Marcos Tobias-Machado

Expressão do transcrito da citoqueratina 19 (CK-19) na fração mononuclear do sangue periférico em pacientes com adenocarcinoma de próstata

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Hematologia Orientador: Prof. Dr. Auro del Giglio

São Paulo 2007

HOMENAGEM AOS GRANDES MESTRES

(Auro del Giglio, Eric Roger Wroclawski, Milton Borrelli, Geraldo de Campos Freire, Paulo Kouti Sakuramoto, Roberto Vaz Juliano, Maurício Fregonesi da Silva, João Fava, Pedro Paulo Chieffi, Rita de Cássia Baradas Barata e Valdir Golin)

"Só o amor conhece o que é verdade,

Só o amor quer o bem, não quer o mal,

Não sente inveja ou se envaidesse."

São Paulo

"Procure ser um homem de valor e não um homem de sucesso."

Albert Einstein

"Não copie ninguém.

Que a sua descoberta seja como uma nova lei da natureza."

Leonardo da Vinci

Tive o privilégio de conviver com notáveis professores, distintos pela competência e brilhantismo, e que influenciaram diretamente os rumos da minha vida profissional e acadêmica.

Agradeço a todos, que de alguma forma me ensinaram que o verdadeiro médico é um homem que ama a profissão com humildade, persegue seus sonhos com responsabilidade e procura mares nunca dantes navegados.

DEDICATÓRIA

Inicialmente dedico este trabalho a Deus, Criador do Universo e das criaturas, e agradeço minha insuperável vontade de viver e crescer no caminho do bem. Sei que não sou merecedor de todos os presentes que ganhei nesta vida.

Ao Meu Maior Amigo e Pai, Marcos Antônio, guerreiro incansável, vencedor de todas as batalhas, e um grande incentivador da minha formação educacional, a admiração e o respeito do teu primogênito. Sem você, meu querido, eu provavelmente não chegaria até aqui.

A Minha Querida Mãe, Olga, criatura bela, altiva, alegre e desprovida de maldade, minha amiga fiél e confidente, agradeço todo o sentimento e o apoio ativo recebido em cada momento de perdas e ganhos nesta vida.

A minha avó Nair ("in memorian"), que juntamente com os meus pais, criou-me a pão-de-ló, com um carinho além de especial. A senhora estará sempre na minha lembrança.

Ao amor da minha vida, Yara, esposa sensível e generosa, musa dos meus versos e dos meus sonhos, agradeço todos os momentos de felicidade e plenitude já vividos. Você tem me mostrado de maneira simples e intensa que o verdadeiro amor pode existir quando dois seres se relacionam sem a intenção de mudar o íntimo de cada um.

A todos os meus queridos filhos, Dante, Luísa, Débora, Maria Eduarda, Felipe e Mariana, obras primas do criador, que têm , cada qual com seus talentos e encantos, enchido minha vida de alegria e esperança.

Peço desculpas pela ausência eventual a qual este trabalho me obrigou. O papai ama muito vocês.

Aos meus irmãos Ricardo, Eduardo, Fernando, Mayara, Lara e Ana Clara que apesar da distância pelas circunstâncias geográficas sempre estão no meu coração.

Aos meus alunos, residentes e colaboradores (meus verdadeiros filhos científicos), com os quais tive o privilégio de conviver trocando experiências no sentido do aprimoramento contínuo da prática médica e da ciência. Sem vocês minha vida não seria tão motivante!

A todos os meus pacientes, produto do amor a medicina e a vida, ofereço também esta obra. A oportunidade de compartilhar com outros seres suas mais íntimas angústias do corpo e da alma e a possibilidade de aliviar o sofrimento são experiências muito especiais. Estou certo de que a luta para melhorar o bem estar do ser humano é a principal missão desta minha existência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Eric Roger Wroclawski, urologista aclamado pelos pares, grande empreendedor e administrador excepcional, a possibilidade de realizar um sonho permitindo o meu ingresso na carreira acadêmica, as oportunidades profissionais oferecidas e o apoio contínuo aos projetos que tenho desenvolvido. Agradeço de maneira especial sua participação especial como co-orientador e patrocinador pessoal deste estudo. Deixo como legado histórico o fato de ser o primeiro "menino do ABC" (nome carinhoso pelo qual os assistentes "jovens" da uro-ABC são tratados pelo Professor) a pleitear o doutorado.

Ao Prof Dr Auro del Giglio, exemplo de profissional e cientista, a contínua e incansável orientação para que este estudo pudesse resultar num produto de qualidade. O seu conhecimento enciclopédico e sua visão multiprofissional do paciente com câncer são características notáveis que se somam a sua liderança nata na área da Oncologia.

Ao Dr Dalton Chamone, por ter dado a oportunidade e um voto de confiança a um urologista, permitido meu ingresso no programa da pósgraduação da Hematologia da Universidade de São Paulo .

Ao Dr Israel Bendit, meu respeitável veterano na gloriosa Santa Casa e profissional de renome na área da biologia tumoral, pelas valiosas opiniões e suporte na elaboração, execução e documentação gráfica deste projeto.

A Ana Paula Fantinato e Fernando Fonseca, profissionais competentes e dedicados a pesquisa, pelo suporte técnico durante o

projeto, realização das aferições laboratoriais e participação na elaboração do texto desta obra.

A Dra Telma Murias dos Santos por ser uma mãe zelosa e incansável e pelo incentivo contínuo a minha carreira. Agradeço também sua participação neste trabalho com opiniões positivas e na digitação da maior parte do texto.

A Sra. Teresinha, secretária da Hematologia, por todo o suporte, paciência e dedicação durante todo o período da pós-graduação.

A Sra Dilene, responsável pelo ambulatório de Oncologia da FMABC, pela simpatia, gentileza e colaboração no agendamento das consultas.

Ao Dr Paulo Emílio Fugante pelo auxílio no atendimento aos pacientes.

Ao Dr Marcelo Wroclawski, ainda acadêmico no período de coleta de dados, pela organização e programação da logística de atendimento durante todo o período do estudo.

Ao Prof Dr Álvaro Sadek Sarkis pelos valiosos comentários durante a qualificação que serviram para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Dr Carlos Alberto Bezerra, chefe da Clínica Urológica, pela compreensão e apoio durante a realização deste estudo.

Ao Dr Antônio Correa Lopes Neto, meu irmão por opção, por todo o suporte e companheirismo nos bons e maus momentos da vida. Seu amor pela faculdade, conhecimento e senso de justiça o colocam num patamar superior como acadêmico e como homem.

A todos os meus colegas da disciplina de Urologia do ABC, em

especial ao Dr Alessandro Tavares e aos assistentes do setor de Urooncologia, Drs Pedro Hermínio Forseto Jr, Wilson Rica Molina Jr e Alexandre Diane, pela dedicação ao paciente oncológico, cumprimento das diretrizes da disciplina de Urologia e, principalmente, pela amizade sincera que nos une.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento: Referências: adaptado de International Commitee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação . Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2.a ed. São Paulo; Serviço de Biblioteca e documentação;2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

RESUMO

Tobias-Machado M. Expressão do transcrito da citoqueratina 19 (CK-19) na fração mononuclear do sangue periférico em pacientes com adenocarcinoma de próstata [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Introdução: O emprego da técnica de RT-PCR na detecção da expressão de genes epiteliais como a CK-19 no sangue periférico de pacientes com câncer de próstata é uma oportunidade para avaliar a progressão tumoral ao nível molecular na ausência de doença clinicamente mensurável.

Material e métodos: Inicialmente 10 pacientes com nível sérico de PSA< 2ng/ml e toque retal sugestivo de hiperplasia prostática benigna foram incluídos como grupo controle através de coleta de sangue única para dosagem do transcrito da CK-19. Subsequentemente, foram seguidos de maneira prospectiva 44 pacientes com câncer de próstata (21 com doença localizada e 23 com doença metastática), com coleta de sangue seriada a cada 3 meses por 18 meses. Foi medida a expressão sérica do transcrito da CK-19 por RT-PCR na fração leucocitária do sangue periférico e correlacionada aos níveis séricos de PSA e outras variáveis clinicas e patológicas.

Resultados: Nenhum de 10 pacientes controles apresentou expressão do transcrito da CK-19 no sangue periférico. Nos pacientes com câncer de próstata a expressão do transcrito da CK-19 na entrada do estudo não se correlacionou com o escore de Gleason, estádio clínico e os níveis séricos de DHL, Hemoglobina, PSA, Fosfatase alcalina ou Testosterona. A presença de pelo menos uma dosagem positiva de CK-19 durante o seguimento se correlacionou com o tempo para a progressão bioquímica do PSA na amostra como um todo(p=0,049) e no subgrupo com doença metastática(p=0,032).

Conclusão: Não houve expressão do transcrito da CK-19 na fração mononuclear do sangue periférico em homens do grupo controle. Nos pacientes com câncer de próstata não houve correlação entre a expressão do transcrito da CK-19 na entrada do estudo e as principais variáveis clínicas e patológicas de prognóstico. Nos pacientes com câncer de próstata, a presença de pelo menos uma dosagem positiva para o transcrito da CK-19 no seguimento se correlacionou com um menor tempo para recidiva bioquímica, especialmente no subgrupo de pacientes com doença metastática tratados com hormonioterapia.

Descritores: Neoplasias da próstata, citoqueratinas/genética, reação da polimerase em cadeia, marcadores tumorais biológicos

SUMMARY

Tobias-Machado M. Cytokeratin 19 expression in the peripheral blood mononuclear fraction of prostate cancer patients.[tesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Background: The recent introduction of sensitive RT-PCR-based techniques for the detection of epithelial antigen expression, such as CK-19,in the peripheral blood of prostate cancer patients may provide an opportunity to evaluate early tumor progression at the molecular level, even in the absence of measurable disease.

Methods: Ten men with PSA <2ng/ml and digital rectal examination suggestive for benign prostatic hyperplasia were included as controls by only one colleted blood sample to measure of CK-19 transcript. We also studied serially collected blood samples of 44 patients with prostate cancer (21 with localized and 23 with metastatic disease) every three months for 18 months. We measured CK-19 transcript expression in the peripheral blood mononuclear fraction (PBMN) of these samples by RT-PCR and correlated it with PSA values and other clinical and pathologic variables.

