DD3 é um marcador que tem sido relacionado e encontrado em células modificadas de câncer de próstata. Alguns autores o consideram como sendo o marcador mais específico para esta doença. Hessels e cols. demonstraram valor preditivo negativo de 90% e sensibilidade de 67% em biópsias de câncer de próstata quando comparadas com células saudáveis (12). O DD3 tem sido

estudado como marcador promissor para diagnóstico do CaP em substituição ao PSA, que apresenta especificidade reduzida (9,13,14).

A AMACR (alfa-metil coenzima A racemase) codifica uma enzima que catalisa a racemização dos tioésteres carboxílicos ramificados coenzima A, sendo localizada nos peroxissomos e mitocôndrias (15). A AMACR tem importante função na biossíntese de ácidos biliares e beta-oxidação de ácido graxos de cadeia ramificada. Mutações no gene AMACR têm demonstrado serem causadoras de neuropatia motora-sensorial em adultos. Estudos têm demonstrado um aumento da expressão da AMACR nas células malignas da próstata, atuando como um marcador sensível e específico para o câncer, até mesmo nos casos precoces, estando presente em cerca de 80-100% dos casos (11,16). Além disso, a AMACR tem sido estudada como fator auxiliar para diagnóstico de neoplasias em biópsias de próstata e como marcador sorológico. A avaliação de espécimes de biópsias de próstata com imuno-histoquímica demonstrou alta relação com tumores de próstata tanto com escore de Gleason alto quanto baixo (17). Não foi encontrada correlação entre os níveis de AMACR com recorrência do PSA após cirurgia em um estudo realizado em 120 pacientes submetidos à prostatectomia radical com seguimento por 3 anos (18). A alta especificidade e sensibilidade da AMACR nos tumores malignos de próstata indicam que esse marcador pode vir a se transformar em um método auxiliar para confirmação diagnóstica de pacientes submetidos à biópsia de próstata (19,20).

Contudo, o real papel tanto do DD3 quanto da AMACR ainda está em estudo. A expressão desses genes em pacientes portadores de neoplasia de próstata e a sua relação com o estadiamento da neoplasia ainda não foi completamente estabelecida. O conhecimento desses marcadores moleculares em células de câncer de próstata da população de pacientes submetidos a cirurgia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

(HCPA) proporcionará melhor avaliação da população estudada, bem como poderá, no futuro, auxiliar a distinguir pacientes com câncer de próstata localizado ou avançado.

O objetivo desse trabalho é quantificar a expressão gênica de DD3 e racemase em pacientes com neoplasia de próstata submetidos à prostatectomia radical retropúbica e correlacionar a expressão gênica com o exame anátomo-patológico dos pacientes, bem como avaliar as possíveis diferenças dos genes encontradas em pacientes com neoplasia de próstata localizada e avançada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento e Coleta de Dados: Trata-se de um estudo transversal realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre com pacientes submetidos à prostatectomia radical retropúbica (PRR). Os pacientes foram selecionados ao acaso, conforme a ordem cronológica de cirurgias e a disponibilidade da equipe de realizar a coleta. A amostra de tecido prostático foi coletada o mais breve possível após a retirada do espécime cirúrgico. Entre 1-2 cm cúbicos foram propriamente retirados do tecido prostático, colocados em nitrogênio líquido e transportados para o laboratório. Os níveis de PSA pré-operatório, biópsia de próstata e resultados de exames anátomo-patológicos (AP) foram coletados do prontuário do paciente. Os AP foram sumarizados seguindo-se a classificação TNM (tabela 1).

CrITÉRIOS de inclusão: Pacientes com CaP submetidos à cirurgia de PRR no HCPA.

CrITÉRIOS de exclusão: Hormonioterapia prévia ao tratamento cirúrgico.

Extração de RNA total: As amostras foram submetidas à extração do RNA total com o reagente Trizol[®], utilizando-se o protocolo do fabricante (Life Technologies, Inc., Breda, Netherlands). O RNA foi quantificado espectrofotometricamente a 260 nm, utilizando-se alíquotas de 1 µl de RNA das amostras diluído em 499 µl de água, lidas em duplicata. A concentração de RNA na solução original foi calculada pela seguinte fórmula

(considerando-se que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 μ l de RNA por ml de solução):

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/ml}$$

onde A = absorvância e D = diluição da alíquota usada para a quantificação.

Avaliação da expressão gênica por RT-PCR: A expressão do mRNA dos genes DD3 e AMACR foi avaliada indiretamente pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de transcrição reversa (RT), ou RT-PCR. A síntese do cDNA foi feita a partir de 2 μg de RNA total, usando-se o kit Super-Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies®), seguindo os passos do protocolo indicado pelo fabricante. O cDNA foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR. As reações de PCR foram feitas utilizando-se oligonucleotídeos específicos (*primers*) para cada gene em estudo. As reações de PCR para todos os genes tiveram suas condições padronizadas (temperatura, número de ciclos, quantidade de oligonucleotídeos, quantidade de cDNA), a fim de otimizar as condições das reações para que os dados não fossem analisados em platô. Os resultados das amplificações foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose, e a quantificação do mRNA foi feita através da análise densitométrica das bandas através do sistema de captação de imagem ImageMaster VDS.

Aspectos Estatísticos: As distribuições de DD3 e racemase foram caracterizadas pela média, mediana, desvio-padrão e valores extremos. Os dados foram correlacionados através do coeficiente de correlação de Spearman (ρ). Posteriormente, foi realizada transformação logarítmica na expressão dos genes, para aproximação adequada da distribuição normal. O estadiamento foi subdividido entre dois grupos: localizado (T1 e T2) e avançado (T3, T4, N+, M+). A distribuição dos genes nos grupos foi estudada

utilizando-se o teste t de comparação entre duas amostras. O nível de significância foi considerado significativo como $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

Aspectos Éticos: O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Os pacientes foram entrevistados e assinaram termo de compromisso livre e esclarecido concordando com a coleta de material prostático (anexo 1).

RESULTADOS

Foram coletadas amostras de tecido prostático de 42 pacientes entre outubro de 2006 a março de 2008 (tabela 2). A idade média foi $62,60 \pm 6,86$ anos (47 – 72). O nível de PSA oscilou entre 1,70 e 73,30 ng/ml, com média de $10,66 \pm 13,76$. A biópsia de próstata (figura 1) foi positiva no lobo esquerdo em 17,1% dos pacientes (7 casos), positiva à direita em 34,1% (n = 14) e bilateral em 48,8% dos pacientes (n = 20). Um paciente não tinha registro do PSA e da biópsia.

Tabela 2: Dados clínico-laboratoriais

Variável	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	N
Idade	62,60	-	47	72	42
PSA	10,66	6,87	1,7	73,30	41
DD3	1,23	1,02	0,4	2,9	35
AMA CR	0,74	0,59	0,3	2,4	9

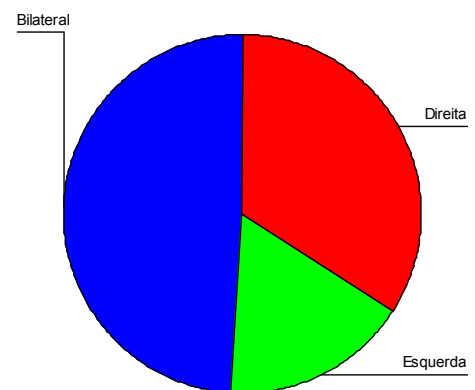


Figura 1

Dados da biópsia de próstata:

Bilateral- neoplasia em ambos os lobos;

Direita- neoplasia no lobo direito

Esquerda- neoplasia no lobo esquerdo

Anátomo-patológicos: Vinte e três pacientes (54,8%) apresentavam doença localizada, todos em estágio T2. A doença avançada foi achada em 19 pacientes (45,2%), 15 com estágio T3 e quatro com estágio T4. O sumário dos achados pode ser visto na tabela 3.

