

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas

**Avaliação de PCA3, TSP-1, AMARC e AR no câncer de
próstata**

Daniel Melecchi de Oliveira Freitas

Orientador: Prof. Dr. Walter Koff

Dissertação de Mestrado

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Melecchi de Olveira Freitas, Daniel

Avaliação de PCA3, TSP-1, AMARC e AR no câncer de próstata / Daniel Melecchi de Olveira Freitas. -- 2011.

54 f.

Orientador: Koff Walter.

Coorientador: Berger Milton.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. câncer de próstata. 2. marcadores moleculares. 3. PCA3. 4. racemase. 5. trombospondina. I. Walter, Koff, orient. II. Milton, Berger, coorient. III. Título.

À minha família (pais, irmãos, padrinhos)

À minha futura esposa

...forças que me movem

Índice

Introdução - justificativa	4
Revisão da Literatura	6
Bibliografia – revisão	16
Objetivos	25
Molecular Markers evaluation in prostate cancer - artigo em ingles	26
Avaliação de marcadores moleculares no câncer de próstata- artigo em português.	35
Anexos (figuras e tabelas)	44
Bibliografia	49
Agradecimentos	53
Financiamento	53

Introdução

A neoplasia maligna da próstata apresenta elevada incidência na população brasileira. Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Cancer), estima-se que serão diagnosticados aproximadamente cerca de 52.000 novos casos de câncer de próstata durante o ano de 2010 no Brasil. Nos Estados Unidos a incidência estimada para o ano de 2009 foi de mais de 192.000 novos casos (American cancer society 2009).

O câncer prostático é o segundo tumor mais prevalente na população, ficando atrás somente dos tumores de pele não-melanoma. O incremento de técnicas diagnósticas e de tratamento ao longo dos anos modificaram o perfil dos pacientes acometidos por esta doença. Há algumas décadas o diagnóstico do câncer de próstata era realizado em sua maioria quando a doença já se apresentava em estágio avançado.

No final da década de 80 e início da década de 90, com a aprovação do FDA para o uso do psa (antígeno prostático específico) no rastreamento do câncer de próstata associado ao exame de toque retal houve um aumento crescente no diagnóstico da doença. (1)

O antígeno prostático específico é uma proteína produzida pelas células prostáticas e que se apresenta elevado quando medido no sangue na presença de doenças da próstata. Como o nome indica é prostático específico e não câncer específico, podendo apresentar níveis elevados em casos de hiperplasia da próstata e prostatites.

Inicialmente foi estabelecido que níveis acima de 4.0 ng/ml de psa associados ou não a alterações no exame de toque retal indicariam a necessidade da realização de

biópsia prostática. Este exame seria realizado em pacientes acima dos 40 anos que apresentassem familiares em primeiro grau com história da doença e acima dos 45 anos para todos os homens. (2). Posteriormente várias dúvidas surgiram com relação a este nível de psa como ponto de corte para realização de biópsia da próstata. Um estudo com mais de 2000 pacientes demonstrou a presença de câncer de próstata em 26,9 % dos homens com psa entre 3.1 e 4.0 ng/ml e 17% dos homens com níveis de psa ente 1.1 e 2.0 ng/dl. (3) Os índices indicativos para a realização da biópsia ainda permanecem incertos, alguns estudo recentes sugerem a realização do procedimento quando o psa encontra-se acima de 2.5 ng/ml. (4)

Varias formas de estudo do psa foram realizadas desde o seu surgimento (densidade do psa, velocidade de duplicação, analise da relação psa total e livre), apesar de apresentarem algum incremento para o diagnóstico de câncer todas esbarraram no mesmo problema: a baixa especificidade do marcador.

Com o advento do psa e o aumento crescente no numero de diagnostico surgiram duvidas com relação a real morbidade e mortalidade da doença. O rastreamento de indivíduos assintomáticos ainda é controverso. Sabe-se que a neoplasia maligna da próstata apresenta comportamento variado, baseado principalmente no seu estadiamento clínico e classificação anatomopatológica (classificação de Gleason). Um estudo recente demonstrou que a utilização do psa como ferramenta diagnóstica reduziu a mortalidade em cerca de 20 % dos doentes, entretanto pontuou também um número aumentado de diagnósticos sem relevância clinica. (5) Outro estudo falhou em demonstrar diferenças de índices de mortalidade entre grupos que fizeram rastreamento ou não para câncer de próstata utilizando psa e toque real. (6)

Atualmente, ainda há a busca constante por marcadores moleculares específicos do câncer de próstata. A morbidade do exame de biópsia da próstata e dos tratamentos do câncer da próstata (principalmente radioterapia e prostatectomia radical) torna necessário o estabelecimento de métodos mais eficazes não somente para o diagnóstico da neoplasia maligna da próstata, mas também para a seleção mais acurada dos tumores que realmente apresentam relevância clínica, ou seja, que podem levar a morte do paciente.

Revisão da Literatura

Avanço tecnológico tem proporcionado aos pesquisadores a possibilidade de identificar marcadores moleculares que possam auxiliar na identificação precisa do câncer de próstata. Avaliaremos os marcadores que atualmente vem sendo estudados como sucessores potenciais do psa no rastreamento e diagnóstico do câncer de próstata

PCA3 (DD3)

Dd3- diferencial display code 3 (método para identificação de genes que expressam de maneira diferenciada) foi mapeado no cromossoma 9 e seus padrões de poliadenilacao sugerem a presença de um RNA não-codificador. Foi primeiramente descrito por Bussemakers et al em 1999, após encontrar um aumento expressivo do cDNA DD3 em 53 de 56 amostras de câncer de próstata, não sendo encontrada a presença do marcador nos 18 controles com próstata normal. (7)

A avaliação através do PCR- RT também comprovou a ausência do DD3 em tecidos humanos normais, como mama, intestino, bexiga e musculoesquelético e em tecido tumoral, como neoplasia de ovário, testículo e colo uterino (8).

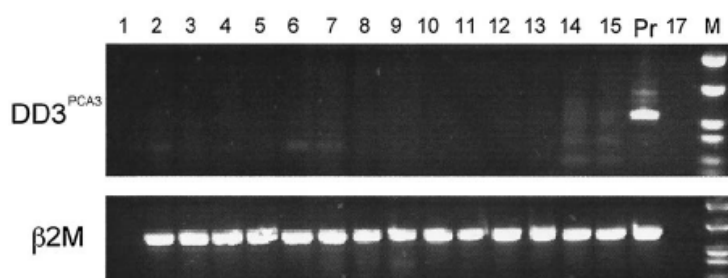


FIGURE 2. *Differential display code 3 (DD3^{PCA3}), which is highly expressed in prostate cancer tissue (Pr), was not expressed in tumor samples from breast, cervix, ovary, endometrium, and testis cells. β2M = serum β2 microglobulin; M = metastasis.*

(8)

Alguns autores sugerem que apesar da grande expressão deste gene nos casos de câncer de próstata não foi evidenciada a presença de produtos protéicos no citoplasma destas células como resultado da transcrição do RNA DD3, concluindo que a função do gene é incerta. (8)

Em comparação ao tecido hiperplásico de próstata foi demonstrado em um estudo realizado no México uma expressão gênica 29,74 vezes maior nos casos de câncer quando comparados aos de hiperplasia (9) sendo sua presença, em outro estudo, determinada com uma concentração 66 vezes maior quando analisado por real time na comparação com controles (10)

Após a constatação da alta especificidade do PCA3 no tecido prostático este marcador começou a ser avaliado de maneira mais extensiva. Em amostras de urina de pacientes submetidos à biópsia da próstata, Hessels e cols demonstraram valor preditivo negativo de 90 %, sensibilidade de 67% e especificidade de 83 % em pacientes com diagnóstico de câncer (11). Estes resultados forma similares aos encontrados em liquido prostático que demonstraram sensibilidade de 65 %, especificidade de 82% e valor preditivo negativo de 82% (12).

Baseado nestes achados tem sido postulado que o PCA3 possa vir a ser um instrumento promissor na predição de resultados de biopsias assim como no diagnóstico do câncer de próstata em substituição ao PSA (13,14). Entretanto, recentemente, foi constatada a ausência de relação entre os valores de PCA3 em pacientes com a primeira biopsia próstata negativa com posterior diagnóstico de câncer de próstata dos que não apresentaram a doença. (15)

Foi demonstrado que os valores de PCA3 podem aumentar nos casos de câncer de próstata de acordo com o grau de indiferenciação do tumor presentes nos escores de Gleason (16). Também houve correlação do aumento do valor médio do PCA3 nos casos de câncer de próstata submetidos à prostatectomia radical e que apresentaram extensão extra capsular na avaliação anatomopatológica. (17).

Devido o aumento da especificidade do DD3 com relação ao câncer de próstata tem sido especulada a possibilidade de o mesmo vir a ser alvo de terapia gênica nos casos de neoplasia refratária às formas convencionais de tratamento. (18)

AMARC

A alfa-metil-coenzima A racemase (AMACR), conhecida como a proteína codificada pelo gene P504S, é composta por 382 aminoácidos. Apresenta importante papel na beta-oxidação e biossíntese de ácidos graxos de cadeia ramificada e outros derivados. (19)

Um estudo avaliou a presença da racemase em 539 amostras de tecido tumoral e 222 amostras de tecido humano normal. No tecido normal foi encontrada uma expressão maior do RNAm da racemase no fígado, rim e glândula salivar, já nos tumores malignos na próstata fígado e rim. A prevalência maior foi detectada nos adenocarcinomas de próstata, cerca de 94% (20)

Recentemente, foi confirmado que a AMACR tem sua expressão aumentada em células neoplásicas de próstata e sendo a mesma um potencial marcador molecular no diagnóstico e avaliação prognóstica no carcinoma da próstata. Vários estudos demonstraram presença marcante da racemase com índices de sensibilidade que variaram de 71-100% em avaliação imunohistoquímica do adenocarcinoma de próstata. (21-29).