Results: None of the 10 normal control men showed CK-19 transcript expression in their PBMN. In the patients with prostate cancer, CK-19 transcript positivity at entry did not correlate with Gleason score, clinical stage, DHL, hemoglobin level, PSA, alkaline phosphatase or testosterone levels. Having at least one positive CK-19 result during follow up correlated significantly with time to PSA progression in all coorte (p = 0.049) and in the subgroup of metastatic disease (p = 0.032).

Conclusion: There are no expression of CK-19 transcript in the PBMN of control men. In prostate cancer patients there are no correlation between CK-19 at entry and the most important clinical and pathological prognostic variables. Prostate cancer patients that had at least one CK-19 transcript expression in the peripheral blood present lower time to PSA progression, specially metastatic patients receiving hormonal therapy.

Descriptors : 1-Prostatic neoplasms 2-Keratin/genetics 3-Polimerase chain reaction 4-Tumor markers biological

SUMÁRIO

R	esi	ım	n
1 \	-0	41 I I	v

Summary	Página
1.INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1) Aspectos epidemiológicos do câncer de próstata(CaP)	1
1.2) Principais fatores prognósticos do CaP	1
1.3) Antígeno prostático específico(PSA) e CaP	3
1.4) Limitações dos fatores de prognóstico tradicionais	4
1.5) Avaliação da doença micrometastática em câncer de próstata	6
1.5.1) Citoqueratina-19(CK-19)	9
1.5.1.1) Definição e estrutura química	9
1.5.1.2) CK-19 e a próstata	10
1.5.2) Aspectos técnicos da detecção de CK-19	11
1.5.2.1) Técnica de RT-PCR	11
1.5.2.2) Experiência clínica da presença de CK-19 no	
sangue periférico de pacientes com câncer	12
2.OBJETIVOS	15
3.MÉTODOS	16
3.1) Pacientes. Critérios de inclusão e exclusão	16
3.2) Obtenção de dados patológicos e clínicos	16
3.3) Tratamento e seguimento ambulatorial	17
3.4) Técnicas de biologia molecular	18
3.4.1) Separação do RNA e síntese do cDNA pela técnica de RT-PCR	18
3.4.2) Estudo da Expressão de CK-19	19
3.5) Metodologia estatística	20
3.5.1) Cálculo da amostra	20
3.5.2) Testes aplicados	20
4.RESULTADOS	21
4.1)Pacientes do grupo controle	21
4.2)Pacientes com câncer de próstata	21

5.DISCUSSÃO	29
6.CONCLUSÕES	33
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
Apêndices	46
Estadiamento TNM 1992	46
Citações	48
Trabalho publicado	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos dos pacientes com câncer	21
Tabela 2. Associação entre CK-19 e variáveis clínicas	24
Tabela 3. Associação entre CK-19 e exames laboratoriais	25
Tabela 4. Correlação entre pelo menos 1 dosagem do transcrito	
da CK-19 expresso e as variáveis clínicas e laboratoriais	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte histológico de tecido prostático com	
Imunohistoquímica para marcação da CK-19	10
Figura 2. Esquema ilustrando a reação da polimerase em cadeia	12
Figura 3. Foto de gel de agarose ilustrando a ausência de expressão	
do transcrito da CK-19 nos homens do grupo controle	22
Figura 4. Foto de gel de agarose ilustrando o efeito da terapia hormonal	
na expressão do transcrito da CK-19 em 1 paciente com câncer de	
próstata	23
Figura 5. Tempo para progressão bioquímica segundo a expressão do	
transcrito da CK-19 em todos os pacientes com câncer de próstata	26
Figura 6. Tempo para progressão bioquímica segundo a expressão do	
transcrito da CK-19 nos pacientes com doença clinicamente localizada	27
Figura 7. Tempo para progressão bioquímica segundo a expressão do	
transcrito da CK-19 nos pacientes com doença metastática	28

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1) Aspectos epidemiológicos do câncer de próstata

O câncer de próstata corresponde à neoplasia não-cutânea mais freqüente no homem e a segunda causa de óbito por câncer em homens nos Estados Unidos. Dados da American Cancer Society mostraram que 180.400 casos foram diagnosticados e 31900 pacientes morreram da doença em 2000¹. Devido aos programas de rastreamento, em que são empregados o exame retal digital e o antígeno prostático específico (PSA), hoje pôde ser verificada uma redução na mortalidade por câncer de próstata na população americana^{2,3}.

Dados do Instituto Nacional do Câncer estimam que 47280 novos casos ocorrerão no Brasil em 2006, correspondendo também a segunda causa de morte por câncer em nosso país⁴. Estatística publicada pela Fundação Oncocentro mostra que o câncer de próstata já é o terceiro tipo de câncer mais frequente em homens no Estado de São Paulo, com aumento nas taxas de mortalidade nos últimos 10 anos⁵.

1.2) Principais fatores de prognóstico do câncer de próstata

Os fatores de prognóstico independentes já estabelecidos consistentemente em várias séries na literatura para avaliar pacientes com tumores da próstata são: 1) o nível de PSA; 2) o grau de diferenciação tumoral de acordo com a classificação proposta por Gleason e 3) estadiamento do tumor.

A utilidade do PSA no diagnóstico e seguimento será discutida na próxima sessão.

Características anatomo-patológicas do tumor primário frequentemente traduzem o comportamento biológico da neoplasia.

A graduação histológica descrita por Gleason é a mais aceita atualmente. Consiste da avaliação arquitetural das células neoplásicas contidas na porção glandular com relação ao estroma prostático. Nesta classificação são descritos 5 graus histológicos (1 a 5), com valor crescente dos tumores bem diferenciados para os indiferenciados⁶. A característica de multifocalidade com freqüentes diferenças no grau de diferenciação de cada foco levaram a adoção do escore de Gleason. O escore de Gleason nada mais é do que o somatório dos 2 padrões mais encontrados

considerando-se todo o material histológico a ser avaliado. Em produtos de biópsia prostática a Academia Americana de Patologia sugere que o padrão mais comum seja somado ao mais indiferenciado, melhorando assim a correlação entre o escore em produtos de biópsia e a peça cirúrgica⁷.

Tumores com escore de Gleason de 2-6 (bem diferenciados) apresentam melhor prognóstico e maior sobrevida câncer específica. A presença de escore de Gleason de 8 a10 (indiferenciados) confere uma maior chance de recidiva da doença e mortalidade por câncer de próstata. O escore de Gleason 7 apresenta prognóstico intermediário (moderadamente diferenciados)⁸.

A avaliação da extensão do câncer através do seu estadiamento é também um elemento fundamental para guiar a terapêutica e avaliar o prognóstico. Como norma internacional para padronização de resultados o sistema mais utilizado é o TNM (apêndice c). O estadiamento clínico é inicialmente baseado na realização do exame digital da próstata (toque retal). As informações relativas ao toque retal associadas ao nível sérico do PSA e ao escore de Gleason indicam a necessidade de exames subsidiários (tomografia computadorizada de abdômen e pelve, cintilografia óssea e RX de tórax) para o estadiamento da doença a distância⁹:

O estadiamento patológico pode ser obtido nos pacientes submetidos a cirurgia radical através da análise histopatológica do espécime cirúrgico. O estadiamento é um dos principais indicadores independentes de prognóstico e sobrevida em pacientes com câncer de próstata¹⁰. A sobrevida global para pacientes com doença órgão confinada (estágios 1 e 2) que receberam uma terapia de controle local é maior do que 90% em 10 anos¹¹. A progressão bioquímica da doença, ou seja, a elevação do PSA pode ocorrer de 15-30% dos pacientes submetidos a cirurgia radical¹². Em uma grande série de pacientes operados e que apresentaram elevação do PSA(16% do total), o tempo médio para o aparecimento de metástases mensuráveis foi de 7 anos e o tempo de sobrevida médio foi de 13 anos¹³. Por outro lado, outros trabalhos mostram que a presença de doença metastática (estágio 4) ao diagnóstico é caracterizada por sobrevida média de 4,5 anos^{14,15}.

Através da integração destes dados (estadiamento, escore de Gleason e PSA), é possível se construir algoritmos prognósticos que, na forma de nomogramas, permitem que se possa estimar a possibilidade de doença confinada à próstata, doença localmente avançada, doença em estádio disseminado¹⁶. Alguns nomogramas que avaliam pacientes seguidos a longo prazo permitem estimar a

chance de recidiva de tumores prostáticos após tratamentos locorregionais tais como a cirurgia e radioterapia^{17,18}. O nomograma do Memorial Sloan Kettering Cancer Center (mais conhecido como nomograma de Kattan) foi recentemente atualizado para estimar a chance de recidiva bioquímica 10 anos após a prostatectomia radical. O modelo de Kattan foi validado em amostra externa com um grau de concordância de 79%¹⁸. Apesar dos nomogramas serem úteis, há ainda espaço para um maior refinamento prognóstico no sentido de melhor se poder identificar, dentre os pacientes classificados como de bom prognóstico ou de baixo risco para recidiva, aqueles que irão recidivar e para os quais tratamentos mais agressivos poderiam ser aplicados

1.3) Antígeno prostático específico(PSA) e câncer de próstata

O PSA, o principal marcador tumoral do ser humano, é uma glicoproteína produzida pelo tecido prostático e que tem revolucionado o diagnóstico precoce e o seguimento terapêutico de pacientes com adenocarcinoma de próstata. É possível correlacionar os valores séricos de PSA com o volume tumoral, o estadiamento e a graduação histológica^{19,20,21}.

Além de sua ampla utilização no diagnóstico do CaP, o PSA é importante como fator preditivo para o estadiamento e no acompanhamento pós-tratamento destes pacientes. Com relação ao estadiamento clínico, sabe-se que valores de PSA menores do que 2,5 ng/ml estão relacionados a tumores localizados em mais de 80% dos casos. Nos pacientes com PSA>20ng/ml a chance de doença extraprostática é maior do que 50%. Por outro lado, níveis de PSA>50 ng/ml geralmente correspondem à doença metastática por ocasião do diagnóstico ou no intervalo de um ano²².