Tabela 3: Achados anátomo-patológicos

Estádio	Frequência	Percentual	Perc. Cumulativo	Localizado/Avançado
T1a	0	0	0	Localizado
T1b	0	0	0	Localizado
T2a	7	16,7	16,7	Localizado
T2b	3	7,1	23,8	Localizado
T2c	13	31,0	54,8	Localizado
T3a	9	21,4	76,2	Avançado
T3b	2	4,8	81,0	Avançado
T3c	4	9,5	90,5	Avançado
T4a	4	9,5	100,0	Avançado
T4b	0	0	100,0	Avançado
N+	0	0	100,0	Avançado
M+	0	0	100,0	Avançado

DD3: A análise da expressão do gene DD3 pôde ser analisada em 35 pacientes (figura 2), com média de 1,23 (0,41 – 2,90) e desvio-padrão 0,60 (tabela 2). Não houve correlação significativa entre DD3 e estadiamento ($\rho = -0,15$, $p = 0,39$) (figura 3).

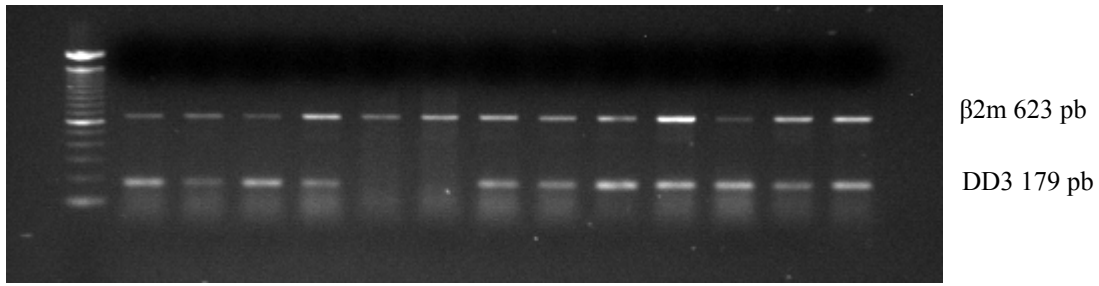


Figura 2: Gel de agarose a 2% representando as bandas de DD3 (179 pb) e de β 2m (623 pb) em amostras de CaP.

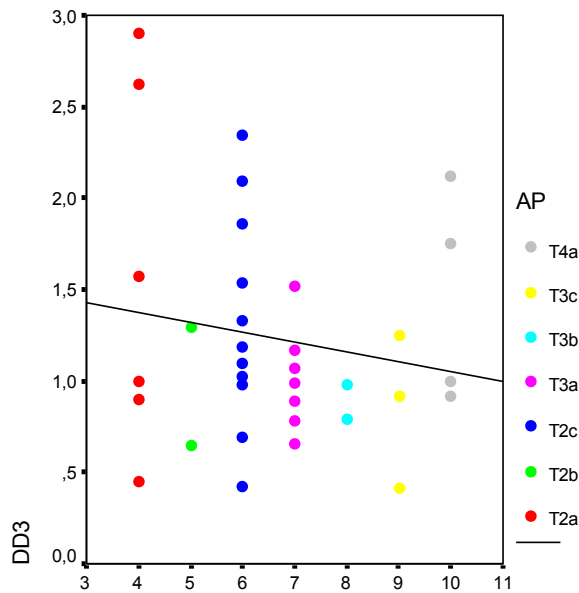


Figura 3: Gráfico de dispersão. DD3- Expressão gênica de DD3 em Unidades Arbitrárias – UA. Nota-se dispersão homogênea do gene sobre os diversos estadiamentos anátomo-patológicos.

A média da expressão gênica de DD3 no grupo de neoplasias localizadas foi de $1,36 \pm 0,71$. No grupo de neoplasias avançadas, a média foi $1,07 \pm 0,42$. O teste t foi utilizado para a comparação entre os grupos de neoplasia localizada e avançada, sendo necessária a transformação logarítmica do DD3 (figura 4). Essa análise não demonstrou diferença significativa entre os dois grupos, com diferença média de 0,74 e intervalo de confiança entre -0,70 a 0,21 ($p = 0,30$).

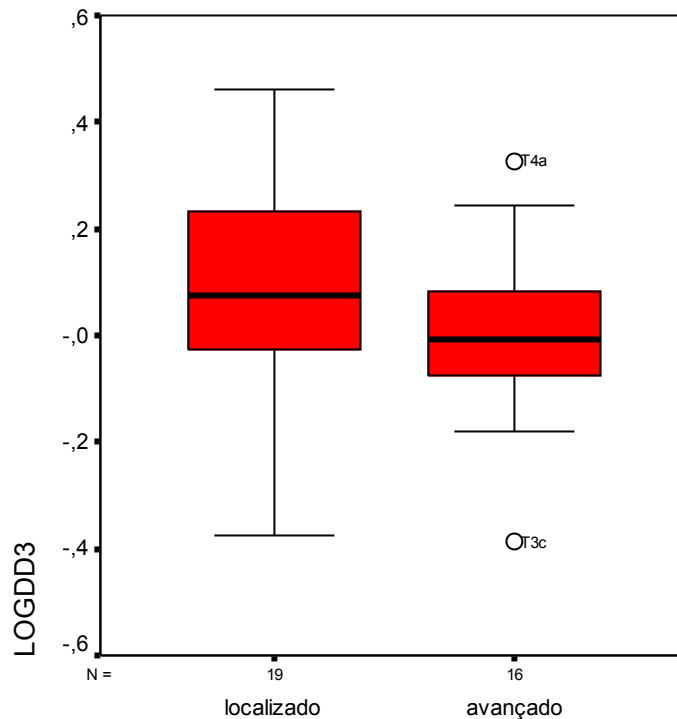


Figura 4: Distribuição do DD3 nos AP localizado e avançado. LOGDD3- Expressão gênica logarítmica de DD3 em Unidades Arbitrárias (UA). Os valores negativos aparecem devido à transformação logarítmica.

AMACR: O gene da racemase teve média de 0,74 (0,30 – 2,40) e desvio-padrão 0,46. Os resultados foram aferidos em 19 pacientes (figura 5). Não houve correlação significativa entre a correlação entre os níveis de AMACR e o estadiamento ($\rho = 0,17$, $p = 0,49$) (figura 6).

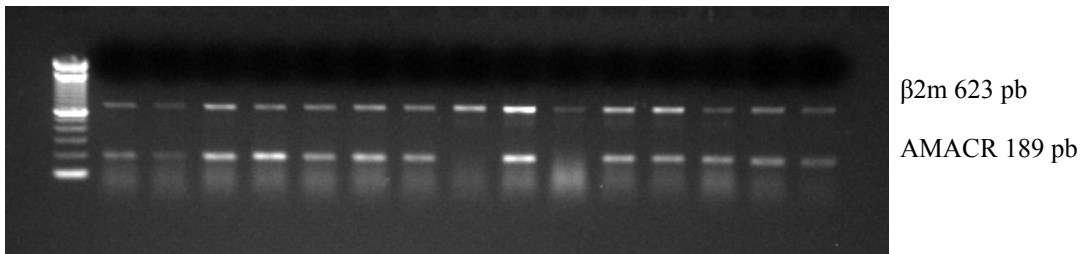


Figura 5: Gel de agarose a 2% representando as bandas de AMACR (189 pb) e de β2m (623 pb) em amostras de CaP.