Utilizando a técnica de real time PCR, também foi confirmada maior presença da AMACR na neoplasia maligna da próstata em comparação aos casos de hiperplasia da próstata. (30) Recentemente tem sido estudada a viabilidade de avaliação deste marcador na urina de pacientes para diagnóstico de câncer de próstata. Rogers et al avaliaram a presença da racemase na urina de 26 pacientes com suspeita de cancer de próstata após a realização de biópsia de próstata, apresentando uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 58%. A avaliação da racemase na urina após massagem prostática também foi avaliada em um estudo que demonstrou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 70% (31-33)

O estudo de espécimes de biópsias de próstata através de imunohistoquímica demonstrou alta correlação com tumores de próstata independente do escore de Gleason (34-35), enquanto em avaliação por imunocitoquímica ocorreu uma correlação inversa entre o grau de coloração e o escore gleason, sendo que a coloração mais forte foi encontrada nos tumores de baixo grau e nas atípias (36)

Recentemente tem sido avaliada a possibilidade de utilização da racemase como alvo de imunoterapia baseada em linfócitos T citotóxicos no tratamento da neoplasia avançada (37)

Um estudo *in vitro* sugeriu que a inibição da AMARC pode induzir um aumento da expressão do AR e conversão e células de câncer de próstata hormônio-refratárias em células hormônio dependentes, o que pode determinar um importante avanço no tratamento do adenocarcinoma de próstata. (38)

Também tem sido estudada a possibilidade de correlação do gene da AMARC com os tumores malignos de próstata hereditários, visto haver ligação destes com a região 5p13, mesma região de codificação da racemase (39)

TSP-1

A TSP-1 (trombospondina) é uma glicoproteína de alto peso molecular secretada por diversos tipos de células incluindo células endoteliais, epiteliais, fibroblastos e células de músculo liso. Pode interagir com receptores de superfície, citocinas, fatores de crescimento e proteases. (40)

É um potente inibidor da angiogênese tumoral, sendo importante no controle do crescimento das neoplasias malignas. (41). Foi a primeira proteína a demonstrar a supressão da microangiogênese tumoral *in vivo*. (42)

A regulação da expressão da TSP parece estar relacionadas com diversas vias que incluem o P53 e PTEN, genes supressores de tumor, sendo que a inativação destes genes parece estar relacionada com uma diminuição da expressão da TSP-1 e um aumento no fenótipo angiogênico do tumor (43-44)

O papel da trombospondina na inibição da angiogênese envolve provavelmente vários mecanismos sendo um destes a inibição da matriz de metaloproteinase-9 que promove a migração e a sobrevivência dos fibroblastos. A TSP-1 ao ligar-se aos receptores

de superfície C36 de células endoteliais induz a sua apoptose através da P59, caspase 3 e a P38 proteína-quinase mitógeno-ativada. (45)

Alguns estudos demonstraram diminuição ou até a ausência da expressão deste marcador nos casos de tumor de próstata, estando o mesmo presente nos casos de hiperplasia prostática e PIN (neoplasia intra-epitelial prostática) (41). Foram avaliadas as combinações de polimorfismos TSP-1 com outros genes como o MMP9, sendo demonstrado risco 2,8 vezes maior de desenvolver câncer de próstata nos pacientes portadores da combinação destes marcadores e de 6 vezes quando associado ao VEGF(9). (46)

Há também a correlação dos níveis de androgênios e a TSP-1 (47). Tumores malignos de próstata de baixo grau têm uma tendência a apresentar uma maior expressão da TSP-1 nos ductos das células epiteliais. (48) Foi demonstrado que a castração de ratos portadores de neoplasia maligna da próstata induz a produção de TSP-1 pelo epitélio prostático, enquanto a reposição de andrógenos diminui a sua produção. Em humanos a privação de andrógenos diminui a expressão de fator de crescimento vascular endotelial e aumenta a expressão de TSP-1 em carcinoma de próstata humano (47). Ratos com câncer de próstata apresentaram indução de expressão de TSP-1 nos tumores quando tratados com ciclofosfamida e paclitaxel (49)

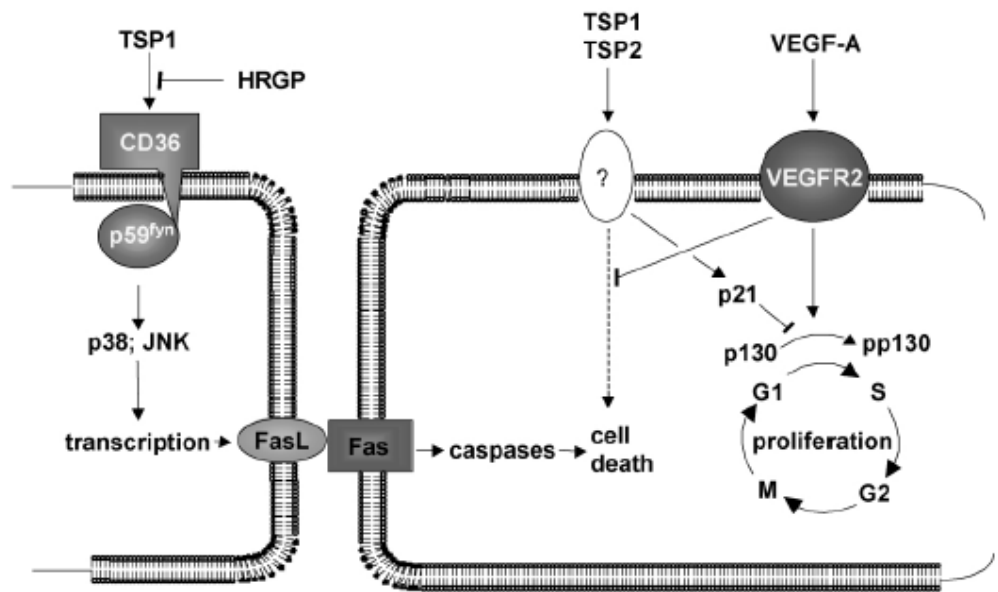


Fig. 1. Mechanisms of the inhibitory action of TSPs on ECs. From left to right: (1) The GVITRIR sequence in the type I repeats of TSP binds to CD36 to activate the src-family kinase, p59^{fyn}. Binding of histidine-rich glycoprotein (HRGP) to TSP1 inhibits binding to CD36. Kinases p38 and JNK are rapidly phosphorylated after engagement of CD36 by TSP1, and these kinases in turn stimulate transcription and cell-surface expression of FasL; (2) Oligomerization of Fas by FasL causes Fas to activate caspases and apoptosis; (3) VEGF-A binds to its primary receptor VEGF-R2, and stimulates cell cycle progression, in part by increasing phosphorylation of the Rb family member, p130. VEGF-A also inhibits a minor death-promoting activity of TSPs. Binding of TSP1 and TSP2 to an as-yet-uncharacterized receptor increases p21 levels, which inhibit the cell cycle promoting activity of VEGF, in part by inhibiting the phosphorylation of p130.

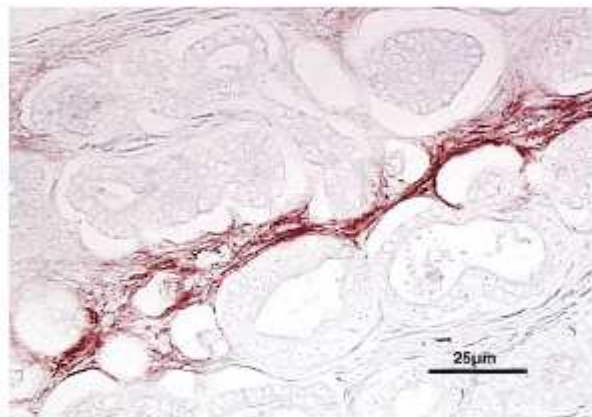


FIGURE 1. Photomicrograph of a radical prostatectomy specimen demonstrating TSP expression in the extracellular matrix surrounding a prostate cancer.

(40)

AR

Embora os andrógenos não estejam relacionados diretamente com a carcinogênese o gene do AR apresenta polimorfismos que podem estar relacionados na

iniciação e progressão do câncer de próstata. O comprimento da repetição polimórfica do trinucleotídeo CAG, localizado no exon 1, é inversamente proporcional a atividade transcricional do gene AR, sendo que repetições curtas apresentam risco relativo 1,5 a 2 vezes maior para o desenvolvimento de câncer de próstata quando comparado aos pacientes que apresentam repetições longas (50-52).