Níveis séricos inferiores a 0,2 ng/ml no pós-operatório de prostatectomia radical, indicam resultado cirúrgico adequado. A elevação progressiva indica recorrência bioquímica da doença^{12,23}. A presença de metástase mensurável ocorre em média 7 anos após a recidiva bioquímica ¹³.

A cinética de progressão do PSA no pós-operatório, representados pelo tempo de duplicação do PSA e pela velocidade do PSA, auxilia na distinção entre recidiva local ou sistêmica e nas avaliações de progressão da doença e risco de morte por câncer de próstata.

O aumento dos níveis séricos em intervalo menor do que 1 ano do tratamento

inicial e um tempo de duplicação de PSA menor do que 3 meses sugerem doença sistêmica. Um intervalo maior que 1 ano para a elevação do PSA com velocidade de duplicação maior do que 1 ano sugerem recidiva local²⁴.

A elevação de 2ng/ml no ano que antecede o diagnóstico de câncer de próstata é um forte fator preditivo para mortalidade pela doença²⁵.

Dados recentes mostraram também que a elevação do PSA nos primeiros 3 anos da cirurgia, a presença de escore de Gleason 8-10 ou um tempo de duplicação do PSA no acompanhamento menor do que 9 meses foram fatores preditivos independentes de morte por câncer de próstata em pacientes submetidos a cirurgia radical²⁶.

Com relação à radioterapia (externa ou braquiterapia), acredita-se que o nadir (nível mais baixo atingido por aquele determinado caso) de PSA ocorra entre 12-18 meses, e que os melhores resultados a longo prazo ocorram quando este for inferior a 0,2ng/ml. Valores maiores do que 4 ng/ml, após 6 meses, associam-se à maior chance de progressão, isto é, falência terapêutica^{12,27}.

A redução dos níveis de PSA, após a ablação androgênica, é observada em aproximadamente 80% dos pacientes. Nos pacientes cujo nadir é menor do que 4 mg/ml a média de sobrevida é quatro vezes maior se comparada àqueles com nadir<4 ng/ml²⁸. Não devemos esquecer que a deprivação androgênica reduz a síntese de PSA, independentemente da destruição das células neoplásicas. Ainda que, na maioria das vezes, a remissão e a progressão do câncer estejam relacionados à diminuição e aumento, respectivamente, dos níveis de PSA, pode haver progressão na vigência de níveis estáveis de PSA²⁹.

1.4) Limitações dos fatores de prognóstico tradicionais

Existem pelo menos três situações clínicas evidentes na qual a monitorização através dos níveis de PSA e o emprego de outros fatores de prognóstico são imprecisos na avaliação clínica dos pacientes com câncer de próstata: 1) na doença micrometastática pré-operatória; 2) na monitorização da recidiva bioquímica após tratamento local e 3) na vigência de bloqueio hormonal. Especialmente nestas circunstâncias, está justificada a pesquisa de métodos diagnósticos ou marcadores de atividade de doença com maior acurácia. Uma das alternativas para melhorar nossa

capacidade preditiva nestas situações seria o estudo de marcadores diferentes dos já existentes como, por exemplo, a pesquisa de células do carcinoma de próstata na circulação sanguínea ou na medula óssea. A presença destas células, indetectáveis pelos métodos imagenológicos convencionais e por marcadores como a dosagem sérica de PSA, denominamos doença micrometastática.

O tratamento curativo da doença confinada à próstata pode ser realizado através de prostatectomia radical ou de radioterapia. Sabe-se que até 30 % dos pacientes submetidos à prostatectomia radical, apesar de todos os exames de estadiamento pré-operatório, correspondem a pacientes com doença extraprostática¹². A informação acurada a respeito da disseminação antes da terapia local poderia permitir a indicação de um tratamento mais eficiente para cada caso.

Dos pacientes que irão recidivar após o tratamento local, não é possível determinar claramente quais são aqueles que terão uma evolução para doença clinicamente manifesta num período de tempo menor e, em conseqüência, uma maior chance de sucumbir pela doença. Neste contexto, um marcador que pudesse determinar a disseminação da doença seria útil no sentido de selecionar melhor os pacientes que necessitarão de tratamento sistêmico mais precoce.

Outra situação de difícil avaliação é a detecção precoce de pacientes que desenvolverão resistência ao tratamento hormonal. O tratamento clássico da doença metastática é a hormonioterapia. Dos pacientes com doença metastática, 80 % apresentarão respostas objetivas após a instituição do bloqueio androgênico³⁰. Esta resposta pode ser avaliada através da melhora clínica e da redução dos níveis de PSA. Após um tempo médio de 24 meses, ocorrerá resistência ao tratamento hormonal de primeira linha³¹. Nesta circunstância, a maioria apresentará progressão dos nívies de PSA que previamente encontravam-se estáveis como sinal inicial deste evento. Porém uma parcela dos pacientes apresentarão progressão da doença na vigência de níveis estáveis de PSA²⁹. A antecipação bioquímica da resistência hormonal poderia possibilitar ao paciente a aplicação de uma terapia de segunda linha em boas condições físicas antes da progressão clinicamente manifesta da doenca³².

1.5) Avaliação da doença micrometastática em câncer de próstata

Nos últimos 10 anos, a identificação de células neoplásicas na corrente sanguínea ou na medula óssea de pacientes com câncer, aparentemente confinados ao órgão de origem, abriu uma nova fronteira para o que alguns autores passaram a denominar como estadiamento molecular.

O real significado biológico da presença de células epiteliais na corrente sanguínea de pacientes com câncer não está completamente esclarecido. Dependendo das características do tumor primário, a detecção destas células poderia traduzir um maior volume tumoral ou uma adaptação celular para vencer a barreira do tumor primário, sobreviver na corrente circulatória e eventualmente se alojar a distância.

Apesar de tratar-se de assunto bastante controverso, a presença de células epiteliais no sangue periférico de pacientes com câncer de próstata se correlacionou com fatores de prognóstico adverso ³³⁻³⁵, conferindo também um pior prognóstico em termos de intervalo livre de doença e sobrevida global em várias séries da literatura ³⁶⁻⁴⁰. A maioria dos referidos estudos avaliaram como marcadores o antígeno prostático marcador de membrana (PSMA) ^{33,34}, o antígeno prostático específico (PSA) ^{36,38,39}, e a calicreína ^{37,41} por RT-PCR no sangue periférico como marcadores da presença de células circulantes. Porém, algumas limitações metodológicas como a expressão destes testes na fração leucocitária periférica, o aumento na freqüência da detecção por RT-PCR do mRNA para PSA após a biópsia prostática ou a prostatectomia radical bem como as questões referentes a especificidade dos ensaios são as principais críticas relacionadas a estes estudos ⁴²⁻⁴⁵.

Vários autores procuraram detectar doença residual mínima em pacientes com câncer utilizando diversas técnicas como a imunoperoxidase e a reação de polimerase em cadeia. Estas técnicas se baseiam na pesquisa de células tumorais presentes no sangue e medula óssea dos pacientes através da detecção da expressão de antígenos epiteliais. Estes antígenos são expressos por células oriundas de tecidos epiteliais e que não são expressos, entretanto, por células hematopoéticas destes antígenos no sangue de pacientes com neoplasias epiteliais é interpretado, então, por alguns autores, como decorrente da disseminação hematogênica destes tumores de células epiteliais no sangue no entanto, está em intensa investigação. O encontro de células epiteliais no sangue

periférico destes pacientes poderiam ter diferentes significados clínicos dependendo do contexto de sua ocorrência. Assim, ao diagnóstico, o achado de células tumorais circulantes poderia implicar, mesmo em casos operáveis, em uma doença já disseminada para a qual alternativas terapêuticas incluindo uma abordagem sistêmica poderiam ser indicadas. Da mesma maneira, a detecção destas células durante o seguimento poderia significar uma recaída tumoral precoce para a qual mudanças no esquema terapêutico ou a introdução do tratamento sistêmico, respectivamente, poderiam ser preconizadas. Alguns estudos clínicos têm demonstrado o valor prognóstico da detecção da CK-19 sangue periférico em pacientes com carcinoma escamoso do pulmão e adenocarcinoma de mama, antes e após o tratamento ⁵³⁻⁵⁷.

Há pelo menos 30 estudos que avaliaram a importância da técnica de PCR para PSA ou PSMA na avaliação de pacientes com CaP⁵⁸⁻⁵⁹. De todos estes, dez trabalhos mostraram correlação de prognóstico na detecção de doença extracapsular, com superioridade sobre os parâmetros clínicos, patológicos e os valores do PSA no pré-operatório de pacientes com doença localizada⁶⁰⁻⁷². Os demais trabalhos não conseguiram demonstrar correlação.

Os resultados mais importantes foram obtidos pelo grupo da Universidade de Columbia⁶⁰⁻⁶⁷. Inicialmente demonstraram correlação entre a positividade do PSA RT-PCR e a presença de margens cirúrgicas positivas e penetração capsular do tumor⁶⁰⁻⁶¹. O valor preditivo para detecção de doença extracapsular variou de 64-80 % ⁶²⁻⁶³, quando comparado a 40-50% se avaliados apenas o PSA sérico e o escore de Gleason⁶⁴. Foi demonstrada também relação estatisticamente significativa entre RT-PCR e estádio T3⁶⁵. Recentemente, observaram que se o teste fosse aplicado em pacientes com níveis de PSA sérico > 10 ng/ml, a sensibilidade de detectar um estádio T3 chegava a 91 % ⁶⁶.

Já Okegawa e colaboradores demostraram que o PSMA RT-PCR era capaz de distinguir os pacientes que apresentavam doença confinada à próstata daqueles com extensão extraprostática. O valor preditivo foi de 77 %, quando comparado a 63 % quando utilizados o valor de PSA sérico e de escore de Gleason⁶⁷. Um terceiro grupo também mostrou importância empregando técnica combinada de PSA e PSMA^{68,69}. Apresentaram sensibilidade de 67 % e especificidade de 91 % na detecção de extensão extracapsular.