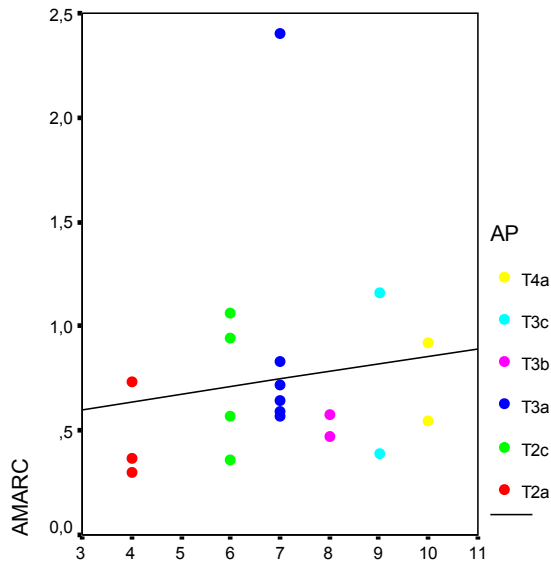


Figura 6: Gráfico de dispersão. AMARC- Expressão gênica de racemase em UA. Nota-se dispersão homogênea do gene sobre os diversos estadiamentos anátomo-patológicos.

A expressão gênica da AMACR em pacientes com câncer de próstata localizado teve média $0,61 \pm 0,30$. A média no grupo avançado foi $0,81 \pm 0,54$. Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos, com diferença média de 0,11 entre os grupos e intervalo de confiança entre -0,32 e 0,10 ($p = 0,28$) (figura 7).

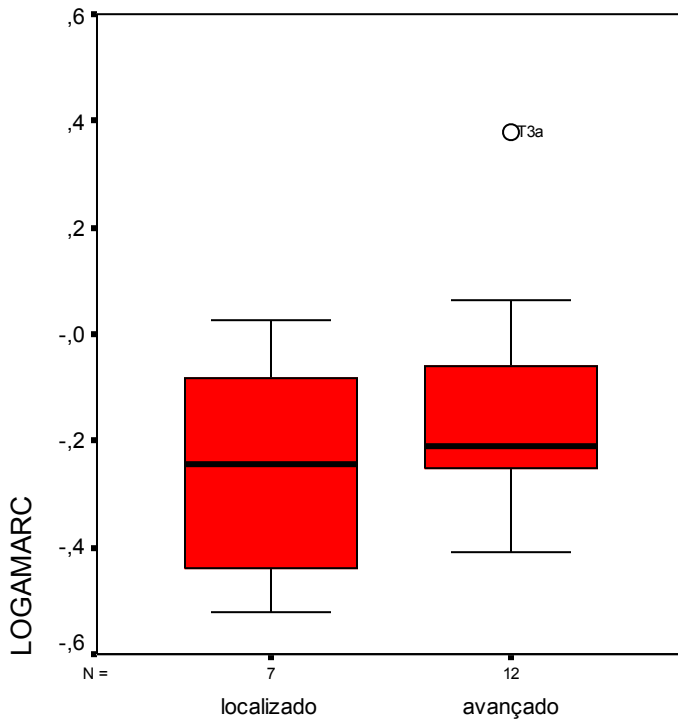


Figura 7: Distribuição da racemase nos AP localizado e avançado. LOGAMARC- Expressão gênica logarítmica de racemase em UA. Os valores negativos aparecem devido à transformação logarítmica.

DISCUSSÃO

Atualmente, há uma busca intensa em direção a marcadores nas doenças prostáticas. Devido à grande incidência de CaP, qualquer progresso feito pode ter impacto populacional significativo em termos de sobrevida, qualidade de vida e do custo ao sistema público de saúde, especialmente em locais onde as taxas de CaP são mais altas. Existem poucos estudos que comparam a expressão gênica de novos marcadores com estadiamentos anátomo-patológicos. Nosso estudo apresentou a correlação feita entre os vários estádios de pacientes submetidos a PRR e também mostrou a comparação da expressão gênica entre pacientes com CaP localizado e avançado.

Os níveis de PSA nesse estudo ficaram majoritariamente até 10 ng/ml, porém, dois pacientes apresentavam PSA acima de 60,00 ng/ml (um paciente com valor 73,30 ng/ml), o que desviou a média para o nível de 10,66 ng/ml.

Os casos de doença prostática avançada estão um pouco acima do encontrado na literatura, fator que pode ser explicado, em parte, pela dificuldade e/ou demora ao acesso do paciente ao sistema público de saúde. O alto nível de bilateralidade na biópsia de próstata corrobora esse achado. Amling e cols. descreveram, em uma análise de 2782 pacientes com CaP, 68% de casos localizados e 32% avançados (21). Já Pettus e cols. analisaram 800 casos de prostatectomia radical, com 62,25% dos pacientes sendo estadiados como câncer localizado (22).

Os avanços recentes na área de biologia molecular são bastante promissores, com estudos genéticos cada vez mais interligados na área médica. O DD3 vem sendo estudado

como um novo marcador com maior especificidade em CaP, mas há poucos trabalhos comparando sua expressão entre os diversos estadiamentos neoplásicos. Nossa amostra demonstrou uma distribuição de DD3 semelhante nos diferentes estádios da neoplasia. Taskén e cols. citam o DD3 e AMACR como novos potenciais marcadores para câncer de próstata, mas não descreveram seu uso clínico (23), Schemk-Braat e cols. também fizeram descrição de vários novos marcadores em estudo - entre eles o DD3 - mas também sem validação clínica (24). Tao e cols. demonstraram expressão aumentada de DD3 em CaP, comparando com não-portadores de câncer. Contudo, não foi feita comparação entre os estadiamentos neoplásicos (25). Bialkowska - Hobrankska e cols. analisaram retrospectivamente o DD3 de 26 pacientes com CaP, não demonstrando correlação com estadiamento patológico (26).

A AMACR também não obteve correlação com estadiamento, sendo sua distribuição semelhante nos diversos grupos AP. A comparação da expressão gênica entre os grupos de câncer localizado e avançado não demonstrou diferença significativa. Zielie e cols. descreveram o potencial uso da AMACR juntamente com PSA em secreção prostática como método auxiliar no diagnóstico de CaP (27). Stewart e cols. analisaram a utilidade da AMACR na rebiópsia de próstata em pacientes com neoplasia intra-epitelial, mas não a descreve como marcador prognóstico (28). Uma coorte de 4,8 anos de duração (Rubin e cols.) demonstrou maior recorrência do CaP quando pacientes apresentavam expressão baixa de AMACR, sugerindo que a expressão elevada do gene esteja relacionada com melhor prognóstico e a expressão baixa, com pior prognóstico (29).

Nosso estudo descreveu a expressão dos genes DD3 e AMACR numa população de pacientes submetidos à PRR no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os resultados demonstram que não houve diferença da expressão gênica nos estadiamentos anátomo-patológicos, não sendo possível, nesse trabalho, utilizar esses genes como marcadores prognósticos de CaP.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer aos membros do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral – Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS – UFRGS, juntamente aos pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia – UFRGS. Sem sua ajuda, a análise da expressão gênica jamais seria possível. Nossos agradecimentos também a todos os residentes e funcionários do Centro Cirúrgico do HCPA que auxiliaram na fundamental tarefa da coleta de material prostático.