O AR apresenta função como regulador primário da produção de psa através da indução do seu promotor.(53)

A testosterona é sintetizada em sua grande maioria pelos testículos sendo transportada até os tecidos-alvo, onde ocorre a sua conversão no seu metabólito ativo DHT (di-hidro-testosterona) através da atuação da enzima 5-alfa-redutase. Tanto a testosterona quanto a DHT exercem sua atividade biológica após ligação aos AR realizando sua ativação transcricional (54)

Cerca de 80-90 % dos tumores de próstata são dependentes de andrógenos no momento do seu diagnóstico. O tratamento do câncer prostático refratário a terapia curativa baseia-se na redução da produção de andrógenos através da castração cirúrgica ou química que ocasiona modulação da atividade do AR e a administração de antiandrogenos que bloqueiam a atividade dos AR. (55).

Um estudo recente demonstrou que a expressão alta de AR está correlacionada com baixa sobrevida livre de recorrência e progressão da doença, apesar de alguns estudos demonstrarem correlação diretamente proporcional da expressão dos receptores e grau de diferenciação dos tumores de próstata. (56,57)

Isto corrobora o achado de que os pacientes com câncer de próstata apresentam resposta limitada ao tratamento de privação hormonal, cerca de 12-18 meses, são os chamados tumores hormônio-refratários. Apesar disso, mesmo com a ausência de

resposta ao bloqueio dos andrógenos os AR ainda podem permanecer presentes no tecido maligno prostático (58)

Os genes dos receptores de androgênio podem apresentar um mecanismo denominado amplificação, no qual se tornam sensíveis a níveis reduzidos de andrógenos após o bloqueio estando presente em cerca de 20-30% dos adenocarcinomas de próstata hormônio-refratários. (59). Apesar disso outros estudos realizados com técnicas quantitativas de RT-PCR não demonstraram aumento dos níveis de RNAm nos casos de amplificação dos AR (60)

Os ARs também podem ter sua atividade transcricional aumentada por coativadores que podem contribuir para carcinogênese e progressão da doença. Dentre os estudados recentemente temos a família dos SRCs e o coativador ARA 70. (61,62)

O envolvimento do AR na iniciação e progressão do câncer de próstata torna-o de fundamental importância para o estudo de novos tratamentos e diagnóstico de neoplasias refratária ao tratamento convencional.

EPCA2

O EPCA2 (early prostate cancer antigen) é um dos componentes protéicos que fazem parte da membrana nuclear das células de câncer de próstata. Foi primeiramente descrito por Lemann et al em 2007 em um trabalho que avaliou o nível sérico da proteína, o epítipo EPCA2.22, através do método ELISA (usando ponto de corte de 30 ng/ml) em 385 pacientes obtendo uma sensibilidade de 94% e especificidade de 92 % para diagnóstico de casos de câncer de próstata em comparação ao PSA que apresentou especificidade de 65% para a mesma população. Além disso também apresentou maior acurácia na diferenciação de doença confinada ou não-confinada a próstata. (63)

Os mesmos autores avaliaram em estudo piloto a sensibilidade diagnóstica do câncer de próstata com valores acima de 0,5ng/ml do epítipo EPCA2.19 encontrando uma sensibilidade de 91% e especificidade de 94%(64).

PTEN

O PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), é uma proteína constituída por 403 aminoácidos, foi descoberto em 1997 após sua ausência ter sido encontrado em vários tipos de neoplasias malignas, incluindo o câncer de próstata. É um gene localizado no cromossoma 10 e que codifica fosfatases ativas contra substratos protéicos e lipídicos. Tem sido considerado como gene supressor na carcinogênese nos casos de câncer de próstata (65).

PTEN está presente nas células epiteliais normais sendo encontrado em níveis reduzidos nas células de câncer de próstata. (66) É encontrado tanto na membrana plasmática como no núcleo celular (67)

É considerado um regulador das vias de transdução responsáveis pela sobrevivência, ciclo celular e transformação neoplásica. (68).

A redução dos níveis de PTEN apresentou correlação com a progressão do carcinoma de próstata. (69), resistência ao tratamento com quimioterápicos e radioterapia (70 -71) e recorrência apos tratamento cirúrgico. (72). A mutação do gene foi encontrada em 5-27 % das neoplasias localizadas e 30-60% dos tumores metastáticos. (73)

Bibliografia

1. Constantinou J, Feneley MR. PSA testing: an evolving relationship with prostate cancer screening. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2006;9(1):6-13. Review
2. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL Jr, Beard JH, Pond HS, Terry WJ, Igel TC, Kidd DD. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol.* 1990 Jun;143(6):1146-52.
3. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med.* 2004 May 27;350(22):2239-46
4. Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK. Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA.* 1997 May 14;277(18):1452-5.
5. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Berenguer A, Määtänen L, Bangma CH, Aus G, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Blijenberg BG, Moss SM, de Koning HJ, Auvinen A; ERSPC Investigators. [Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study.](#) *N Engl J Med.* 2009 Mar 26;360(13):1320-8. Epub 2009 Mar 18
6. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, Fouad MN, Gelmann EP, Kvale PA, Reding DJ, Weissfeld JL, Yokochi LA, O'Brien B, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hayes RB, Kramer BS, Izmirlian G, Miller AB, Pinsky PF, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD; PLCO Project

- Team. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*. 2009 Mar 26;360(13):1310-9. Epub 2009 Mar 18.
7. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999 Dec 1;59(23):5975-9.
 8. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology*. 2003 Nov;62(5 Suppl 1):34-43. Review.
 9. Floriano-Sánchez E, Cárdenas-Rodríguez N, Castro-Marín M, Alvarez-Grave P, Lara-Padilla E. DD3(PCA3) gene expression in cancer and prostatic hyperplasia. *Clin Invest Med*. ;32(6):E258.
 10. De Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, Swinkels DW, Schalken JA. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors.. *Cancer Res*. 2002 May 1;62(9):2695-8.
 11. Hessels D e cols. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. [Eur Urol](#). 2003 Jul;44(1):8-15; discussion 15-6.
 12. Van Gils MP, Cornel EB, Hessels D, Peelen WP, Witjes JA, Mulders PF, Rittenhouse HG, Schalken JA. Molecular PCA3 diagnostics on prostatic fluid. *Prostate*. 2007 Jun 1;67(8):881-7.
 13. Schalken JA, Hessels D, Vergaeh G. [Urology](#). 2003 Nov;62(5 Suppl 1):34-43. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene.
 14. Gandini O e cols. Is DD3 a new prostate-specific gene? [Anticancer Res](#). 2003 Jan-Feb;23(1A):305-8.

15. Tosoian JJ, Loeb S, Kettermann A, Landis P, Elliot DJ, Epstein JI, Partin AW, Carter HB, Sokoll LJ. Accuracy of PCA3 measurement in predicting short-term biopsy progression in an active surveillance program. *J Urol*. 2010 Feb;183(2):534-8. Epub 2009 Dec 14.
16. Deras IL, Aubin SM, Blase A, Day JR, Koo S, Partin AW, Ellis WJ, Marks LS, Fradet Y, Rittenhouse H, Groskopf J. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome.. *J Urol*. 2008 Apr;179(4):1587-92. Epub 2008 Mar 4
17. Whitman EJ, Groskopf J, Ali A, Chen Y, Blase A, Furusato B, Petrovics G, Ibrahim M, Elsamanoudi S, Cullen J, Sesterhenn IA, Brassell S, Rittenhouse H, Srivastava S, McLeod DG. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume.. *J Urol*. 2008 Nov;180(5):1975-8; discussion 1978-9. Epub 2008 Sep 17
18. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology*. 2003 Nov;62(5 Suppl 1):34-43.
19. Rubin MA e cols. Alpha-methylacyl coenzima A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; 287: 1662-70.
20. Iwasa Y e cols. Establishment and characterization of androgen-independent human prostate cancer cell lines, LN-REC4 and LNCaP-SF, from LNCaP. [Int J Urol](#). 2007 Mar;14(3):233-9.
21. Jiang Z, Woda BA, Rock KL, Xu Y, Savas L, Khan A et al. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2001;25(11):1397-1404.
22. Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Xu Y, Savas L, Khan A et al. P504S/alpha-

- methylacyl-CoA racemase: a useful marker for diagnosis of small foci of prostatic carcinoma on needle biopsy. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(9):1169-1174.
23. Beach R, Gown AM, De Peralta-Venturina MN, Folpe AL, Yaziji H, Salles PG et al. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(12):1588-1596.
 24. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG et al. Alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *Jama.* 2002;287(13):1662-1670.
 25. Magi-Galluzzi C, Luo J, Isaacs WB, Hicks JL, de Marzo AM, Epstein JI. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(8):1128-1133.
 26. Kunju LP, Rubin MA, Chinnaiyan AM, Shah RB. Diagnostic usefulness of monoclonal antibody P504S in the workup of atypical prostatic glandular proliferations. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(5):737-745.
 27. Zhou M, Jiang Z, Epstein JI. Expression and diagnostic utility of alpha-methylacyl-CoA-racemase (P504S) in foamy gland and pseudohyperplastic prostate cancer. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(6):772-778.
 28. Zhou M, Aydin H, Kanane H, Epstein JI. How often does alpha-methylacyl-CoA-racemase contribute to resolving an atypical diagnosis on prostate needle biopsy beyond that provided by basal cell markers?. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(2):239-243.
 29. Jiang Z, Iczkowski KA, Woda BA, Tretiakova M, Yang XJ. P504S immunostaining boosts diagnostic resolution of "suspicious" foci in prostatic

- needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 2004;121(1):99-107.
30. Schostak M, Miller K, Krause H, et al. Kinetic fluorescence reverse transcriptase-polymerase chain reaction for alpha-methylacyl Coa racemase distinguishes prostate cancer from benign lesions. *Cancer Detect Prev.* 2006; 30(5): 449-54.
 31. Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, Lonigro RJ, Tsodikov A, Wei JT, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 Feb 1;68(3):645-9.
 32. Rogers CG, Yan G, Zha S, Gonzalgo ML, Isaacs WB, Luo J, De Marzo AM, Nelson WG, Pavlovich CP. Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme a racemase protein. *J Urol.* 2004 Oct;172(4 Pt 1):1501-3.
 33. 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 racemase in prostatic secretions. *J Urol.* 2004 Sep;172(3):1130-3.
 34. 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 Feb;28(1):1-13.
 35. ZEHENTNER BK e cols. 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.
 36. Gordana Kaic. Alpha metyl- coa racemase in fine nedlle aspiration of prostate lesions. *Diagn Cythpatolgy*, 37 (11) 2009.
 37. Homma I. Abberant expression and potency as a cancer immunotherapy. *Journal of translacional medicine* 2009, 7: 103.