O seguimento a longo prazo em algumas séries revelou também a correlação da detecção destes antígenos de células neoplásicas circulantes e a maior

probabilidade de recidiva bioquímica em pacientes com doença localizada⁷⁰⁻⁷². Mc Intyre e colaboradores estudando 51 pacientes onde se optou pela observação vigilante, observaram que naqueles que progrediram e apresentavam RT-PCR para PSA positivo ocorreu uma velocidade de elevação do PSA significativamente maior do que aqueles que não negativos⁷³. Num estudo com 390 pacientes submetidos a cirurgia radical, a presença de recidiva bioquímica foi maior nos pacientes que tinham expressão positiva para RT-PCR para PSA no pré-operatório. O mesmo achado foi reportado por Okegawa e colaboradores empregando RT-PCR para PSMA⁷⁴.

A presença de células circulantes em pacientes com doença metastática parece ter também um importante significado biológico. Kantoff e colaboradores , estudando 156 pacientes com doença hormônio-refratária incluídos num protocolo multicêntrico, observaram uma positividade para RT-PCR para PSA em 48% dos pacientes. O intervalo de sobrevida médio no grupo que expressava o marcador foi de 13 meses, quando comparado a 18 meses naqueles que não expressavam o marcador⁷⁵. Em um outro estudo que incluiu 100 pacientes, Ross e colaboradores mostraram também que a expressão de RT-PCR para PSA se correlacionava com o tempo para progressão da doença e a resposta a quimioterapia em pacientes com doença refratária a hormônios⁷⁶.

O'Hara e colaboradores, em um trabalho recente estudou um painel de 37 diferentes genes expressos por células neoplásicas circulantes em 23 amostras de 9 pacientes com câncer de próstata metastático. Interessantemente os autores perceberam que a expressão gênica variava muito de paciente para paciente, sendo que dentre os genes pesquisados o PSA esteve presente em 20 de 23(87%), o PSMA em 17 de 23 (74%), o receptor androgênico em 16 de 23 (70%), a calicreína humana tipo 2 em 7 de 23 (30%), o receptor do fator de crescimento epidérmico em 4 de 23 (17%). Os únicos marcadores presentes em todas as 23 amostras foram a CK-19 e a mucina-1⁷⁷ Provavelmente o processo de transformação neoplásica leva a alteração na expressão de alguns genes específicos da próstata normal como o PSMA, o PSA e a calicreína. Os resultados deste estudo apontam claramente para a utilidade diagnóstica da detecção da CK-19 em células tumorais circulantes em comparação com outros marcadores considerados como mais específicos para o tecido prostático.

No entanto, quanto procuramos estudos clínicos para a detecção de células circulantes contendo citoqueratinas em pacientes com câncer de próstata, a literatura

é bastante escassa. Nussbaum e colaboradores isolaram células neoplásicas em 2/4 casos de CaP ⁷⁸. Plantz e colaboradores observaram , em amostra de 15 pacientes, uma correlação entre a presença de citoqueratina-18 no sangue periférico e estádio tumoral, grau, positividade de linfonodos, níveis de PSA antes e após cirurgia radical ⁷⁹. Kramer e colaboradores demonstraram que ocorreu importante correlação da expressão da CK-18 no seguimento de pacientes submetidos a bloqueio hormonal, com importantes implicações de prognóstico ⁸⁰. Kaneda e colaboradores foram os primeiros a descreverem a positividade da CK-19 em 3 de 7 pacientes com câncer de próstata ⁸¹. Ainda que tenha sido um estudo com poucos pacientes, todos aqueles que apresentavam CK-19 positiva no sangue periférico eram pacientes com doença metastática, sugerindo a associação deste marcador com os estágios mais avançados da doença.

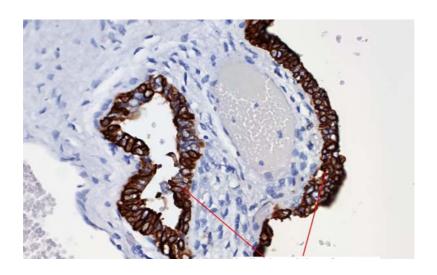
1.5.1) Citoqueratina-19(CK-19)

1.5.1.1) Definição e estrutura química

As citoqueratinas, uma das cinco classes de filamentos protéicos citoplasmáticos, são normalmente expressas em células epiteliais e mesenquimais normais(figura 1). Tumores epiteliais geralmente expressam o filamento intermediário em seu tecido de origem. Os tecido prostático e normal, e com distúrbios proliferativos tanto benignos como malignos expressam uma variedade de citoqueratinas ⁸²

A citoqueratina 19, uma proteína de 40 kDa, é a menor de uma classe denominada de citoqueratinas maiores, e pode ser detectada em tecido através de eletroforese ou através de imunohistoquímica. A citoqueratina 19 (CK-19) é um marcador expresso em uma variedade de epitélios normais e neoplásicos incluindo o tecido prostático ⁸³.

Figura 1. Fotografia de tecido prostático submetido a imunohistoquímica para marcação de citoqueratina. Observar que as células epiteliais da próstata (setas vermelhas) são fortemente marcadas pelo corante, em contraste as células estromais onde não há marcação.



1.5.1.2) CK-19 e próstata

Com relação a análise anatomopatológica, foi demonstrado que existe um padrão heterogêneo de distribuição da CK-19 em tecido prostático humano. Prasad e colaboradores, estudando células de câncer prostático "in vitro", observaram que pode existir uma perda de expressão de CK-19 acompanhada de alterações morfológicas nos pacientes com tumores mais indiferenciados⁸⁴ Entretanto, o seguimento clínico de pacientes com câncer de próstata através da detecção sérica da CK-19 ainda não está estabelecida.

Em contraste com o câncer de mama, onde este marcador tem sido amplamente estudado, foi encontrado apenas 1 pequeno estudo⁸¹ que descreveu a positividade de CK-19 em 3 de 7 pacientes com câncer de próstata, todos com doença metastática. Nenhum estudo prospectivo com maior amostra de pacientes havia sido descrito previamente

1.5.2) Aspectos técnicos da detecção da CK-19 no sangue periférico

1.5.2.1) Técnica de RT-PCR 85

Por esta técnica o DNA pode ser amplificado milhões de vezes, permitindo que um pequeno fragmento específico de DNA seja detectado (figura 2). Pelas características descritas, o método é extremamente sensível e sujeito a resultado falso positivo se ocorrer contaminação por material externo.

A técnica de PCR se baseia na capacidade de uma enzima Taq polimerase manter-se ativa durante altas temperaturas, onde o DNA é desnaturado. Os ingredientes da reação são um fragmento de DNA que se deseja amplificar, a Taq polimerase, nucleotídeos portadores dos 4 tipos de bases nitrogenadas(A,T,C,G) e dois oligonucleotídeos (denominados "primers") que são complementares as duas extremidades (5´ e 3´) do fragmento de DNA que será amplificado.

O material é então submetido a alternância de ciclos térmicos.

Na fase de temperatura elevada o DNA se desnatura.

Com a redução da temperatura, ocorre a hibridização das extremidades do fragmento de DNA com os oligonucleotídeos complementares ao fragmento a ser estudado. Ainda neste momento, o espaço entre dois oligonucleotídeos será preenchido pelos nucleotídeos contidos na reação, utilizando como modelo a fita de DNA original da reação.

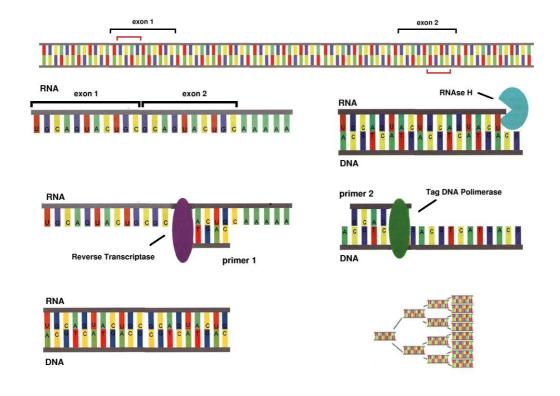
Um novo ciclo térmico se inicia, ocorrendo desta vez a desnaturação de quatro fitas de DNA que servirão como modelo para quatro outros fragmentos quando a temperatura baixar e assim por diante a cada ciclo.

O produto final da reação é uma grande quantidade de DNA amplificado, misturado no preparado com o DNA original que deu base a reação.

O produto final da reação é submetido a separação eletroforética em gel de agarose corado com um ligante do DNA (brometo de etídio). Desta forma obteremos a visualização gráfica da banda correspondente ao peso molecular do fragmento que se amplificou .

Figura 2. Esquema ilustrativo da reação da polimerase em cadeia

(Imagem adaptada da internet - localizada no endereço www.ma.uni-heidelberg.de)



1.5.2.2) Experiência com pesquisa de RT-PCR para CK-19 em pacientes com câncer

Estudos preliminares demonstraram que é possível se detectar células que expressam este antígeno pela técnica de transcrição reversa e polimerase em cadeia (RT-PCR) com uma sensibilidade de 1:10⁶ células⁸⁶ Entretanto, o estudo da expressão do CK-19 através da técnica de RT-PCR sofre críticas pela sua potencial baixa especificidade. Datta e colaboradores, através da técnica de RT-PCR para detecção da expressão de CK-19, detectaram a expressão deste antígeno em câncer de mama⁸⁷. Adicionalmente, Krismann e colaboradores , utilizando a mesma técnica, detectaram a expressão de CK-19 no sangue periférico de 20% dos espécimes dos controles utilizados no seu estudo⁸⁸. A possibilidade da presença de baixos níveis de transcrição ilegítima do antígeno CK-19 pelas células hematopoéticas, detectável por

esta técnica tão sensível, foi aventada para se explicar estes achados não específicos. Uma outra alternativa é que se esteja detectando o produto de um pseudogene o que, entretanto, parece improvável devido aos oligonucleotídeos empregados inicialmente para evitar esta eventualidade⁸⁹.