FINANCIAMENTO

Este trabalho contou com recursos provenientes das seguintes instituições:

FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – HCPA

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer – INCA (Brasil). Incidência de Câncer no Brasil – Estimativa 2008. Brasília, Ministério da Saúde; 2008.
2. Nelen V. Epidemiology of prostate cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2007; 175:1-8.
3. Carter HB, Allaf ME, Partin AW. Diagnosis and Staging of Prostate Cancer. In: Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters, CA, Wein AJ, editors. *Campbell-Walsh Urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007 p. 2912-31.
4. Hochreiter WW. The issue of prostate cancer evaluation in men with elevated prostate-specific antigen and chronic prostatitis. *Andrologia* 2008; 40(2):130-3.
5. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family risk of prostate cancer. *Prostate* 1990; 17(4):337-47.
6. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(8):3367-71.
7. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, Henderson BE. 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 1992; 339(8798):887-9.
8. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal Carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):427-33.

9. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW *et al.* DD3, a Very Sensitive and Specific Marker to Detect Prostate Tumors. *Cancer Res* 2002; 62(9):2695-8.
10. Catalona WJ, Han M. Definitive Therapy for Localized Prostate Cancer – An Overview. In: Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters, CA, Wein AJ, editors. *Campbell-Walsh Urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007 p. 2932-46.
11. Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer. *Clin Chem*. 2008 Oct 16. [Epub ahead of print].
12. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B *et al.* DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003; 44(1):8-15; discussion 15-6.
13. Schalken JA, Hessels D, Vergaeh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology* 2003; 62(5 Suppl 1):34-43.
14. Gandini O, Luci L, Stigliano A, Lucera R, Di Silverio F, Toscano V, *et al.* Is DD3 a new prostate-specific gene? *Anticancer Res*. 2003; 23(1A):305-8.
15. Trojan L, Schaaf A, Steidler A, Haak M, Thalmann G, Knoll T, *et al.* Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2005; 25(1A): 183-91.

16. van Morselaar RJ, Voest EE. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 197(1-2):239-50.
17. Murphy AJ, Hedges CS, Lannigan G, Sheils O, O'Leary J, Loftus B. Heterogeneous expression of alpha-methylacyl-CoA racemase in prostatic cancer correlates with Gleason score. *Histopathology.* 2007; 50(2):243-51.
18. Adley BP, Yang XJ. Application of alpha-methylacyl coenzyme A racemase immunohistochemistry in the diagnosis of prostate cancer: a review. *Anal Quant Cytol Histol.* 2006; 28(1):1-13.
19. Zehentner BK, Secrist H, Zhang X, Hayes DC, Ostenson R, Goodman G, *et al.* Detection of alpha-methylacyl-coenzyme-A racemase transcripts in blood and urine samples of prostate cancer patients. *Mol Diagn Ther.* 2006; 10(6):397-403.
20. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrete TR, Sanda MG, *et al.* Alpha-methylacyl coenzima A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; 287(13):1662-70.
21. Amling CL, Blute ML, Berstralh EJ, Seay TM, Slezak J, Zincke H. Long-Therm Hazard of Progression after Prostatectomy for Clinically Localized Prostate Cancer: Continued Risk of Biochemical Failure after 5 Years. *J Urol,* 2000; 164(1):101-5.
22. Pettus JA, Weight CJ, Weight CJ, Thompson CJ, Middleton RG, Stephenson RA. Biochemical Failure in Men Following Radical Retropubic Prostatectomy: Impact of Surgical Margin Status and Location. *J Urol* 2004; 172(1):129-32.

23. Taskén KA, Angelsen A, Svindland A, Eide T, Berge V, Wahlquist R, Karlsen S. Markers for Diagnosis, Prediction and Prognosis of Prostate Cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2005; 125(23):3279-82.
24. Schenk-Braat EA, Bangma CH. The Search for Better Markers for Prostate Cancer than Prostate-Specific Antigen. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2006; 150(23):1286-90.
25. Tao ZH, Mao XL, Wang CH, Chen XD, Yu KY, Weng ZL, *et al.* Quantitative Detection of DD3 mRNA In Prostate Cancer Tissues By Real-Time Fluorescent Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Ahonghua Nan Ke Xue*, 2007; 13(2):130-3.
26. Bialkowska-Hobrzanska H, Driman DK, Fletcher R, Harry V, Razvi H. Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase, Survinin DD3 and PCGEM1 messenger RNA in Archival Prostate Carcinoma Tissue. *Can J Urol*, 2006; 13(1):2967-74.
27. Zielie PJ, Mobley JA, Ebb RG, Jiang Z, Blute RD, Ho SM. A Novel Diagnostic Test For Prostate Cancer Emerges From The Determination Of Alpha-Methylacyl-Coenzyme A In Prostatic Secretions. *J Urol*, 2004; 172(3):1130-3.
28. Stewart J, Fleshner N, Cole H, Toi A, Sweet J. Prognostic Significance of Alpha-methylacyl-coA Racemase Among Men With High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia In Prostate Biopsies. *J Urol* 2008; 179(5):1658-9.
29. Rubin MA, Bismar TA, Andrén O, Mucci L, Kim R, Shen R, *et al.* Decreased α -Methylacyl CoA Racemase Expression in Localized Prostate Cancer is Associated

with an Increased Rate of Biochemical Recurrence and Cancer-Specific Death.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14(6):1424-32.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: Avaliação de marcadores moleculares em células neoplásicas de próstata

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar a formação desses tumores. Como o Sr. tem o diagnóstico de _____ e lhe foi recomendado cirurgia, gostaríamos de convidá-la para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em uma coleta de amostra de sangue no dia da sua cirurgia e a permitir que após retirada da peça cirúrgica dois pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético. O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após término da cirurgia.

Quanto à coleta sanguínea, o Sr. será submetida à coleta de 10 ml de sangue venoso, no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais. Os riscos envolvidos com essa coleta são mínimos, sendo a ocorrência de pequenos hematomas/equimoses a alteração mais comum.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras por até 5 anos para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para a senhor.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são o Prof. Dr. Walter J. Koff, o Prof. Dr. Milton Berger, o Dr. Luigi Brescianini (fone: 92831743), o Dr. Daniel Melecchi (fone: 99838297) e o Dr. Marcelo Quintanilha (fone: 92492624). Caso o Sr. tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contactar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data _____

Paciente ou responsável _____

Pesquisador _____

**ANALYSIS OF DD3 AND RACEMASE GENE EXPRESSION IN PROSTATE
CANCER**

*Brescianini LC¹, Koff W², Brum IS³, Pianta DB⁴, Biolchi V⁵, Schneider L⁵, Branchini G⁵
Berger M⁶*

Medicine Postgraduate Program: Surgical Science – Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS).

Division of Urology – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Laboratory of Endocrine and Tumor Molecular Biology – Department of Physiology - Institute of Basic Health Sciences (ICBS) – UFRGS

Laboratory of Molecular Gynecology and Obstetrics (LaGOM) – HCPA

Correspondence Address:

Luigi Comiran Brescianini

346/404 Doutor Alcides Cruz St.– Santa Cecília – CEP 90630-160 – Porto Alegre – RS – Brazil.

Phone: (55 51) 21018286 (55 51) 92831743

Fax: (55 51) 33433500

E-mail: luigicb@hotmail.com

1- MD, Urologist, Researcher of Surgery Postgraduate Program – UFRGS; 2- MD, PhD, Urologist, Head of Division of Urology - HCPA, Professor of Medicine – UFRGS; 3- Associate Professor – Division of Physiology – UFRGS, LaGON Researcher - HCPA; 4- Medicine Student – UFRGS, Member of Physiology

Postgraduate Program; 5- Members of Physiology Postgraduate Program; 6- MD, PhD, Urologist, Adjunct Professor of Medicine - UFRGS.