38. Takahara K. Conversion of prostate cancer from hormone dependency AMARC. *Anticancer Res* 2009 Jul 29(7): 2497-505.
39. Camp NJ. Genomic search for prostate cancer predisposition loci. *Prostate* 2005; 65(4):365.
40. Armstrong LC, Bornstein P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol.* 2003 Mar;22(1):63-71. Review
41. VALBO C, DAMBER JE. Thrombospondins, metallo proteases and thrombospondin receptors messenger RNA and protein expression in different tumour sublines of the Dunning prostate cancer model. [Acta Oncol.](#) 2005;44(3):293-8.
42. . Good DJ. A tumor suppressor- dependent inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1990.87(17):6624.
43. Giri D, Ittmann M. Inactivation of PTEN tumor suppressor gene is associated with increased angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma. *Hum Pathol* 30:419-424, 1999.
44. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by P53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265:1582-1584, 1994.
45. Hua J. Inhibition of 9 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 1996, 56: 5279
46. Sfar Sana. Combined effects of angiogenic genes. *Mol Biol Rep.* 2009, 36:37
47. SFAAR S e cols. TSP1 and MMP9 genetic variants in sporadic prostate cancer.

[Cancer Genet Cytogenet.](#) 2007 Jan 1;172(1):38-44.

48. Colombel M, Filleur S, Fournier P et al. Androgens repress the expression of angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 normal and neoplastic prostate. *Cancer Reser.* 2005; 65: 300-308\
49. Damber JE, Vallbo C, Albertsson P, Lennernäs B, Norrby K. The anti-tumour effect of low-dose continuous chemotherapy may partly be mediated by thrombospondin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006 Sep;58(3):354-60. Epub 2005 Dec 7
50. . Wieacker PF, Knobe I. Clinical and molecular aspects of androgen receptor defects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998; 106:446.
51. Knobe I, Allera A. Significance of the CAG repeat length in the androgen receptor gene. *Hum Genet* 1999; 104:257.
52. Giovannucci E. The CAG repeat with the androgen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3320
53. Cleutjens KBJM. An androgen response element. *Mol Endocrinol* 1997, 11: 148.
54. Heilein C, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrinbe Reviews* 2004. 25(2) 276-308.
55. . Denis LJ, Griffiths K 2000. Endocrine treatment in prostate cancer *Sem Surg Oncol* 18:52-74.
56. Lee D. High Androgen receptor levels predictive of decrease survival in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2:13-14.

57. Lee DK, Chang C. Endocrine mechanisms of disease: expression and degradation of androgen receptor. *J Clin Endocr Metab* 2003. 88:4043
58. De Winter JAR, Janssen. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory. 1994. *Am J Pathol* 144:735-746.
59. Bubendorf L. Survey of gene amplifications during prostate cancer. 1999. *Cancer Res* 59:803.
60. Linja MJ. Amplification and overexpression of androgen receptor gene. *Cancer Res* 2001, 61: 3550-3555.
61. McKenna .Nuclear receptor coregulation. *Endocr Rev.* 1999 20:321.
62. Yeh S, Chang C. Cloning and characterization of a specific coactivator 1996. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5517.
63. Leman ES, Cannon GW, Trock BJ, Sokoll LJ, Chan DW, Mangold L, Partin AW, Getzenberg RH. EPCA-2: a highly specific serum marker for prostate cancer. *Urology.* 2007 Apr;69(4):714-20.
64. Leman ES, Magheli A, Cannon GW, Mangold L, Partin AW, Getzenberg RH. Analysis of a serum test for prostate cancer that detects a second epitope of EPCA-2. *Prostate.* 2009 Aug 1;69(11):1188-94.
65. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer.. *Science.* 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.

66. McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4291-6.
67. Uzoh CC, Perks CM, Bahl A, Holly JM, Sugiono M, Persad RA. PTEN-mediated pathways and their association with treatment-resistant prostate cancer. *BJU Int.* 2009 Aug;104(4):556-61. Epub 2009 Feb 13. Review.
68. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 2003 Mar;17(3):590-603. Review.
69. McCall P, Witton CJ, Grimsley S, Nielsen KV, Edwards J. Is PTEN loss associated with clinical outcome measures in human prostate cancer?. *Br J Cancer.* 2008 Oct 21;99(8):1296-301.
70. Huang H, Chevillat JC, Pan Y et al. PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression. *J Biol Chem* 2001, 276:38830-6.
71. Anai S, Goodison S, Shiverck K et al. Combination of PTEN gene therapy and radiation inhibits the growth of human prostate cancer xenografts. *Hum Gene Ther* 2006; 17:975-84.
72. Bedolla R, Prihoda TJ, Kreisberg JI et al. Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. *Clin Cancer Res* 2007; 13:3860-7.
73. Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene.* 1998 Apr 2;16(13):1743-8.

Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é avaliar a expressão gênica e protéica de PCA3, TSP-1, AMACR e AR em pacientes com câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.

PCA3, TSP-1, AMARC and AR evaluation in prostate cancer

Freitas DMO¹, Koff WJ², Berger M³, Biolchi V⁴, Neto BS⁵, Quintanilha M⁴, Silva ISB⁶

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

1- MD, Urologist, Researcher of Surgery Postgraduate Program – UFRGS; 2- HCPA, Professor of Medicine – Postgraduate Program, 3- MD, PhD, Urologist, Chief of Division of Urology - HCPA, Professor of Medicine; 4- Members of Physiology Postgraduate Program, 5- MD, PhD, Urologist, Adjunct Professor of Medicine - UFRGS.; 6-Associate Professor – Division of Physiology – UFRGS, LaGON Researcher – HCPA.

Abstract

Objectives

Compare four different molecular markers (PCA3, TSP-1, AMARC and AR) concentrations in human prostate cancer tissue and prostate hyperplastic tissue.

Patients and methods

Cross-sectional study. Prostate cancer and benign hiperplastic tissue samples of 68 patients who underwent surgical treatment in Hospital de Clinicas de Porto Alegre were analyzed. Molecular markers concentration was compared indirectly in the samples by reverser transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique.

Results

A higher concentration of PCA3, TSP-1 and AR was found in prostate cancer tissue when compared to hiperplastic prostate tissue. However, there was no statistical difference in racemase levels between the groups. When divided in two groups, low grade cancer and intermediate-high grade cancer there were no difference in markers concentration between the groups. Hazard ratio was greater for PCA3 and psa to diagnosis fo prostate cancer.

Conclusion

TSP-1 seems to be not a good molecular marker for prostate cancer. PCA3 and AR are presented in higher concentrations in malignat prostate tissue. There was no difference

between molecular markers concentration and tumor grade. Psa is still the best marker for prostate cancer. Building a nomogram combining various molecular markers may improve the prediction value of these tests on the diagnosis of prostate cancer.

Key- words

Prostate cancer, molecular marker, PCA3, racemase, thrombospodin, androgen receptor

PCA3, TSP-2, AMARC and AR evaluation in prostate cancer

Freitas DMO, Koff WJ, Berger M, Biolchi V, Neto BS, Quintanilha M, Silva ISB

Introduction

Prostate cancer is the second leading cause of cancer mortality. The incidence of prostate cancer in Brazil is expected to be around 52.000 in 2010 ¹. Early diagnosis improves treatment success. Prostate cancer screening with PSA and digital rectal exam (DRE) increased the number of prostate needle core biopsies ². Curative treatment is based on radical prostatectomy or (external beam) radiotherapy, and palliative treatment, androgen suppression. Patients diagnosed with clinically localized prostate cancer and those presenting with advanced metastatic disease present 100 % and less than 50% 5-year survival rates, respectively ³.

Several new molecular markers have been studied in attempt to increase specificity for prostate cancer diagnosis.

PCA3, also called DD3, first described by Bussemakers et al in 1999 has been found , by PCR-RT analysis, in normal and tumoral human tissues and in urine samples ^{4,5}. TSP1 is a powerful tumoral angiogen inhibitor that has been studied in cancer growth. Some studies showed low concentration of this marker in cancer tissues ⁶. AMARC, it's a protein coded by P450S gene, and have a high expression in prostate cancer cells ⁷⁻¹⁵. The androgen receptor (AR) is a steroid-hormone binding protein, encoded by the AR gene where the androgen acts. It has been related to progression and recurrent prostate cancer ¹⁶⁻¹⁷. Down-regulation of AR expression could potentially be

considered the main strategy for palliative treatment of androgen-dependent prostate cancer¹⁸.