Demonstramos anteriormente⁹⁰ que a técnica de RT-PCR pode ser melhorada sensivelmente atingindo-se 100% de especificidade se usarmos apenas a primeira das duas etapas de amplificação utilizadas por Datta ⁸⁷ e Krismann ⁸⁸. A técnica, como utilizada por estes autores, consiste em duas etapas. Após extração do RNA total e reação de transcrição para obtenção de cDNA, procede-se a primeira etapa de amplificação à qual se sucede uma etapa subseqüente de amplificação com oligonucleotídeos agora complementares a regiões contíguas e mais internas àquelas flanqueadas pelos oligonucleotídeos primeiramente utilizados ("nested primers").

Ao estudarmos a fração mononuclear do sangue periférico de 52 doadoras de sangue normais utilizando-se apenas a primeira fase da amplificação desta técnica não detectamos a expressão de CK-19 em nenhuma das amostras⁹⁰. Entretanto, na segunda etapa de amplificação da técnica de RT-PCR, detectamos a expressão de CK-19 em 10 das 52 mulheres normais. Paralelamente, determinamos a sensibilidade de cada etapa desta reação através de experimentos com culturas celulares onde diluímos células originadas de carcinoma mamário MCF-7 (controle positivo) em suspensão de células linfoblastóides CEM (controle negativo). Com estes experimentos dilucionais, demonstramos que ambas as etapas da reação conseguem atingir uma sensibilidade de 10⁻⁶, ou seja, detectam 1 célula MCF-7 em 10⁶ células CEM. Concluímos, portanto que, naquele estudo a execução apenas da primeira etapa da reação permitiu que se detectasse a expressão de CK-19 na fração mononuclear do sangue periférico com uma especificidade de 100%. Desta maneira, poderia se prescindir da segunda etapa da reação de RT-PCR, abrevia-se ainda o tempo necessário para a execução da técnica, tornando-a, portanto, mais simples⁹⁰.

Em um outro estudo desta linha de pesquisa, Manhani e colaboradores avaliaram prospectivamente 53 pacientes com carcinoma de mama⁹¹. Observaram inicialmente que a primeira dosagem realizada antes do tratamento cirúrgico quando negativa relacionou-se significativamente com a presença de margens livres na avaliação anatomo-patológica da peça. Foi verificado também durante o seguimento que a negatividade de CK-19 correlacionou-se com a resposta à quimioterapia 3 meses após o inicio do tratamento e que houve uma tendência a negativação do

marcador durante o tratamento quimioterápico. Os autores concluem que os resultados são encorajadores, sendo necessários estudos adicionais para determinar o papel da aplicação do marcador no acompanhamento de pacientes com carcinoma mamário⁹¹.

2. OBJETIVOS

- 1) Verificar a expressão sérica da CK-19 em indivíduos considerados como controles do sexo masculino;
- 2)Analisar a expressão de CK-19 na fração mononuclear do sangue periférico de pacientes com câncer de próstata antes do início e durante o tratamento instituído para avaliar se esta se correlaciona com reconhecidos fatores de prognóstico nesta doença .

3. MÉTODOS

3.1) Critérios de inclusão e exclusão

O desenho e a metodologia empregada neste estudo foram definidos no ano de 2001.

Inicialmente planejamos incluir 10 pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna com indicação cirúrgica e níveis séricos de PSA< 2ng/ml em coleta única como grupo controle do sexo masculino.

Todos os pacientes com câncer de próstata candidatos a inclusão no estudo foram submetidos a confirmação anatomo-patológica através de biópsia prostática com 12 fragmentos realizada segundo condições técnicas padronizadas em nosso serviço⁹²⁻⁹⁵. Após o esclarecimento sobre os objetivos e procedimentos do estudo, selecionamos 44 pacientes (21 com doença localizada e 23 com doença metastática) consecutivos com câncer de próstata sem tratamento prévio, independentemente das características do tumor ou do nível sérico de PSA.

Todos os 54 indivíduos da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa institucional.

Foram excluídos os pacientes que não aceitaram participar ou aqueles considerados como não confiáveis para o seguimento proposto.

3.2) Obtenção de dados patológicos e clínicos

Em nossa Instituição, todos os exames anátomo-patológicos oriundos dos Hospitais de Ensino são rotineiramente remetidos ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Fundação ABC onde são submetidos a avaliação anátomo-patológica padronizada⁹². Foi adotado o escore de Gleason como avaliação da graduação tumoral⁷.

A avaliação clínica de todos os pacientes foi realizada pessoalmente pelo pesquisador e sua equipe, através de ficha previamente estabelecida e padronizada. A conduta terapêutica foi instituída de acordo com um protocolo institucional através das diversas opções possíveis para cada caso.

3.3) Tratamento e acompanhamento ambulatorial

Todos os pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado foram submetidos a prostatectomia radical e os pacientes com doença metastática receberam tratamento com orquiectomia subcapsular ou Gosserrelina 10,8mg a cada 3 meses. As coletas de sangue(20ml) foram realizadas por venopunção periférica antes do início do tratamento e durante o seguimento destes pacientes, a intervalos de 3 meses por 18 meses. Nos pacientes operados, a primeira coleta pós-operatória foi realizada num período mínimo de 30 dias após a cirurgia.

O acompanhamento foi realizado trimestralmente através de consulta clínica e dosagem do PSA para todos os pacientes. O nível de PSA foi medido através de ensaio imunoenzimático (Abbott laboratories, Abbott Park, IL). Nos pacientes com doença metastática também foram obtidas dosagens de testosterona, fosfatase alcalina e hemograma completo trimestralmente e estudos de avaliação por imagem (RX do tórax, tomografia do abdômen total e cintilografia óssea) a cada 6 meses ou quando se suspeitava de progressão da doença. Uma boa resposta ao tratamento foi definida como nível sérico de PSA menor do que 0,2ng/ml nos pacientes submetidos a cirurgia radical ou um nadir menor do que 4ng/ml nos pacientes com doença metastática. Consideramos como resposta ao tratamento para os pacientes com doença mensurável bidimensional em partes moles a) resposta completa: desaparecimento de todas as lesões sem o aparecimento de novas lesões b) resposta partial: redução de pelo menos 50% nos maiores diâmetros sem qualquer outra nova lesão detectada, c) resposta mínima, doença estável ou progressão foram considerados como ausência de resposta para fins deste estudo⁹¹.

A progressão do PSA após o tratamento foi definida como uma elevação qualquer a partir de um PSA basal >0,2ng/ml que tenha sido confirmada por qualquer elevação nas 2 dosagens sequenciais²³. Foi considerado como tempo para progressão do PSA o intervalo de tempo em meses da entrada no estudo até a primeira das 3 dosagens que resultaram no diagnóstico de progressão.

3.4) Técnicas de biologia molecular

3.4.1) Separação do RNA e síntese do cDNA pela técnica de RT-PCR

Para a obtenção do botão de células mononucleares, foi adicionado aos 20 ml de sangue periférico, igual volume do tampão de lise de glóbulos vermelhos (1 mM NH₄HCO₃; 14 mM NH₄CI). A solução então foi acondicionada em gelo e submetida à agitação constante durante 30 minutos. Após, a solução era submetida à centrifugação em temperatura ambiente durante 30 minutos. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o botão de células mononucleares estará pronto para posterior utilização.

Todas as soluções utilizadas para extração de RNA eram tratadas previamente com 0,1% Dietil Pirocarbonato (DEPC) (Sigma, St. Louis, MO).

O botão foi então ressuspenso em 1ml de TRIZOLTM reagente (GIBCO-BRL, Life Technologie, Gaithersburg, MA), incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo adicionado 200 ml de clorofórmio. Após breve agitação as amostras eram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante era separado e precipitado com isopropanol. Ao redor de 60% do volume é mantido em banho de gelo por 30 minutos. Após esse período, a amostra era novamente centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante era descartado e o botão lavado com etanol 70%, brevemente seco e ressuspenso em 100ml de H₂O tratada com DEPC e estocado a - 70 ° C até posterior processamento.

A concentração de RNA foi determinada através da utilização do espectrofotômetro GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia, LKB Biotechnology, Sweden) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foram utilizados somente preparados de RNA com relação A₂₈₀/A₂₆₀ igual a 0,5.

3.4.2) Estudo da Expressão de CK-19

O estudo da expressão de CK-19 foi realizada através da técnica denominada RT-PCR, onde utilizou-se a transcriptase reversa e posteriormente a reação de polimerase em cadeia (PCR). Nesta técnica, utilizamos o gene GAPDH e rRNA como controle interno de amplificação para determinar a integridade do RNA e também como fator de correção da quantidade de cDNA para cada amostra. Um micrograma de RNA total foi utilizado na síntese de DNA complementar (cDNA) através da utilização da enzima Superscript II Rnase II transcriptase reversa (GIBCO-BRL Life Technologie, Gaithersburg, MA). Ao RNA era adicionado 100 pmoles de uma solução de oligo dT e acrescentado água tratada com DEPC até completar o volume de 12ml. A reação era aquecida a 70°C durante 10 minutos e logo depois esfriada em gelo. Posteriormente eram adicionado os seguintes reagentes para um volume final de 20ml :10x tampão da enzima (fornecida pelo fabricante) , 0,1 M dithiothreitol, 500 mM de cada um dos deoxinucleosídeos, 200 unidades de Superscript II. A reação era processada a 42 oC durante 1 hora.