ABSTRACT

Introduction: Prostate cancer (PCa) is a major public health issue in men older than 40 years old. New genetic diagnostic markers like DD3 and racemase (AMACR) have been subject of several studies in prostate cancer, but the real value of these markers in terms of prognosis has not been studied yet. Objectives: To describe and correlate DD3 and AMACR gene expression in PCa patients who underwent radical retropubic prostatectomy (RRP), and to compare their expression in patients with localized and advanced tumors. Methods: Forty two prostate samples were collected. DD3 and AMACR gene expression were measured by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Clinical and pathological data were obtained from patient's registry. Results: DD3 and AMACR did not correlate with pathological stage. Spearman's correlation coefficient was $\rho = -0.15$ ($p = 0.39$) and $\rho = 0.17$ ($p = 0.49$) for DD3 and AMACR, respectively. Mean difference in DD3 expression between localized and advanced disease was 0.74 (CI -0.70 – 0.21; $p = 0.30$); mean difference in AMACR between groups was 0.11 (CI -0.32 – 0.10; $p = 0.28$). Conclusions: Comparison of gene expression between localized and advanced tumors has not shown significant differences. Correlation among different pathological groups was not significant. DD3 and AMACR, although expressed in prostate cancer tissue, cannot be used as prognostic markers.

Key-Words: Prostate cancer, tumor markers, staging

INTRODUCTION

Prostate cancer has an overall incidence of 52 cases per 100,000 inhabitants in Brazil. Only in Rio Grande do Sul, we have estimated 80.63 cases per 100,000 inhabitants in 2008 (1). This is the second most common cause of malignant neoplastic diseases, only getting behind non-melanoma cutaneous cancer. At the same time, the prostate cancer is the second leading cause of death among neoplastic diseases in men, being pulmonary cancer the number one. The impact of men with this disease makes prostate cancer be considered a public health problem, with a very large amount of studies (2).

Screening investigation for prostate cancer is made measuring blood levels Prostate-Specific Antigen (PSA), plus digital rectal examination. If any of these exams is considered abnormal, one should perform biopsy of the prostate in order to confirm the cancer diagnosis (3). Despite PSA being an excellent tumoral marker, it has low specificity for malignant prostate disease. PSA levels can be elevated in many conditions, like in benign prostatic hyperplasia and in prostatic infections (4).

Heredity is a controversial theme in prostate cancer. There are evidences of Mendelian inheritance in familiar cases. Steinberg *et al* related a two or three-fold increase in cancer risk when first-degree relatives had a diagnosis of prostate cancer (5). According to Carter *et al*, the agglomeration of cases among relatives of the same family would be related to autosomic dominant inheritance of a rare allele (populational frequency = 0.003). People with this allele could have a lifetime cumulative risk of

prostate cancer of 88%, comparing with 5% of non-carriers (6). Although only 10% of prostate cancer occurrence is due to the inheritance of high-penetrance genes, the study of these cases are very important, once one could identify these high-risk patients and, therefore, perform a better screening and prevention. Epidemiologic studies discovered a large association between genetic polymorphism and the risk of prostate cancer development (7,8). Some genes and cellular receptors are also subjects of studies, including their correlation with patient's clinical outcome and therapeutic response. The presence of specific markers in prostate cancer is a very promising field in terms of diagnosis, treatment and prognosis (9).

The treatment of prostate cancer is guided according to the stage of the disease. In localized cancer, the treatment is usually surgery or radiotherapy. In advanced prostate cancer, there is no definitive therapy, although palliation can be achieved in most cases with hormonotherapy, chemotherapy and – more recently – immunotherapy. It's widely accepted that the most important predictor of cancer outcome is the patient's stage (table 1) (10). Although the complete TNM system has several divisions, we can divide all the patients into localized cancer (including stages T1 and T2 – confined to the prostate) and advanced cancer (stages T3, T4, N+, M+, all of these outside the prostate capsule). Any new specific marker targeting diagnosis and prognosis would consist in very important data (11).

Table 1: Pathological Staging of prostate cancer

T0	No evidence of primary tumor
T1a	Tumor found in tissue after benign surgery, 5% or less is cancerous and Gleason score < 7
T1b	Tumor found in tissue after benign surgery, > 5% is cancerous and Gleason score 7 or higher
T2a	Tumor involves less than half of one lobe
T2b	Tumor involves more than half of one lobe, but not both lobes
T2c	Tumor involves more than one lobe
T3a	Unilateral extracapsular extension
T3b	Bilateral extracapsular extension
T3c	Tumor invades seminal vesicle(s)
T4a	Tumor invades bladder neck, external sphincter and/or rectum
T4b	Tumor invades levator muscle and/or fixed to pelvic wall
N+	Metastasis in regional lymph nodes
M+	Distant metastatic spread

In recent years, a lot of research is being conducted to demonstrate several genes somewhat linked to prostatic diseases. DD3 is a new marker that has been related and found in modified prostate cancer cells. Some authors consider DD3 the most specific marker for carcinoma of the prostate. Hessels *et al* have shown negative predictive value of 90% and sensibility of 67% in prostate cancer biopsies, comparing with normal cells (12). DD3 is being studied as a promising marker with some better characteristics than the low-specific PSA (9,13,14).

AMACR (Alpha-Methylacyl Coenzyme A Racemase) codifies an enzyme that makes the catalytic racemization of carboxylic ramified coenzyme A thioesters. AMACR is located in peroxysomes and mitochondries (15). Racemase has an important function in biliary acids biosynthesis and beta-oxidation of ramified chain fatty-acids. Mutation of AMACR's gene occurs in some motor-sensory neuropathy in adults. Studies are demonstrating an AMACR's overexpression in malignant prostate cells, acting as a sensitive and specific marker of cancer, even in early cases, occurring in 80 to 100% of all cases (11, 16). Besides, AMACR is also being studied as a serologic marker and as an auxiliary factor in the diagnosis of prostate cancer in biopsy samples. The evaluation of prostatic biopsy specimens with immunohistochemical staining was related with prostate tumors, regardless of the Gleason score (17). No correlation with AMACR levels and PSA levels was found after surgery in a 3- year follow-up study carried out with 120 patients who underwent radical prostatectomy (18). AMACR's high sensibility and specificity in malignant tumors indicate a potential new marker in diagnosis confirmation in patients who undergo doubtful biopsy of the prostate (19, 20).

Despite all the progress toward new markers, the complete role of DD3 and AMACR is still under study. The expression of these genes in patients with prostate cancer and the relationship with neoplasia staging has not been established yet. Knowledge of these molecular markers in prostate cancer cells in patients who undergo radical retropubic prostatectomy in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) will provide better assessment of the studied population and may, in the future, help to distinguish patients with localized or advanced prostate cancer.

The purposes of this study are to evaluate the gene expression of DD3 and AMACR in patients with prostate cancer who undergo radical retropubic prostatectomy (RRP), and to correlate the gene expression with pathologic stage findings and measure the gene patterns between localized and advanced cancer.

METHOD

Study Design: This is a cross-sectional study performed in Hospital de Clínicas de Porto Alegre with surgically treated prostate cancer patients. All the patients were recruited according to their scheduled surgery in chronological order and the availability of the collecting team. The tissue sample was collected as soon as possible after the extraction of the prostate. Approximately 1-2 cc was properly collected, stored in liquid nitrogen and carried to the laboratory. Preoperative PSA levels, biopsy of the prostate data and pathologic results were collected from patient's registry. Pathologic findings were summarized according to the TNM classification (table 1).