Materials and methods

Samples (1-2 cc) of 68 radical prostatectomy specimens and 38 simple prostatectomy/ transurethral prostatic resection were analyzed. Samples were obtained right after surgery and stored in nitrogen solution until analysis. Specimen's diagnoses were confirmed by histopathological analysis.

Gene expression was evaluated indirectly by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Tissue's total RNA was extracted with Trizol® reagent (Trizol Reagent 100 mL®, Invitrogen) according to manufacturer's protocol and then spectrophotometrically quantified. RNA was used as template for cDNA synthesis using the First Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen). Each RNA sample was denatured at 65°C for 5 min (PTC-100®, MJ Research, Inc.) with 1 µL de dNTPmix (SuperScript® First-Strand, Invitrogen) and 1 µL de OligodT (SuperScript® First-Strand, Invitrogen). Two µL of 10XPCRBuffer (SuperScript® First-Strand, Invitrogen), 4 µL de 25mM MgCl₂ (SuperScript® First-Strand, Invitrogen), 2 µL de 0,1M DTT (SuperScript® First-Strand, Invitrogen) and 1 µL de RnaseOUT(SuperScript® First-Strand, Invitrogen) were then added to each sample. RNA samples were heated for 2 min in 42°C (PTC-100®, MJ Research, Inc.) followed by 1 ul of reverse transcription enzyme, SuperscriptIIRT (SuperScript® First-Strand®, Invitrogen) for 50 min at 42°C. For preparation of calibration, curve RT-PCR reactions were made with cDNA normal tissue copies. Expression of the markers of interest was normalized against b2-microglobulin gene for each replicate tissue sample. Gene transcripts were quantitatively determined in the samples, using time-resolved

fluorescent-based quantitative RT-PCR with Sybr Green I (Platinum SyberGreenqPCRSupermix UDG®, Invitrogen). For PCR amplification, the following specific primers were used: dd3 (sequence 5'-3', sense CTG TCA TCG TCC CCA TCT CT, anti AGT CGT GGA AGC AAA GGC TA); TSP1 (sequence 5'-3', sense GAG AAC AGA GCC CCA CAG AG, anti CCC AAA ATA TCC TGG GAG GT); AMARC (sequence 5'-3', sense TGG CTT TGT CAG GTG TTC; anti TAT GCT GTT CCT TCC ACC ATA T); AR (sequence 5'-3' AR3 GCA TGG TGA GCA GAG TGC CCT ATC; AR5 TCC CAG AGT CAT CCC TGC TTC AT).

Mann-Whitney nonparametric test was used to compare groups. Logistic regression models were used to produce data for receiver operating characteristic (ROC) curves. The chi-square test was used to test associations between molecular markers and cancer diagnosis. All tests were performed at the 5% significance level using SPSS v.17 software.

Results

The two groups were compared for age and PSA level (table 1). There were no statistical differences between the groups for age. PSA mean level varied between 4,51-4,80 in hyperplasia group and 7,42- 10,42 in cancer group when measured among molecular markers groups that were studied. There were statistical differences between hyperplasia and cancer groups for PSA level in all groups. Table 1 also describes Gleason score and TNM classification in the cancer group. Gleason 6 (3+3) was the most prevalent score found in 26 patients (40,62%), followed by Gleason 7 (3+4) score in 17 patients (26,56%). TNM T2C was the most common pathological finding, presented in 19 patients (29,69%) followed by T3a, in 17 patients (26,56%). After

surgery 25 patients (39%) were diagnosed with locally advanced disease and 39 patients (61%) were diagnosed with disease restricted to the prostate.

We analyzed the expression of PCA3, AMARC, AR and TSP-1 in 30, 27, 58 and 25 prostate cancer tissue samples respectively and 24, 24,36 and 23 hyperlastic prostate tissue samples, respectively. A higher concentration of PCA3, TSP-1 and AR was found in prostate cancer tissue (table 2, figure 1, 3-4). However there was no statistical difference between the groups for AMARC (table2, figure 2).

When analyzing the frequency in distribution after ROC curve, PCA $>0,306$ was found in 76% , TSP-1 $>1,04$ in 70,8% and AR $>0,327$ in 71,9% in cancer group, all with significance. (table 4). PSA $>4,25$ was found in 82,6% in malignant prostatic tissues, $p < 0,001$. AMARC didn't showed significance. Logistic regression analysis found a Hazard ratio (HR) was 10,20 for $psa > 4,25$ and 4,65 when $PCA3 > 0,306$.(table 5).

Discussion

In the new era of prostate cancer investigation, a lot of discussion has been done based on the necessity of a specific diagnostic method for prostate cancer before biopsy. Recently, some studies have argued about the prostate cancer overdiagnosing and overtreatment. Vickers et al suggested that repeat screening can be confined to the 25% or so of men whose PSA level is above 2 ng/ml at age 60 ¹⁹. A high number of patients that were submitted to cancer treatment probably would not have a true benefit with this treatment.

In the past10 years, new molecular markers have been studied, basically trying to improve the diagnosis specificity in attempt to avoid unnecessary prostate biopsies.

Recent meta-analysis compared dd3 and prostate biopsy for cancer diagnosis. The sensitivity was between 46,9- 82,3% and specificity 59,4-97,4% in urine samples,

Our study showed a higher prevalence of this marker in prostate cancer tissue when compared to hyperplastic tissue ($p < 0,05$). Median up-regulation of PCA3 from hyperplastic to tumor tissue was 2- fold. High prevalence of Gleason 6 tumors could explain this low increase in marker concentration, since some studies show a linear correlation between high grade tumors and PCA3 concentration ²⁰.

Also angiogenic factors have been studied as a prognostic indicator and therapeutic alternative to stratify indolent or aggressive tumors. As a tumoral angiogenic inhibitor it was expected a lower thrombospondin concentration in this group as was found in other studies. In Immunohistochemical staining in prostatic tissue, some studies, also showed elevated TSP-1 concentration in BPD and in prostate cancer patients ⁶. Its not clear until now why TSP-1 is down regulated in prostate cancer tissue, but p53 and PTEN mutation may be involved ²². Colombel et al found that low-grade prostatic tumor has a tendency to present a higher TSP-1 concentration than the high grade tumor ²³. In our results, cancer group presented a high concentration TSP1 when compared to hyperplasia with statistical significance. Also, 40,62% of prostate cancer tissues samples were gleason 6 (3+3), considered a low-grade tumor. This could explain a high TSP-1 concentration in the cancer group when compared to the hyperplastic disease group.

Jiang and Magi-Galluzzi showed a potential use to aid the pathological diagnosis of prostate cancer, but there were no difference in AMARC prevalence between our groups ²⁴. Glemann described that until now there were no identified genes that are quiescent in prostate epithelium and activated in prostate cancer, for this reason AMARC could also detect nonmalignant conditions ²⁵. In urine samples, AMARC was not statistically significant predictor of prostate cancer ²⁶. Although some studies

showed difference in AMARC expression between malign and benign prostate disease, in this study there was no difference.

Prostatic cancer tissue is basically maintained by hormonal stimulation. In 80-90 % of prostate cancer are hormone-dependent. Testosterone is responsible for this stimulation. Palliative cancer treatment is based on testosterone deprivation. It is expected that cancer tissue present with a high concentration of AR, as we concluded in our study. Some high grade tumors, sometimes, have down-regulation of AR. AR gene amplification improves the cell's ability to survive in androgen-deficient conditions. These also occurs in drug resistance and therapeutic failure. Patients with high concentration of AR and resistance to androgen-blockade can potentially benefit of maximal androgen blockade (MAB) and this response should be further evaluated ²⁷⁻³³.

De la Talle, using PCA3 assay in urine samples comparing with psa showed a significantly higher AUC ³⁴. In our study psa had a greater HR with significance when compared to PCA3, otherwise we analysed molecular markers in prostate tissue instead urine.

Conclusion

Molecular markers can be a useful diagnostic and prognostic tool in prostate cancer and potentially help to avoid unnecessary prostate biopsies, but our study didn't showed difference in accuracy between the molecular markers and psa in prostatic tissue. Cancer aggressiveness didn't showed difference in markers concentration.

The present study shows a higher concentrations of PCA3, TSP1 and AR in prostate cancer samples when compared to BPH samples. PCA3 showed a higher AUC and could be used to predict biopsy outcome. TSP-1 concentration may be high in BHP and prostate cancer and seems to be not a good marker to avoid prostate biopsies.

Maybe urine samples can provide a more accurate molecular marker samples than tissue by himself.

No molecular marker analyzed in our study in prostatic tissue was specific enough to avoid new biopsies or provide risk stratification previous to surgery. PSA is still the best single marker previous prostate biopsy.

Building a nomogram with various molecular markers combination may improve the prediction value of these tests in the diagnosis of prostate cancer.

Avaliação do PCA-3, TSP-1, AMARC e AR no câncer de próstata

Freitas DMO, Koff WJ, Berger M, Biolchi V, Neto BS, Quintanilha M, Silva ISB

Abstract

Objetivos

Comparar a concentração de quatro marcadores moleculares (PCA3, TSP-1, AMARC and AR) em amostras de tecidos de câncer de próstata e hiperplasia benigna da próstata.

Pacientes e métodos

Estudo transversal. Analisamos 68 amostras de tecido de câncer de próstata e hiperplasia de próstata de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As concentrações dos marcadores moleculares foram comparadas utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) nos grupos hiperplasia e câncer.