Os primers utilizados para a amplificação de CK-19, GAPDH e rRNA foram: CK-19 senso, 5' AAG CTA ACC ATG CAG AAC CTC ACG ACC GC 3'; antisenso, 5' TTA TTG GCA GGT CAG GAG AAG AGC C 3'; GAPDH senso, 5' ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG 3'; antisenso, 5' CAT ACC AGG AAA TGA GCT TG 3' e rRNA senso 5' GTC TGT GAT GCC CTT AGA TG e antisenso 3' AGC TTA TGA CCC GCA CTT AC. O volume total da reação de PCR foi de 25ml e consistia de : 2 a 5ml do cDNA, 5pmoles de cada um dos primers senso e os primers antisenso para CK-19, GAPDH e RRNA, 200mM de cada um dos deoxinucleosídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5ml do tampão da enzima, 2 unidades de Taq polimerase. As reações foram preparadas separadamente para cada um dos genes e submetidas à amplificação simultaneamente no mesmo termociclador (DNA Engine-PTC 200, MJ Research). A amplificação era realizada com 35 ciclos que consistirão de 50 segundos de desnaturação a 94 °C e 90 segundos de anelamento e extenção a 72 °C. Após a amplificação 5ml do produto resultante da amplificação era submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% com voltagem de 100 V e corado com brometo de etídio (10 mg/ml) para posterior

visualização. Os fragmentos esperados são de 1069 pb e 200 pb para os genes CK-19, GAPDH e rRNA respectivamente.

Neste estudo, a expressão de CK-19 foi interpretada como presente ou ausente. Os resultados foram documentados através da fotografia do gel (Polaroid Foto Documentation Camera).

Como controle de qualidade, todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados deveriam ser coincidentes em pelo menos 2 das 3 amostras medidas para inclusão na análise dos dados. Os resultados da expressão de CK-19 foram obtidos pela equipe do laboratório de biologia molecular de maneira mutuamente cega, não havendo qualquer influência dos resultados obtidos na conduta terapêutica instituída .

3.5) Metodologia estatística

3.5.1) Cálculo da amostra

Como o nosso objetivo foi explorar a avaliação da expressão de CK-19 nesta população de pacientes e na literatura não havia relato de estudo nesta área, não tinhamos dados preliminares que nos permitissem calcular o número mínimo de pacientes necessário para se detectar diferenças estatisticamente significativas entre aqueles que expressam ou não CK-19 em relação as demais variáveis analisadas.

3.5.2) Testes aplicados 96

Na avaliação de variáveis categóricas foram utilizados os testes de quiquadrado e exato de Fisher.

O teste para análise de variância (ANOVA) foi utilizado quando o objetivo foi correlacionar variáveis contínuas e categóricas.

Para a análise gráfica de sobrevida livre de eventos entre os grupos que apresentavam CK-19 positivo e negativo foi empregado o teste de Peto-Wilcoxon.

Análise multivariada não foi realizada devido ao tamanho da amostra.

4. RESULTADOS

4.1) Pacientes do grupo controle

Dez pacientes foram selecionados para inclusão no grupo controle.

A idade média dos indivíduos era 70anos(60-85 anos). Cinco pacientes eram de raça branca e 5 pacientes eram de raça negra/afro-descendentes. O tamanho médio da próstata foi de 40g(25-65g) e o nível sérico médio de PSA foi de 1,3 ng/ml(0,5-1,9 ng/ml).

Nenhum dos pacientes apresentou expressão do transcrito da CK-19 na fração leucocitária do sangue periférico (figura 3).

4.2) Pacientes com câncer de próstata

Foram incluídos 44 pacientes com média de idade de 74 anos(57-95), dos quais foram obtidas 210 amostras de sangue. Vinte e um pacientes (47,7%) foram classificados como estadio de I a III e 23 (52,3%) pertenciam ao estádio IV. Nove pacientes (20%) tinham escore de Gleason bem diferenciado (2 a 6); 20 (44,5%) tinha escore 7(moderadamente diferenciado) e 15 (35,6%) tinham escore indiferenciado (8 a 10) (tabela 1).

Tabela1. Dados demográficos de 44 pacientes com adenocarcinoma de próstata incluídos no estudo para a expressão do transcrito da citoqueratina 19 na fração mononuclear do sangue periférico.

Idade(anos)	57-95(74)
Estádio clínico	
I	2(4,5%)
II	11(25,5%)
III	8(17,7%)
IV	23(52,3%)
Escore de Gleason	
Bem diferenciado (2-6)	9(20%)
Moderadamente diferenciado(7)	20(44,5%)
Indiferenciado(8-10)	15(35,6%)

O tempo mediano de seguimento foi de 18 meses (0-18). Dados de 4 pacientes que tiveram apenas uma única amostra coletada foram avaliados para a correlação entre a expressão de CK-19 e as variáveis clinicas e patológicas por ocasião do diagnóstico, sendo excluídos dos cálculos para o tempo de progressão.

Dos 44 pacientes com câncer de próstata (6 com doença clinicamente localizada e 9 com doença metastática) apresentaram alguma dosagem com expressão do transcrito da CK-19 (tabela 2). A figura 4 ilustra o curso clínico de um paciente que apresentava expressão positiva de CK-19 na entrada do estudo e que se tornou negativa no transcorrer do seguimento.

Figura 3 : Painel superior(A): RT-PCR para CK-19; painel inferior(B): controle com GADPH mostrando a integridade do material testado. Da direita para a esquerda: coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2- controle negativo, colunas de 3 a 12 representadas por homens com PSA< 2ng/ml (controles) e na coluna 13 o controle positivo (célula da linhagem MCF-7).

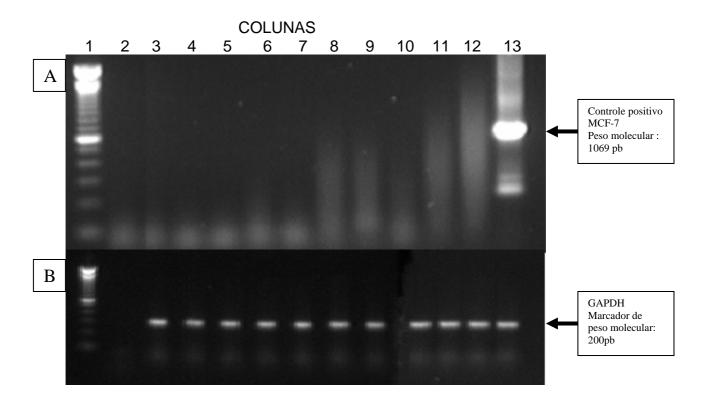
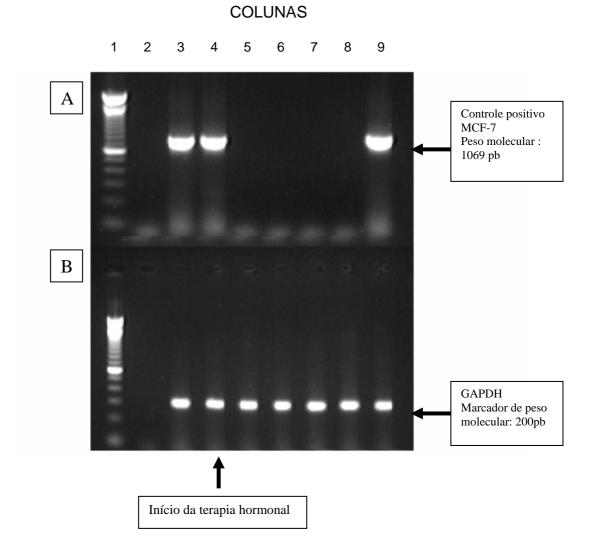


Figura 4 : Painel superior(A): RT-PCR para CK-19; painel inferior(B): controle com GADPH mostrando a integridade do material testado . Da direita para a esquerda:coluna 1- marcador de peso molecular, coluna 2- controle negativo, colunas de 3 a 8 - amostras seriadas de um único pacientes com câncer de próstata que apresentou expressão do transcrito da CK-19 nas duas primeiras amostras e que passou a não expressa-lo após a terapia hormonal. Na coluna 9 observamos o controle positivo (célula da linhagem MCF-7).



Não houve qualquer correlação entre a positividade para CK-19 na entrada do estudo e as variáveis clínicas como o escore de Gleason (p=0,20) e estadio clínico(p=0,40)(tabela 2).

Tabela 2. Associação entre a positividade da citoqueratina 19(CK-19) na fração mononuclear do sangue periférico e as principais variáveis clinicas de prognóstico no momento da inclusão no estudo.

Variável	CK-19	CK-19	x ²	р
Estadio				
I-III	6	14		
IV	9	15	0,70	0,40
Gleason				
2-7	7	15		
8-10	8	14	1,57	0,21

O mesmo ocorreu quando foram estudadas as dosagens de PSA (p=0,95), DHL (p=0,50), hemoglobina (p=0,24), fosfatase alcalina (p=0,27) e testosterona (p=0,67) (tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância relacionando a expressão de citoqueratina 19(CK-19) na fração nuclear do sangue periférico e as dosagens laboratoriais na primeira dosagem do estudo.

Variáveis	CK-19	CK-19	р
(valores em média)	expresso	não expresso	
PSA	24,46	23,46	0,95
DHL	273,30	318,33	0,24
Testosterona	272,62	225,61	0,50
Fosfatase alcalina	217,18	175,69	0,27
Hemoglobina	14,20	14,36	0,67

Não houve, também, correlação significativa entre a positividade de CK-19 em pelo menos uma amostra no seguimento e o escore de Gleason (p=0,33) e o estadio clínico (p=0,71). As dosagens seriadas de DHL($X^2=0,96$ p=0,65), hemoglobina (p=0,66), fosfatase alcalina (p=0,58) e testosterona (p=0,09) também não estavam relacionadas a presença de positividade do marcador em pelo menos uma amostra durante o período do estudo. (tabela 4).

Tabela 4. Correlação de pelo menos 1 dosagem de citoqueratina 19(CK-19) no seguimento e as variáveis clínicas e laboratorias aferidas durante todo o período do estudo.

Variáveis	x ²	р
Estadiamento	0,13	0,71
Escore de Gleason	0,93	0,33
Hemoglobina	0,95	0,66
Fosfatase alcalina	0,30	0,58
DHL	0,96	0,65
	·	
Testosterona	2,85	0,09

Em 27 ocasiões ocorreu uma progressão do PSA, 13 eventos em pacientes submetidos a cirurgia com intuito curativo e 14 em pacientes com doença metastática recebendo tratamento hormonal. A presença de pelo menos um resultado positivo para CK-19 no seguimento se correlacionou significativamente com um menor tempo para progressão do PSA (p=0.049), especialmente no subgrupo de pacientes com doença metastática (p=0.032). No subgrupo de pacientes com doença localizada não foi observada diferença estatisticamente significativa(p=0.082) (figuras 5, 6 e 7).