Inclusion criteria: Patients with prostate cancer that undergo RRP surgery.

Exclusion criteria: Hormonotherapy prior surgical treatment.

Total RNA extraction: Tissue's total RNA was extracted with Trizol® reagent, using the manufacturer's protocol (Life Technologies, Inc., Breda, Netherlands). RNA was spectrophotometrically quantified at 260 nm using 1 µl aliquot's RNA in the samples diluted in 499 µl of water, read in duplicate. RNA's concentration in original solution was calculated by this formula (considering the correspondence of one absorbance unit at 260 nm to 40 µl of RNA per ml of solution):

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Were A = absorbance and D = aliquot's dilution to quantify

RT-PCR gene expression evaluation: DD3 and AMACR mRNA expression was evaluated indirectly by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

technique. cDNA synthesis was made initially with 2 µg of total RNA, using the Super-Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen, Life Technologies®), following the manufacturer's indicated steps. cDNA was kept frozen in -20° C (-4° F) until the PCR amplification. PCR reactions were made using specific primers for each studied gene. All the genes' PCR reactions had their conditions patternized (temperature, cycle numbers, primers quantity, cDNA quantity), in order to optimize the reaction condition to avoid the data analysis in plateau. The results of the amplifications were visualized by agarose gel electrophoresis, and the quantification of mRNA was performed analyzing the density of the bands using the ImageMaster VDS image caption system.

Statistics: Distribution of DD3 and AMACR were characterized in terms of mean, median, standard deviation and extreme values. These data were correlated using the Spearman's rho coefficient (ρ). Afterwards, the genes expression had logarithmic transformation to achieve a normalized distribution. The pathological stage was divided into two groups: localized (T1 and T2) and advanced (T3, T4, N+, M+). A two-sample t-test was used to analyze the gene distribution between the groups. Significance was considered as $p < 0.05$, confidence interval (CI) of 95%.

Ethical aspects: This study was submitted to the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the Brazilian National Committee of Ethics in Research (CONEP). All the patients were interviewed and signed a term agreeing with the collection of a prostate sample (annex 1).

RESULTS

Forty-two patients had prostate tissue collected (October 2006 to March 2008), the data are summarized in table 2. The mean age was 62.60 ± 6.86 years old (range 47 to 72). PSA levels range were 1.70 to 73.30 ng/ml, mean 10.66 ± 13.76 . The biopsy of the prostate (figure 1) was positive in left lobe in 17.1% (7 cases), positive in right lobe in 34.1% (14 cases) and bilateral in 20 patients (48.8%). One patient had PSA and biopsy data missing.

Table 2: Clinical and laboratorial data

Variab le	Mea n	Medi an	Mi n	Ma x	N
Age	62.6 0	-	47	72	4 2
PSA	10.6 6	6.87	1.7 0	73.3 0	4 1
DD3	1.23	1.02	0.4 1	2.90	3 5
AMAC R	0.74	0.59	0.3 0	2.40	1 9

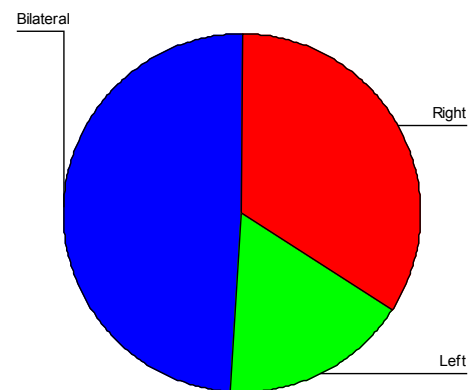


Figure 1: Biopsy of the prostate

Bilateral- neoplasia in both lobes;

Right- right lobe cancer

Left- left lobe cancer

Pathological aspects: twenty-three patients (54.8%) had localized disease, all of them in T2 stage. Advanced disease was found in 19 patients (45.2%), 15 in T3 stage and four in T4 stage. Pathologic summary can be viewed in table 3.

Table 3: Pathologic stage findings

Stage	Frequency	Percentual	Cumulative Perc	Localized/Advanced
T1a	0	0	0	Localized
T1b	0	0	0	Localized
T2a	7	16.7	16.7	Localized
T2b	3	7.1	23.8	Localized
T2c	13	31.0	54.8	Localized
T3a	9	21.4	76.2	Advanced
T3b	2	4.8	81.0	Advanced
T3c	4	9.5	90.5	Advanced
T4a	4	9.5	100.0	Advanced
T4b	0	0	100.0	Advanced
N+	0	0	100.0	Advanced
M+	0	0	100.0	Advanced

DD3: Gene expression could be asserted in 35 patients (figure 2), with mean 1.23 ± 0.60 Arbitrary Units (UA), range 0.41 – 2.90 (table 2). The correlation between DD3 and pathological staging was not significant ($\rho = -0.149$, $p = 0.39$) (figure 3).

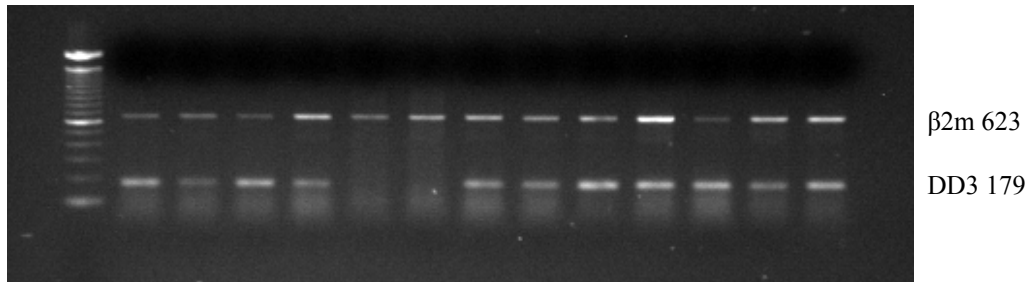


Figure 2: agarose 2% gel representing DD3 bands (179 bp) and $\beta 2m$ (623 bp) in PCa samples

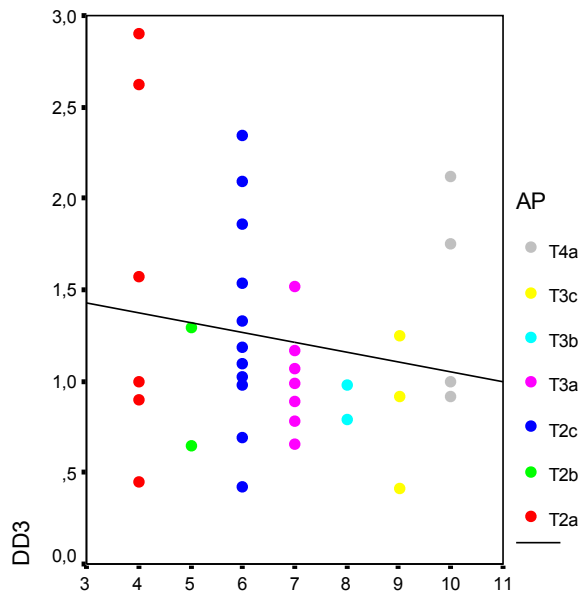


Figure 3: Scatter of gene expression. DD3- gene expression of DD3 in Arbitrary Units (AU). Homogeneous dispersion is seen among the pathologic stages.

DD3 mean expression in localized neoplasia group was 1.36 ± 0.71 . In the advanced group, the mean was 1.07 ± 0.42 . Logarithmic transformation was performed and the t-test was used to compare means between the groups (figure 4). This analysis has not shown a significant difference between the groups, with mean difference of 0.74 (CI $-0.70 - 0.21$, $p = 0.30$).