Resultados

PCA3, TSP-1 e AR apresentaram concentrações significativamente mais altas nas amostras de câncer quando comparadas às de hiperplasia. Entretanto não houve diferença nos níveis da racemase entre os grupos. Quando dividimos o grupo câncer em tumores de baixo grau e intermediário-alto grau não houve diferença na concentração dos marcadores. A razão de risco foi maior para PCA3 e psa no diagnóstico do câncer de próstata.

Conclusão

A trombospondina parece não ser um marcador eficaz na avaliação da neoplasia maligna da próstata. PCA3 e AR apresentaram grandes concentrações nos tecidos de câncer de próstata. Não houve diferença entre as concentrações dos marcadores e o grau do tumor Psa ainda é o melhor marcador para o câncer de próstata. A construção de um

nomograma combinando vários marcadores moleculares poderia aumentar o valor preditivo destes testes no diagnóstico do câncer de próstata.

Palavras-chave

Câncer de próstata, marcadores moleculares, PCA3, racemase, trombospondina, receptor androgênico.

Avaliação de marcadores moleculares no câncer de próstata

Introdução

O câncer de próstata é a segunda maior causa de morte por câncer. A incidência da neoplasia maligna da próstata no Brasil para 2010 esperada fica em torno de 52000 casos(1). O diagnóstico precoce aumenta a chance de sucesso no tratamento. O rastreamento do câncer de próstata com PSA e exame do toque retal (TR) aumentou o numero de biopsias de próstata (2). O tratamento curativo é baseado na prostatectomia radical ou radioterapia, e o paliativo, supressão androgênica. Os pacientes diagnosticados com doença clinicamente localizada e apresentando-se com doença metastática avançada representam 100% e menos de 50 % de sobrevida em 5 anos, respectivamente (3).

Vários marcadores moleculares têm sido estudados na tentativa de aumentar a especificidade no diagnostico de câncer de próstata.

O PCA3, também chamado de DD3, primeiramente descrito por Bussemakers e col. em 1999, tem sido encontrados , em analise por PCR-RT, em tecidos humanos normais e tumorais e também em amostras de urina (4,5). TSP-1 é um potente inibidor da angiogênese tumoral vem sendo estudado no crescimento do câncer (6). AMARC, é uma proteína codificada pelo gene P450S, apresentando uma alta expressão em células cancerígenas de próstata (16,17). O receptor androgênico é uma prote[Iná codificada pelo gene AR que liga-se a esteróides, local de atuação dos andrógenos. A diminuição na expressão do AR pode potencialmente ser considerada estratégia principal no tratamento paliativo do câncer de próstata hormônio-dependente (18).

Materiais e métodos

Amostras (1-2 cc) de 68 espécimes de prostatectomia radical e 38 espécimes de prostatectomia simples/resseção endoscópica de próstata foram analisadas. As amostras foram obtidas logo após o procedimento cirúrgico e armazenadas em solução de nitrogênio líquido até a análise.

A expressão gênica foi avaliada indiretamente pela técnica de reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR). O RNA do tecido foi extraído com reagente Trizol (Trizol Reagent 100 ml, Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante e após quantificado por espectrofotômetro. O RNA foi utilizado com molde para síntese de cDNA usando *First Strand Synthesis System* para kit RT-PCR (Invitrogen). Cada amostra de RNA foi desnaturada à 65°C por 5 minutos (PTC-100®, MJ Research, Inc.) com 1 µL de dNTPmix (SuperScript® First-Strand, Invitrogen) e 1 µL de OligodT (SuperScript® First-Strand, Invitrogen). Dois µL de 10XPCRBuffer (SuperScript® First-Strand, Invitrogen), 4 µL de 25mM MgCl₂ (SuperScript® First-Strand, Invitrogen), 2 µL de 0,1M DTT (SuperScript® First-Strand, Invitrogen) e 1 µL de RnaseOUT(SuperScript® First-Strand, Invitrogen) foram adicionados a cada amostra. As amostras de RNA foram aquecidas por 2 minutos à 42 °C (PTC-100®, MJ Research, Inc.) seguidos por 1 ul de enzima de transcriptase reversa, SuperscriptIIRT (SuperScript® First-Strand®, Invitrogen) por 50 minutos à 42°C. Para preparação da calibração, curvas de reação foram realizadas com cópias de tecido normal de cDNA. A expressão dos marcadores de interesse foram normalizadas contra o gen b2-microglobulina para cada amostra de tecido replicado. O genes transcritos foram quantitativamente determinados nas amostras, usando análise RT-PCR tempo-dissolvida base-fluorescente com Sybr Green I I (Platinum SyberGreenqPCRSupermix UDG®, Invitrogen). Para amplificação de PCR, os seguintes primers específicos foram utilizados: PCA3 (sequence 5'-3', sense CTG TCA TCG TCC CCA TCT CT, anti AGT

CGT GGA AGC AAA GGC TA); TSP1 (sequence 5'-3', sense GAG AAC AGA GCC CCA CAG AG, anti CCC AAA ATA TCC TGG GAG GT); AMARC (sequence 5'-3', sense TGG CTT TGT CAG GTG TTC; anti TAT GCT GTT CCT TCC ACC ATA T); AR (sequence 5'-3' AR3 GCA TGG TGA GCA GAG TGC CCT ATC; AR5 TCC CAG AGT CAT CCC TGC TTC AT).

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os grupos. Um modelo de regressão logística foi utilizado para avaliação de curva ROC. O teste de qui-quadrado foi utilizado para testar associações entre marcadores moleculares e diagnóstico de câncer. Todos os testes realizados utilizaram um nível de significância de 5 % utilizando o programa SPSS v.17.

Resultados

Os dois grupos foram comparados para idade e nível de psa (tabela 1). Houve diferença estatística entre os grupos para idade. O nível médio de psa variou entre 4,51-4,80 no grupo hiperplasia e 7,42-10,42 no grupo câncer quando medidos entre os grupos de marcadores que foram estudados. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos hiperplasia e câncer para nível de PSA em todos os grupos. Tabela 1 descreve ainda o escore de Gleason e a classificação TNM no grupo câncer. Gleason 6 (3+3) foi o escore mais prevalente encontrado em 26 pacientes (40,62%) seguido por Gleason 7 (3+4) em 17 pacientes (26,56%). TNM T2c foi o achado patológico mais prevalente, presente em 19 pacientes (29,69%) seguido pelo T3a, em 17 pacientes (26,56%). Após a cirurgia 25 pacientes (39%) foram diagnosticados com doença localmente avançada e 39 pacientes (61%) foram diagnosticados com doença restrita a próstata.

Nós analisamos a expressão do PCA3, AMARC, AR e TSP-1 em 30, 27, 58 e 25 amostras de tecido de câncer de próstata respectivamente e 24, 24, 36 e 23 em amostras

de tecido de próstata hiperplásico, respectivamente. Uma alta concentração de PCA3, TSP-1 e AR foi encontrada em tecidos de câncer e hiperplasia (tabela 2, figura 1, 3-4). Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para AMARC (tabela 2, figura 2).

Após analisar a frequência de distribuição na curva ROC, $PCA3 > 0,306$ foi encontrado em 76%, $TSP-1 > 1,04$ em 70,8% e $AR > 0,327$ em 71,9 % no grupo cancer, todos com significância estatística (tabela4). A análise de regressão logística encontrou uma razão de risco de 10,2 para $psa > 4,25$ e 4,65 para $PCA3 > 0,306$ (tabela 5).

Discussão

Em uma nova era para investigação do câncer, muita discussão tem ocorrida baseada na necessidade de um método diagnóstico mais específico para o câncer de próstata antes da biópsia. Recentemente, alguns estudos têm discutido o *overdiagnosing* e o *overtreatment*. Vickers e col sugeriram que o rastreamento repetido pode ser direcionado a parcela de cerca de 25% dos homens no qual o nível de psa se encontra acima de 2 ng/ml aos 60 anos (19). Um grande número de pacientes que foram submetidos ao tratamento do câncer provavelmente poderiam não apresentar benefícios com este tratamento.

Nos últimos 10 anos, novos marcadores moleculares têm sido estudados na tentativa de melhorar a especificidade no diagnóstico com a intenção de diminuir o número de biópsias de próstata desnecessárias.

Uma metanálise recente comparou o PCA3 e a biópsia da próstata no diagnóstico do câncer. A sensibilidade ficou entre 46,9-82,3% e especificidade 59,4-97,4% em amostras de urina. Nosso estudo demonstrou uma maior prevalência deste marcador nos tecidos de câncer de próstata quando comparados ao tecido hiperplásico ($p < 0,05$). O aumento proporcional da mediana do PCA3 do tecido hiperplásico para o

câncer foi de 2 vezes. A alta prevalência do escore Gleason 6 poderia explicar o pequeno aumento nas concentrações do marcador, sendo que já foi descrita a correlação linear entre os tumores de alto grau e a concentração de PCA3 (20).