Figura 5: Intervalo para progressão do PSA para todos os pacientes que apresentavam pelo menos 1 teste positivo para CK-19 (linha vermelha) comparados aos que apresentaram todos os resultados negativos (linha azul) (p = 0.049).

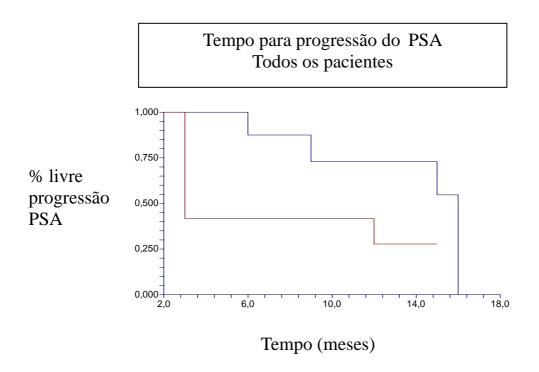


Figura 6: Intervalo até a progressão do PSA para os pacientes com doença localizada com pelo menos uma dosagem positiva para CK-19 (linha vermelha) e os todos os demais com resultados negativos (linha azul) (p = 0. 082).

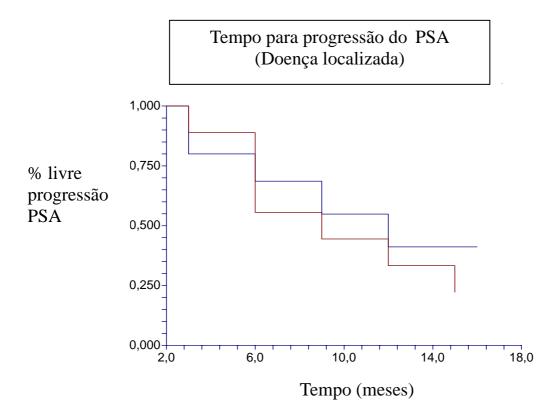
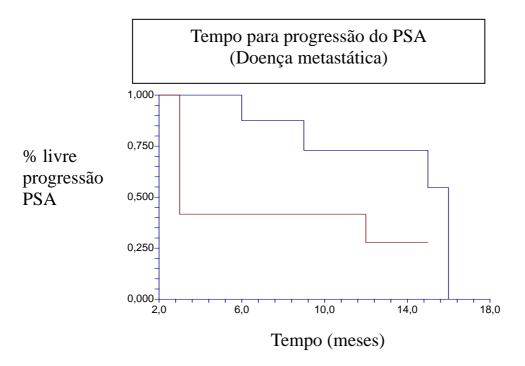


Figura 7: Intervalo até a progressão do PSA para os pacientes com doença metastática com pelo menos uma dosagem positiva para CK-19 (linha vermelha) e os todos os demais com resultados negativos (linha azul) (p = 0.032).



Neste curto período de seguimento ocorreram poucos eventos clínicos (4 progressões e 2 progressões seguidas de morte), todas no grupo de pacientes com doença metastática, o que não permitiu que uma análise estatística pudesse ser realizada com base nestes eventos.

5. DISCUSSÃO

O câncer de próstata é a neoplasia maligna mais comum e a segunda causa de óbito por câncer em homens nos Estados Unidos. Um maior acesso aos serviços de saúde e o advento do antígeno prostático específico (PSA) a partir dos anos 80 ocasionaram um importante aumento na detecção de pacientes com doença localizada por ocasião do diagnóstico. Apesar destes dados é ainda freqüente a detecção de casos avançados ao diagnóstico.

O PSA sérico, além de seu valor diagnóstico, é extremamente importante para o seguimento após as diversas modalidades terapêuticas que podem ser instituídas, tanto para doença localizada como para a avançada. A elevação sérica do PSA após o tratamento inicial tem sido considerado o principal critério preditivo de progressão clínica e de sobrevida livre de eventos.

Todo o armamentário empregado no diagnóstico e no estadiamento do câncer de próstata, incluindo o exame digital, a dosagem sérica do PSA, a tomografia computadorizada e a cintilografia óssea são insuficientes para determinar a real extensão da doença. Até 30 % dos pacientes operados com intuito curativo, ou seja, considerados como tendo tumores localizados na avaliação para estadiamento inicial, têm algum grau de disseminação representada por margens cirúrgicas positivas, invasão de vesículas seminais ou gânglios positivos na avaliação da peça cirúrgica ⁹⁷. Com as informações obtidas a partir do estadiamento clínico, da graduação tumoral e do valor sérico do PSA podem também ser construídos modelos estatísticos de regressão logística ou de redes neurais, que estimam a probabilidade do paciente apresentar recidiva bioquímica ou progressão da doença no seguimento ¹⁶⁻¹⁸. Existe, no entanto, importantes limitações para a mudança de proposta terapêutica baseada nestes nomogramas.

Quando existe extensão extraprostática, a chance de falha terapêutica com o tratamento local isolado é maior que 50%, justificando-se terapêuticas de associação para melhorar os resultados⁹⁸. A busca de novos métodos para melhorar o diagnóstico e identificar de maneira eficiente estes pacientes tem sido amplamente investigada.

Uma das alternativas para refinar nossa capacidade prognóstica nesta doença é a detecção sérica de células neoplásicas na corrente circulatória, o que alguns autores tem denominado de "estadiamento molecular". Uma vantagem incontestável desta tecnologia seria a facilidade e ampla disponibilidade para a obtenção de amostras sanguíneas. A detecção destes antígenos no sangue de pacientes com neoplasias epiteliais seria considerada como evidência da presença de células neoplásicas além dos limites do tumor primário. A maior crítica destas técnicas reside na sua baixa especificidade, uma vez que a presença de células epiteliais circulantes não obrigatoriamente representariam células neoplásicas circulantes. Alguns estudos têm rebatido estas críticas, mostrando que 75-100% destas células isoladas têm genótipo aberrante, compatíveis com a origem do tumor primário⁹⁹.

É possível que as implicações da detecção de doença residual mínima por técnicas sensíveis como o PCR variem de acordo com o tipo de tumor e o momento da história natural no qual se constata a sua presença . Alguns estudos têm mostrado resultados promissores em câncer de mama e de pulmão⁸⁷⁻⁸⁸. Manhani e colaboradores et al demostraram que em pacientes com câncer de mama houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão sérica de CK-19 e margens positivas e a resposta subseqüente ao tratamento quimioterápico⁹¹. Para o câncer de próstata os resultados são ainda bastante controversos. O principal método empregado é o RT-PCR para detecção de células que expressam PSA e o PSMA .

O presente estudo apresenta alguns pontos positivos quando comparado aos previamente publicados referente ao estadiamento molecular do câncer de próstata.

A primeira diferença essencial consiste na dosagem seriada juntamente com a mensuração do PSA sérico durante todo o período de seguimento clínico dos pacientes. Os trabalhos previamente descritos consideram apenas a medida préoperatória do PCR como fator de avaliação da recidiva bioquímica.

Um outro ponto interessante é considerar que diferentemente do que ocorre com a expressão do PSA e do PSMA, parece que a expressão da CK-19 sem mantém presente e não se altera durante o processo de transformação neoplásica ou na vigência de terapia hormonal⁷⁷. Esta fato provavelmente favorece a detecção da CK-19 em pacientes com doença metastática quando comparada aos marcadores tidos como mais específicos do tecido prostático. A expressão do PSA e do PSMA podem ser perdidas em até 30 % das células circulantes⁷⁷, podendo gerar resultados falso negativos para a presença de disseminação no sangue.

Em nosso estudo, observamos uma correlação da expressão de CK-19 com o tempo para recidiva bioquímica quando considerados em conjunto os pacientes com doença localizada e avançada. No grupo específico de pacientes submetidos a

cirurgia radical, a diferença não foi estatisticamente significante, provavelmente devido ao pequeno número de eventos num tempo de seguimento curto. Um maior tempo para avaliação final dos resultados será necessário para os pacientes com doença clinicamente localizada.

Nos pacientes com doença avançada recebendo hormonioterapia, além da melhora clínica nos pacientes sintomáticos, a redução dos níveis de PSA é o principal fator de avaliação de resposta a terapia instituída. A elevação seriada do PSA em pacientes submetidos a terapia hormonal representa progressão bioquímica, que freqüentemente se antecipa a progressão clínica mensurável da doença. O intervalo livre de progressão bioquímica após terapia hormonal nos pacientes com doença metastática é importante fator de maior sobrevida nestes pacientes. Nossos resultados demonstram claramente que a detecção sérica de pelo menos 1 dosagem de CK-19 foi preditiva para um tempo de progressão bioquímica significativamente menor do que os pacientes que não a expressaram no sangue periférico. Isto demonstra o valor biológico deste marcador em pacientes recebendo terapia hormonal, sendo possível selecionar pacientes com uma maior agressividade do tumor. Como a expressão de CK-19 não se correlacionou ao estádio clínico, grau de Gleason e dosagem sérica do PSA, acreditamos que esta pode ser uma variável de comportamento independente. A pequena amostra de pacientes não nos permitiu demonstrar estatisticamente esta impressão. Corroborando esta nossa impressão, Kantoff e colaboradores demostraram que a expressão por RT-PCR para PSA no sangue periférico foi um fator biológico independente de outros fatores que estão relacionados a massa tumoral em pacientes com doença refratária a terapia hormonal⁷⁵.

No entanto, o estudo realizado também apresenta algumas limitações que devem ser consideradas: 1) a pequena amostra de pacientes incluídos dificulta a aplicação de análise multivariada; 2) O pequeno número de eventos clínicos em virtude do seguimento curto não permitem conclusões definitivas quanto ao valor prognóstico do marcador estudado; 3) No desenho da metodologia do estudo (2001) foi utilizado o controle interno de qualidade do material testado com GADPH, que apresenta pseudogenes conhecidos e descritos em 2003¹⁰⁰, período em que a maior parte das amostras já haviam sido testadas.