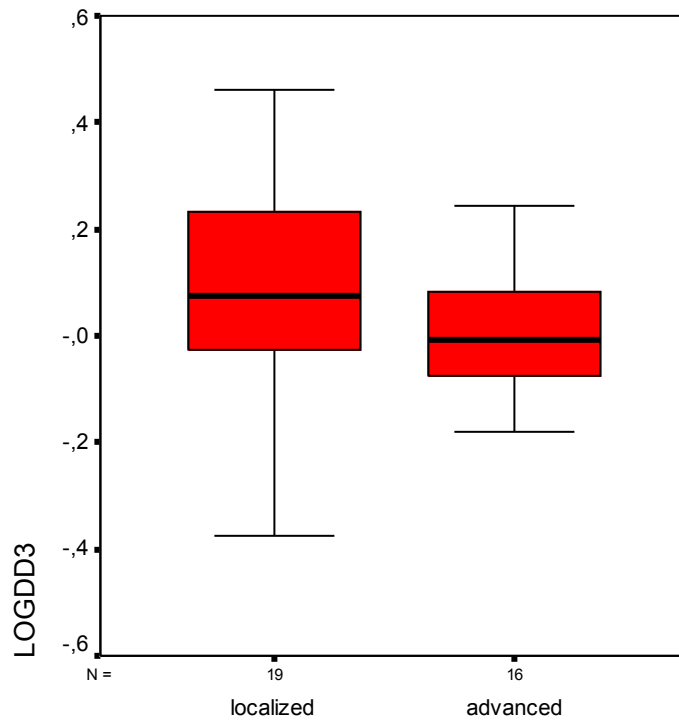


Figure 4: DD3 distribution between localized and advanced cancer. LOGDD3- Logarithmic expression of DD3 in AU. Negative values are seen due to logarithmic transformation.

AMACR: Results were asserted in 19 patients (figure 5), with mean 0.74 ± 0.46 AU (range 0.30 – 2.40). Correlation between AMACR and pathologic stage again was not significant ($\rho = 0.16$, $p = 0.49$) (figure 6).

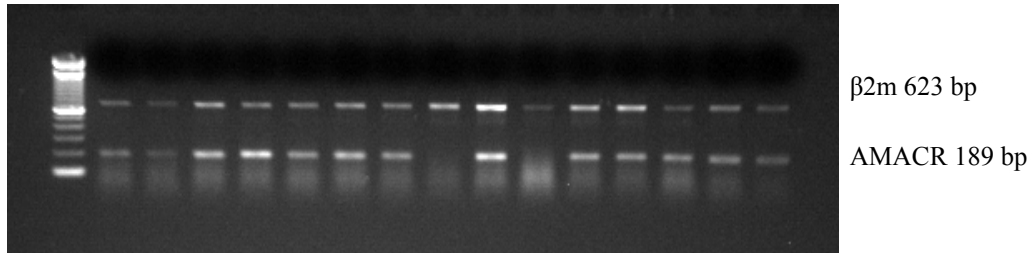


Figure 5: agarose 2% gel representing AMACR bands (179 bp) and β 2m (623 bp) in PCa samples

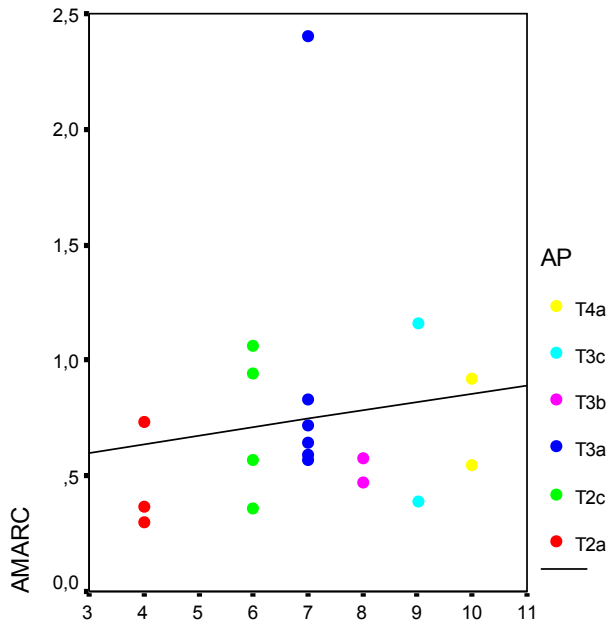


Figure 6: Scatter of gene expression. AMARC- gene expression of racemase in AU. Again, there is homogeneous dispersion among the pathologic stages.

AMACR gene expression in localized cancer patients had a mean of 0.61 ± 0.30 . Mean in advanced disease was 0.81 ± 0.54 . Statistical difference between the groups was not significant (mean difference 0.11, CI -0.32 – 0.10, $p = 0,28$) (figure 7).

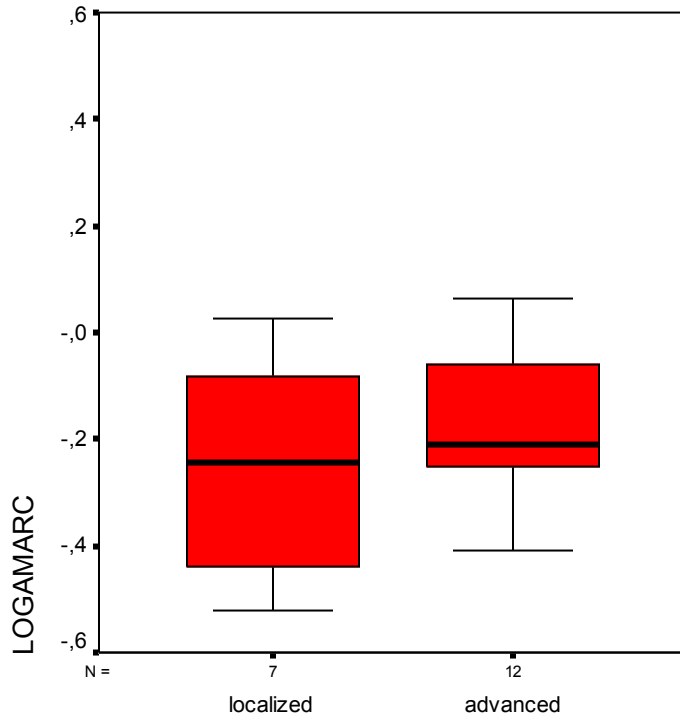


Figure 7: AMACR distribution between localized and advanced cancer. LOGAMARC-Logarithmic expression of racemase in AU. Negative values are seen due to logarithmic transformation.

COMMENTS

Many studies are being conducted towards new markers of prostatic diseases. Due to its high incidence, any progress in PCa could have important population impact in terms of survival, quality of life and costs to public health system. There are very few studies that compare new marker's gene expression with pathological staging. Our sample correlated DD3 and AMACR expression among PCa stages and compared the distributions of the genes in localized and advanced PCa groups.

In our study, the PSA levels were < 10.00 ng/ml in most cases. However, two patients had levels higher than 60.00 ng/ml, deviating the mean to 10.66 ng/ml. The advanced prostate cancer stages were higher than reported in the literature, and this may be in part due to the difficulty of the patient to access the public health system in Brazil, leading to a time delay in treatment. The high level of cases of bilateral cancer in biopsy support these findings. Amling *et al* described a 2,782 patient analysis with 68% localized prostate cancer and 32% advanced cancer (21). Pettus *et al* reported 800 RPP cases, 62.25% being localized (22).