Fatores angiogênicos também têm sido estudados com fatores prognósticos e terapêuticos alternativos para estratificar tumores indolentes e agressivos. Por ser um inibidor angiogênico tumoral seria esperado níveis baixos de trombospondina no grupo câncer, assim como o encontrado em outros estudos (12) Na coloração imunohistoquímica nos tecidos prostáticos, alguns estudos demonstraram níveis elevados de concentração de TSP-1 em doença prostática benigna e no câncer de próstata (6). Não está certo, até o momento, por qual motivo a concentração do TSP-1 está baixa nos tumores de próstata, mas o PTEN e o P53 parecem estar envolvidos (22). Colombel e col encontraram que tumores de próstata de baixo grau têm uma tendência em apresentar níveis maiores na concentração de TSP-1 que os tumores de alto grau (23). Em nossos resultados, o grupo câncer apresentou uma alta concentração de TSP-1 quando comparados a hiperplasia com significância estatística. Também, cerca de 40,62% das amostras de tecido de câncer prostático eram Gleason 6 (3+3), considerado tumor de baixo grau. Isto poderia explicar uma alta concentração de TSP-1 no grupo câncer quando comparado com o grupo hiperplasia.

Jian e Magi- Galluzzi (24) demonstraram o potencial uso da AMARC no auxílio do diagnóstico do câncer de próstata, mas não houve diferença estatística entre os grupos. Glemann (25) descreveu que, até o momento não há genes identificados que estejam quiescentes no epitélio prostático e ativados no câncer de próstata, por esta razão, AMARC poderia também ser detectada em condições não-malignas. Em amostra de urina, AMARC, não apresentou diferença estatística para prever condições não

malignas (26). Embora alguns estudos mostrem diferença na expressão do AMARC entre doenças malignas e benignas da próstata, este estudo não demonstrou diferença.

O tecido prostático com câncer é basicamente mantido por estimulação hormonal. Cerca de 80-90% são hormônio-dependentes. A testosterona é responsável por esta estimulação. O tratamento do câncer paliativo é baseado na privação de testosterona. É esperado que o tecido neoplásico apresente uma grande concentração de AR, com concluímos neste estudo. Alguns tumores de alto grau, eventualmente apresentam diminuição na quantificação de receptores androgênicos (31). A amplificação do gene AR aumenta a habilidade da célula para sobreviver em condições androgênio-deficientes. Isto também ocorre na resistência a medicação e falência terapêutica. Pacientes com alta concentração de AR e resistência ao bloqueio hormonal podem potencialmente se beneficiar de bloqueio androgênico Maximo (MAB) e esta resposta deve ser melhor avaliada (27-33).

De La Talle, avaliando PCA3 em amostras de urina em comparação com psa demonstrou uma maior AUC com significância estatística para o primeiro. No nosso estudo o psa apresentou uma maior razão de risco com significância quando comparado ao PCA3, entretanto nos analisamos os marcadores moleculares em tecido prostático ao invés de amostras de urina

Conclusão

Os marcadores moleculares podem ser úteis no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata e potencialmente ajudar a evitar biopsias de próstata desnecessárias, todavia nosso estudo não demonstrou melhora da acurácia dos marcadores moleculares com relação ao psa nos tecidos prostáticos.

Altas concentrações de PCA3, TSP1 e AR foram encontradas em amostras de câncer de próstata quando comparados a amostras de hiperplasia benigna da próstata. PCA3 demonstrou uma área sob a curva maior e pode ser utilizado futuramente para prever resultado da biópsia. A concentração de TSP-1 pode estar alta na HPB e no câncer de próstata e parece não ser um bom marcador para evitar biópsias de próstata. Talvez a avaliação de amostras de urina possa proporcionar marcadores moleculares mais acurados do que tecido prostático.

Nenhum marcador molecular analisado em nosso estudo em amostras teciduais de próstata foi específico o suficiente para evitar novas biópsias ou proporcionar estratificação de risco prévia a cirurgia. O PSA ainda é o melhor marcador único previamente a biópsia.

A construção de nomograma com a combinação de vários marcadores poderia melhorar o valor preditivo destes testes no diagnóstico do câncer de próstata.

Anexos:

1. Table 1. Demographics for population in study.

	N	PCa	N	BPH (n=126)	p
Age (years)					
AR	58	63,39	36	64,28	0,176
PCA3	30	62,43	24	61,75	0,331
AMARC	27	62,59	24	63,06	0,204
TSP-1	25	61,67	23	61,53	0,220
PSA (ng/ml)					
AR	58	10,72	36	4,80	0,001
PCA3	30	7,69	24	4,64	0,008
AMARC	27	7,55	24	4,51	0,010
TSP-1	25	7,43	23	4,57	0,021
Tumor stage					
		%			
T2A	12	18,75			
T2B	8	12,50			
T2C	19	29,69			
T3A	17	26,56			
T3B	7	10,94			
T4	1	1,56			
Gleason score					
5(3+2)	1	1,56			
6 (3+3)	26	40,62			
7(3+4)	17	26,56			
7(4+3)	11	17,19			
8(4+4)	4	6,25			
8(3+5)	1	1,56			
9(4+5)	3	4,69			

9(5+4) 1 1,56

Table 2. Concentration of molecular markers in cancer and hyperplastic tissue:

	group	N	Median (25-75)	p
AR	câncer	58	0,56 (0,26-1,72)	0,002 ¹
	hyperplasia	36	0,29 (0,07-0,76)	
PCA3	câncer	30	0,32(0,09-0,73)	0,005 ¹
	hyperplasia	24	0,15(0,03-0,31)	
AMARC	câncer	27	1,49(0,51-4,05)	0,174
	hyperplasia	24	1,29(0,93-3,05)	
TSP1	câncer	25	1,86(1,09-6,19)	0,033 ¹
	hyperplasia	23	1,24(0,07-0,73)	

1 p<0,05

Table 3. Concentration of molecular markers in cancer group divide by Tumor grade

	group	N	Median (25-75)	p
AR	Gleason 6 or less	23	0,55(0,26-1,11)	0,82
	Gleason 7 or more	34	0,52(0,27-1,94)	
PCA3	Gleason 6 or less	12	0,37(0,19-0,57)	0,59
	Gleason 7 or more	17	0,77(0,13-1,40)	
AMARC	Gleason 6 or less	11	1,64(0,36-3,68)	0,32
	Gleason 7 or more	16	1,96(0,82-5,51)	
TSP1	Gleason 6 or less	11	1,65(1,10-3,78)	0,25
	Gleason 7 or more	14	2,89(1,37-6,35)	

P<0,05

Table 4 . Frequency distribution of DD3, AMACR and TSP1 mRNA expressions and serum PSA between PCa and BPH group.

	N	PCa n (%)	BPH n (%)	p*
AR ≤ 0.327	37	17 (45.9%)	20 (54.1%)	0.017
AR > 0.327	57	41 (71.9%)	16 (28.1%)	
DD3 ≤ 0.306	29	11 (37.9%)	18 (62,1%)	0.007
DD3 > 0.306	25	19 (76%)	6 (24%)	
AMACR ≤ 1.45	25	11 (44 %)	14 (56 %)	0.513
AMACR > 1.45	26	16 (61.5 %)	10 (38.5 %)	
TSP1 ≤ 1.64	24	8 (33.3%)	16 (66.7%)	0.020
TSP1 > 1.64	24	17 (70.8%)	7 (29.2%)	
PSA ≤ 4.25	22	7 (31.8%)	15 (68.2%)	<0.001
PSA > 4.25	69	57 (82.6%)	12 (17.4%)	

* Value obtained using the 2x2 Chi-squared test (with correction for continuity).

TABLE 5. Hazard ratio to develop PCa compared to BPH group.

*	NMT HR	CI (95%)	P†
AR ≤ 0.327	3.41	1.37 – 8.47	0.008
AR > 0.327			
DD3 ≤ 0.306	4.65	1.36 – 16.13	0.015
DD3 > 0.306			
AMACR ≤ 1.45	2.02	0.63 – 6.49	0.239
AMACR > 1.45			
TSP1 ≤ 1.64	5.26	1.45 – 19.23	0.012
TSP1 > 1.64			
PSA ≤ 4.25	10.20	3.41 – 30.30	≤0.001
PSA > 4.25			

†p<0,05

Figure 1: TSP1 concentration in cancer and hyperplasia group

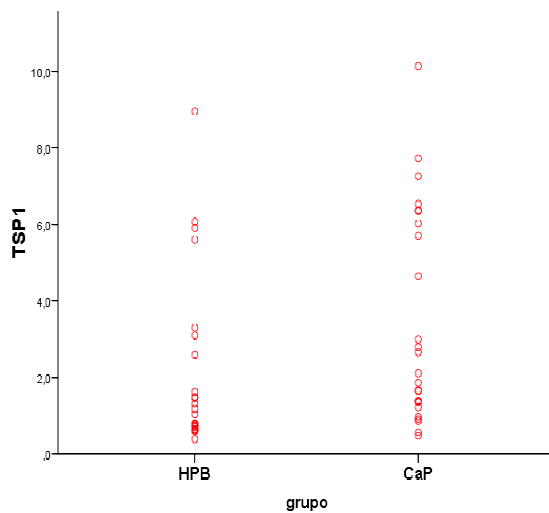


Figure 2: AMARC concentration in cancer and hyperplasia group

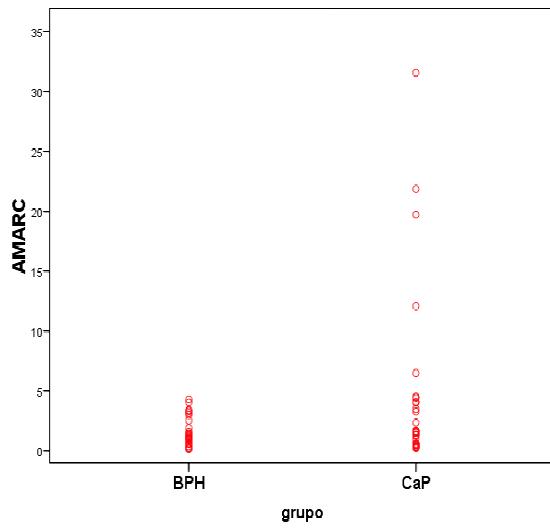


Figure 3: PCA3 concentration in câncer and hyperplasia group

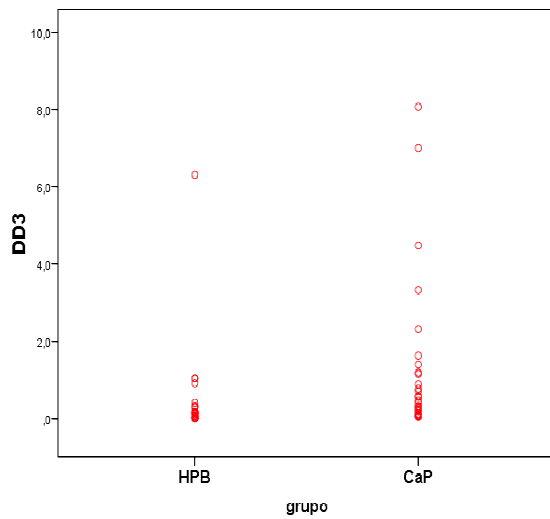
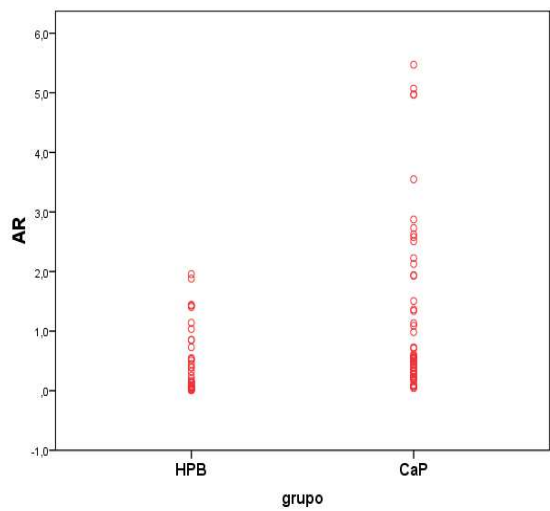


Figure 4: AR concentration in câncer and hyperplasia group



Bibliografia

1. Constantinou J, Feneley MR. PSA testing: an evolving relationship with prostate cancer screening. *ProstateCancerProstaticDis*. 2006;9(1):6-13. Review
2. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL Jr, Beard JH, Pond HS, Terry WJ, Igel TC, Kidd DD. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol*. 1990 Jun;143(6):1146-52.
3. Chu KC, Lamar CA, Freeman HP. Racial disparities in breast carcinoma survival rates: separating factors that affect diagnosis from factors that affect treatment. *Cancer*. 2003 Jun 1;97(11):2853-60.
4. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, Fouad MN, Gelmann EP, Kvale PA, Reding DJ, Weissfeld JL, Yokochi LA, O'Brien B, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hayes RB, Kramer BS, Izmirlian G, Miller AB, Pinsky PF, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD; PLCO Project Team. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*. 2009 Mar 26;360(13):1310-9. Epub 2009 Mar 18.
5. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999 Dec 1;59(23):5975-9.
6. Valbo C, Damber JE. Thrombospondins, metallo proteases and thrombospondin receptors messenger RNA and protein expression in different tumoursublines of the Dunning prostate cancer model. *ActaOncol*. 2005;44(3):293-8.
7. Jiang Z, Woda BA, Rock KL, Xu Y, Savas L, Khan A et al. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J SurgPathol*, 2001;25(11):1397-1404.

8. Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Xu Y, Savas L, Khan A et al. P504S/alpha-methylacyl-CoA racemase: a useful marker for diagnosis of small foci of prostatic carcinoma on needle biopsy. *Am J SurgPathol*. 2002;26(9):1169-1174.
9. Beach R, Gown AM, De Peralta-Venturina MN, Folpe AL, Yaziji H, Salles PG et al. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am J SurgPathol*. 2002;26(12):1588-1596.
10. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG et al. Alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *Jama*. 2002;287(13):1662-1670.
11. Magi-Galluzzi C, Luo J, Isaacs WB, Hicks JL, de Marzo AM, Epstein JI. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy. *Am J SurgPathol*. 2003;27(8):1128-1133.
12. Kunju LP, Rubin MA, Chinnaiyan AM, Shah RB. Diagnostic usefulness of monoclonal antibody P504S in the workup of atypical prostatic glandular proliferations. *Am J ClinPathol*. 2003;120(5):737-745.
13. Zhou M, Jiang Z, Epstein JI. Expression and diagnostic utility of alpha-methylacyl-CoA-racemase (P504S) in foamy gland and pseudohyperplastic prostate cancer. *Am J SurgPathol*. 2003;27(6):772-778.
14. Zhou M, Aydin H, Kanane H, Epstein JI. How often does alpha-methylacyl-CoA-racemase contribute to resolving an atypical diagnosis on prostate needle biopsy beyond that provided by basal cell markers?. *Am J SurgPathol*. 2004;28(2):239-243.
15. Jiang Z, Iczkowski KA, Woda BA, Tretiakova M, Yang XJ. P504S

- immunostaining boosts diagnostic resolution of "suspicious" foci in prostatic needle biopsy specimens. *Am J ClinPathol*. 2004;121(1):99-107.
16. Lee D. High Androgen receptor levels predictive of decrease survival in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2:13-14.
 17. Lee DK, Chang C. Endocrine mechanisms of disease: expression and degradation of androgen receptor. *J ClinEndocrMetab* 2003. 88:4043
 18. Cohen MB, RokhlinOW. Mechanisms of prostate cancer cell survival after inhibition of AR expression. *J Cell Biochem*. 2009 Feb 15;106(3):363-71. Review.
 19. Vickers AJ, Cronin AM, Björk T, Manjer J, Nilsson PM, Dahlin A, Bjartell A, Scardino PT, Ulmert D, Lilja H. Prostate specific antigen concentration at age 60 and death or metastasis from prostate cancer: case-control study. *BMJ*. 2010 Sep 14;341:c4521
 20. Deras IL, Aubin SM, Blase A, Day JR, Koo S, Partin AW, Ellis WJ, Marks LS, Fradet Y, Rittenhouse H, Groskopf J. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome.. *J Urol*. 2008 Apr;179(4):1587-92. Epub 2008 Mar 4
 21. Assessment of the PCA3 test for prostate cancer diagnosis: a systematic review and meta-analysis]Ruiz-Aragón J, Márquez-PeláezS. *Actas Urol Esp*. 2010 Apr;34(4):346-55. Review. Spanish.
 22. Vallbo C, Wang W, Damber JE. The expression of thrombospondin-1 in benign prostatic hyperplasia and prostatic intraepithelial neoplasia is decreased in prostate cancer. *BJU Int*. 2004 Jun;93(9):1339-43.
 23. Colombel M, Filleur S, Fournier P et al. Androgens repress the expression of angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 normal and neoplastic prostate. *CancerReser*. 2005; 65: 300-308\

24. Jiang Z, Iczkowski KA, Woda BA, Tretiakova M, Yang XJ. P504S immunostaining boosts diagnostic resolution of "suspicious" foci in prostatic needle biopsy specimens. *Am J ClinPathol*. 2004;121(1):99-107.
25. Gelmann EP, Semmes OJ. Expression of genes and proteins specific for prostate cancer. *J Urol*. 2004 Nov;172(5 Pt 2):S23-6; discussion S26-7.
26. Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, Lonigro RJ, Tsodikov A, Wei JT, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):645-9.
27. Cleutjens KBJM. An androgen response element. *Mol Endocrinol* 1997, 11: 148.
28. Heilein C, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrinol Reviews* 2004. 25(2) 276-308.
29. Denis LJ, Griffiths K 2000. Endocrine treatment in prostate cancer *Semin Surg Oncol* 18:52-74.
30. Lee D. High Androgen receptor levels predictive of decrease survival in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2:13-14.
31. Lee DK, Chang C. Endocrine mechanisms of disease: expression and degradation of androgen receptor. *J Clin Endocr Metab* 2003. 88:4043
32. De Winter JAR, Janssen. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory. 1994. *Am J Pathol* 144:735-746.
33. Bubendorf L. Survey of gene amplifications during prostate cancer. 1999. *Cancer Res* 59:803.
34. de la Taille A, Irani J, Graefen M, Chun F, de Reijke T, Kil P, Gontero P, Mottaz A, Haese A. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol*. 2011 Jun;185(6):2119-25.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em especial ao Prof. Koff , Prof. Milton Brasil

Ao serviço de Cirurgia Geral do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em especial ao Prof. Cleber

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Agradecimento especial para Dra Ilma e Dr Vanderlei verdadeiros entusiastas da ciência.

Fontes de Financiamento

Este projeto obteve financiamento do FIPE/HCPA, PPG-Cirurgia e FAPERGS para material de consumo. Em termos de infra-estrutura, os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Endocrinologia Molecular do ICBS/Fisiologia/UFRGS, e o LaGOM (Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular/Centro de Pesquisq/HCPA), local dos equipamentos necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