Recent advances in molecular biology are really promising, being genetics and clinical medicine increasingly interrelated. The DD3 is being studied as a new marker with greater specificity, but there are few papers comparing its expression among the prostate cancer pathologic stages. Our sample has shown an equal distribution of DD3 in the different stages of prostate cancer. Taskén *et al* cite DD3 and AMACR as new potential markers to prostate cancer, but they didn't describe their clinical use (23),

Schemk-Braat *et al* also performed several new markers – DD3 among them – but they didn't evaluate their clinical use (24). Tao *et al* have shown a higher DD3 expression in prostate cancer comparing to non-prostate cancer patients, yet DD3 was not compared with the pathologic stage (25). Bialkowska – Hobraska *et al* analyzed retrospectively DD3 expression in 26 patients, without pathological stage correlation (26).

AMACR also has no correlation with pathologic staging, being its distribution similar in the several stages. The gene expression of AMACR between localized versus advanced cancer also showed no significant difference. Zielie *et al* described the AMACR's potential role using it with PSA in prostatic secretions as an auxiliary method in diagnosing prostate cancer (27). Stewart *et al* analyzed the utility of AMACR in rebiopsies of intra-epithelial neoplasia of the prostate, not describing AMACR as a prognostic marker (28). A 4.8-year cohort (Rubin *et al*) has showed higher cancer recurrence when the patients had low expression of AMACR, suggesting that the higher expression of the gene could be linked to a better prognosis (29).

Our study has described the expression of DD3 and AMACR in patients submitted to RRP in Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The results showed that there was no difference in gene expression in the pathologic stages. According to this study, DD3 and AMACR cannot be used as prognostic markers.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all members of the Laboratory of Endocrine and Tumor Molecular Biology – Department of Physiology – UFRGS, and the researchers of Physiology Postgraduate Program. Without their fundamental help, the gene expression analysis could never be done. Our thanks to all the residents and staff of Surgical Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, who helped in prostate tissue collects.

FINANCING

This study was funded by:

FIPE – Funding for Incentive in Research and Events of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

CNPq – National Council of Technological and Scientific Development.

FAPERGS – Rio Grande do Sul Foundation for Research Support.

REFERENCES

1. National Cancer Institute – INCA (Brazil). Cancer Incidence in Brazil – 2008 Estimative. Brasília, Department of Health, 2008.
2. Nelen V. Epidemiology of prostate cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2007; 175:1-8.
3. Carter HB, Allaf ME, Partin AW. Diagnosis and Staging of Prostate Cancer. In: Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters, CA, Wein AJ, editors. *Campbell-Walsh Urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007 p. 2912-31.
4. Hochreiter WW. The issue of prostate cancer evaluation in men with elevated prostate-specific antigen and chronic prostatitis. *Andrologia* 2008; 40(2):130-3.
5. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family risk of prostate cancer. *Prostate* 1990; 17(4):337-47.
6. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(8):3367-71.
7. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, Henderson BE. 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 1992; 339(8798):887-9.
8. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):427-33.

9. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW *et al.* DD3, a Very Sensitive and Specific Marker to Detect Prostate Tumors. *Cancer Res* 2002; 62(9):2695-8.
10. Catalona WJ, Han M. Definitive Therapy for Localized Prostate Cancer – An Overview. In: Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters, CA, Wein AJ, editors. *Campbell-Walsh Urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007 p. 2932-46.
11. Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer. *Clin Chem*. 2008 Oct 16. [Epub ahead of print].
12. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B *et al.* DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003; 44(1):8-15; discussion 15-6.
13. Schalken JA, Hessels D, Vergaeh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology* 2003; 62(5 Suppl 1):34-43.
14. Gandini O, Luci L, Stigliano A, Lucera R, Di Silverio F, Toscano V, *et al.* Is DD3 a new prostate-specific gene? *Anticancer Res*. 2003; 23(1A):305-8.
15. Trojan L, Schaaf A, Steidler A, Haak M, Thalmann G, Knoll T, *et al.* Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2005; 25(1A): 183-91.

16. van Morselaar RJ, Voest EE. Angiogenesis in Prostate Cancer: Its Role in Disease Progression and Possible Therapeutic Approaches. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 197(1-2):239-50.
17. Murphy AJ, Hedges CS, Lannigan G, Sheils O, O'Leary J, Loftus B. Heterogeneous Expression of Alpha-methylacyl-CoA Racemase in Prostatic Cancer Correlates with Gleason Score. *Histopathology.* 2007; 50(2):243-51.
18. Adley BP, Yang XJ. Application of alpha-methylacyl coenzyme A racemase immunohistochemistry in the diagnosis of prostate cancer: a review. *Anal Quant Cytol Histol.* 2006; 28(1):1-13.
19. Zehentner BK, Secrist H, Zhang X, Hayes DC, Ostenson R, Goodman G, *et al.* Detection of alpha-methylacyl-coenzyme-A racemase transcripts in blood and urine samples of prostate cancer patients. *Mol Diagn Ther.* 2006; 10(6):397-403.
20. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrete TR, Sanda MG, *et al.* Alpha-methylacyl coenzima A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; 287(13):1662-70.
21. Amling CL, Blute ML, Berstralh EJ, Seay TM, Slezak J, Zincke H. Long-Therm Hazard of Progression after Prostatectomy for Clinically Localized Prostate Cancer: Continued Risk of Biochemical Failure after 5 Years. *J Urol,* 2000; 164(1):101-5.
22. Pettus JA, Weight CJ, Weight CJ, Thompson CJ, Middleton RG, Stephenson RA. Biochemical Failure in Men Following Radical Retropubic Prostatectomy: Impact of Surgical Margin Status and Location. *J Urol* 2004; 172(1):129-32.

23. Taskén KA, Angelsen A, Svindland A, Eide T, Berge V, Wahlquist R, Karlsen S. Markers for Diagnosis, Prediction and Prognosis of Prostate Cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2005; 125(23):3279-82.
24. Schenk-Braat EA, Bangma CH. The Search for Better Markers for Prostate Cancer than Prostate-Specific Antigen. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2006; 150(23):1286-90.
25. Tao ZH, Mao XL, Wang CH, Chen XD, Yu KY, Weng ZL, *et al.* Quantitative Detection of DD3 mRNA In Prostate Cancer Tissues By Real-Time Fluorescent Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Ahonghua Nan Ke Xue*, 2007; 13(2):130-3.
26. Bialkowska-Hobrzanska H, Driman DK, Fletcher R, Harry V, Razvi H. Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase, Survinin DD3 and PCGEM1 messenger RNA in Archival Prostate Carcinoma Tissue. *Can J Urol*, 2006; 13(1):2967-74.
27. Zielie PJ, Mobley JA, Ebb RG, Jiang Z, Blute RD, Ho SM. A Novel Diagnostic Test For Prostate Cancer Emerges From The Determination Of Alpha-Methylacyl-Coenzyme A In Prostatic Secretions. *J Urol*, 2004; 172(3):1130-3.
28. Stewart J, Fleshner N, Cole H, Toi A, Sweet J. Prognostic Significance of Alpha-methylacyl-coA Racemase Among Men With High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia In Prostate Biopsies. *J Urol* 2008; 179(5):1658-9.
29. Rubin MA, Bismar TA, Andrén O, Mucci L, Kim R, Shen R, *et al.* Decreased α -Methylacyl CoA Racemase Expression in Localized Prostate Cancer is Associated

with an Increased Rate of Biochemical Recurrence and Cancer-Specific Death.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14(6):1424-32.