Como perspectiva futura de avanço técnico, vem sendo utilizada a técnica de RT-PCR em tempo real, o que permite avaliar de forma quantitativa o número de cópias gênicas que estão sendo amplificadas. Alguns estudos tem mostrado claramente que é possível separar melhor pacientes do grupo controle ou com doença localizada daqueles com câncer de próstata avançado, no sentido de melhorar a especificidade da técnica¹⁰¹⁻¹⁰⁵.

Estudos com maior número de pacientes e um seguimento a longo prazo, além do emprego da tecnologia de RT-PCR em tempo real, poderão assim definir melhor o papel destas novas técnicas para detecção de doença micrometastática para a avaliação prognóstica e acompanhamento de pacientes com câncer de próstata.

6. CONCLUSÕES

- 1) Não houve expressão do transcrito da CK-19 por RT-PCR na fração mononuclear do sangue periférico em pacientes do grupo controle;
- 2) Nos pacientes com câncer de próstata não houve correlação entre a expressão do transcrito da CK-19 na entrada do estudo e as principais variáveis clínicas e patológicas de valor prognóstico. A presença de pelo menos uma dosagem positiva para CK-19 no seguimento dos pacientes se correlacionou com um menor tempo para recidiva bioquímica, especialmente no subgrupo de pacientes com doença metastática tratados com hormonioterapia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000.
 CA Cancer J Clin. 2000;50(1):7-33.
- Galper SL, Chen MH, Catalona WJ, Roehl KA, Richie JP, D'Amico AV. Evidence to support a continued stage migration and decrease in prostate cancer specific mortality. J Urol. 2006;175(3 Pt 1):907-12.
- Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. J Natl Cancer Inst. 2005;97(19):1407-27.
- 4. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2006. Site do Instituto Nacional do Câncer(INCA), endereço na web http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=339
- 5. Wrocławski ER e Tobias-Machado M. Câncer de Próstata: aspectos epidemiológicos e diagnósticos. Ed Lemos Editorial, 2001.
- Allsbrook WC Jr, Mangold KA, Johnson MH, Lane RB, Lane CG, Amin MB, Bostwick DG, Humphrey PA, Jones EC, Reuter VE, Sakr W, Sesterhenn IA, Troncoso P, Wheeler TM, Epstein JI. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: urologic pathologists. Hum Pathol. 2001;32(1):74-80.
- 7. Bostwick DG, Qian J, Schlesinger C. Contemporary pathology of prostate cancer. Urol Clin North Am. 2003;30(2):181-207
- 8. D'Amico AV, Hui-Chen M, Renshaw AA, Sussman B, Roehl KA, Catalona WJ. Identifying men diagnosed with clinically localized prostate cancer who are at high risk for death from prostate cancer. J Urol. 2006;176(6 Pt 2):S11-5.
- 9. Aus G, Abbou CC, Bolla M, Heidenreich A, Schmid HP, van Poppel H, Wolff J, Zattoni F; European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Eur Urol. 2005;48(4):546-51.
- 10. Yokomizo A, Murai M, Baba S, Ogawa O, Tsukamoto T, Niwakawa M, Tobisu K, Kinukawa N, Naito S. Percentage of positive biopsy cores, preoperative prostate-specific antigen (PSA) level, pT and Gleason score as predictors of

- PSA recurrence after radical prostatectomy: a multi-institutional outcome study in Japan. BJU Int. 2006;98(3):549-53.
- 11. Bill-Axelson A, Holmberg L, Ruutu M, Haggman M, Andersson SO, Bratell S, Spangberg A, Busch C, Nordling S, Garmo H, Palmgren J, Adami HO, Norlen BJ, Johansson JE; Scandinavian Prostate Cancer Group Study No. 4. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. N Engl J Med. 2005; 12; 352(19):1977-84.
- 12. Wroclawski, ER e Tobias-Machado, M. Elevação do PSA após prostatectomia .
 In: Guia Prático de Urologia da SBU. Ed: Eric Roger Wroclawski, Editora Segmento, Rio de Janeiro; 2003, pp. 491-493.
- 13. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. JAMA. 1999 5; 281(17):1591-7.
- 14. Shah J, Khaksar SJ, Sooriakumaran P. Management of prostate cancer. Part 3: metastatic disease. Expert Rev Anticancer Ther. 2006;6(5):813-21
- 15. George DJ and Kantoff PW. Prognostic indications in hormone refractory prostate cancer. Urol Clin North Am. 26 (2):303-310, 2000.
- Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD.
 Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. Urology. 2001;58(6):843-8.
- 17. Chun FK, Karakiewicz PI, Briganti A, Gallina A, Kattan MW, Montorsi F, Huland H, Graefen M. Prostate cancer nomograms: an update. Eur Urol. 2006;50(5):914-26
- 18. Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, Bianco FJ Jr, Dotan ZA, Fearn PA, Kattan MW. Preoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. J Natl Cancer Inst 2006;98(10):715-7.
- 19. Mitchell RE, Desai M, Shah JB, Olsson CA, Benson MC, McKiernan JM. Preoperative serum prostate specific antigen remains a significant prognostic variable in predicting biochemical failure after radical prostatectomy. J Urol 2006;175(5):1663-7
- 20. Loeb S, Gonzalez CM, Roehl KA, Han M, Antenor JA, Yap RL, Catalona WJ. Pathological characteristics of prostate cancer detected through prostate specific antigen based screening. J Urol. 2006;175(3 Pt 1):902-6.

- 21. Nelson BA, Shappell SB, Chang SS, Wells N, Farnham SB, Smith JA Jr, Cookson MS. Tumour volume is an independent predictor of prostate-specific antigen recurrence in patients undergoing radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. BJU Int. 2006;97(6):1169-72.
- 22. Brassell SA, Kao TC, Sun L, Moul JW. Prostate-specific antigen versus prostate-specific antigen density as predictor of tumor volume, margin status, pathologic stage, and biochemical recurrence of prostate cancer. Urology. 2005;66(6):1229-33.
- 23. American Urological Association. Prostate specific antigen (PSA) best practice policy. Oncology (Willston Park). 2000, 14:267-280.
- 24. Moul JW. Treatment of PSA only recurrence of prostate cancer after prior local therapy. Curr Pharm Des. 2006;12(7):785-98.
- 25. D'Amico AV, Chen MH, Roehl KA, Catalona WJ. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. N Engl J Med. 2004;351(2):125-35.
- 26. Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, Partin AW. Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. JAMA. 2005;294(4):433-9.
- 27. Horwitz EM, Vicini FA, Ziaja EL, Dmuchowski CF, Stromberg JS, Martinez AA. The correlation between the ASTRO Consensus Panel definition of biochemical failure and clinical outcome for patients with prostate cancer treated with external beam irradiation. American Society of Therapeutic Radiology and Oncology. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1998;41(2):267-72.
- 28. Lu-Yao G, Moore DF, Oleynick J, Dipaola RS, Yao SL. Use of hormonal therapy in men with metastatic prostate cancer. J Urol. 2006;176(2):526-31.
- Leibovici D, Spiess PE, Agarwal PK, Tu SM, Pettaway CA, Hitzhusen K, Millikan RE, Pisters LL. Prostate cancer progression in the presence of undetectable or low serum prostate-specific antigen level. Cancer. 2007. 15; 109(2):198-204.
- 30. Debruyne FMJ, Eisenberger MA, Fourcade R et al. New Therapeutic and treatments for metastatic prostate cancer. In: McConnell, Denis L, Akasa H, Khouri S and Schalken J. 6nd International Consultation on New Developments in Prostate Cancer and Prostatic Diseases. WHO/UICC. Plumbridge Distribution LTD, United Kingdom, 2006, chapter 10, pp 309-345.

- 31. Isaacs JT. The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? Urol Clin North Am. 1999;26(2):263-73.
- 32. Lucas A, Petrylak DP. The case for early chemotherapy for the treatment of metastatic disease. J Urol. 2006;176(6 Pt 2):S72-5.
- 33 Grasso YZ, Gupta MK, Levin HS, Zippe CD, Klein EA: Combined nested RT-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in prostate cancer patients: correlation with pathological stage. Cancer Res 1998; 58: 1456-1459.
- 34. Schmidt B, Anastasiadis AG, Seifert HH, Franke KH, Oya M, Ackermann R: Detection of circulating prostate cells during radical prostatectomy by standardized PSMA RT-PCR: association with positive lymph nodes and high malignant grade. Anticancer Res 2003; 23: 3991-3999.
- 35. Seiden MV, Kantoff PW, Krithivas K, Propert K, Bryant M, Haltom E et al.: Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. J Clin Oncol 1994; 12: 2634-2639.
- 36. Shariat SF, Kattan MW, Song W, Bernard D, Gottenger E, Wheeler TM et al.: Early postoperative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy. Cancer Res 2003; 63: 5874-5878.
- 37. Shariat SF, Gottenger E, Nguyen C, Song W, Kattan MW, Andenoro J et al.: Preoperative blood reverse transcriptase-PCR assays for prostate-specific antigen and human glandular kallikrein for prediction of prostate cancer progression after radical prostatectomy. Cancer Res 2002; 62: 5974-5979.
- 38. Bianco FJ, Jr., Powell IJ, Cher ML, Wood DP, Jr.: Presence of circulating prostate cancer cells in African American males adversely affects survival. Urol Oncol 2002; 7: 147-152.
- 39. Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A, Zhang ZF, Rosai J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. J Clin Oncol. 1995;13(5):1195-200.

- 40. Mejean A, Vona G, Nalpas B, Damotte D, Brousse N, Chretien Y et al.: Detection of circulating prostate derived cells in patients with prostate adenocarcinoma is an independent risk factor for tumor recurrence. J Urol 2000; 163: 2022-2029.
- 41. Thiounn N, Saporta F, Flam TA, Pages F, Zerbib M, Vieillefond A et al.: Positive prostate-specific antigen circulating cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction does not imply the presence of prostatic micrometastases. Urology 1997; 50: 245-250.
- 42. Lintula S, Stenman UH: The expression of prostate-specific membrane antigen in peripheral blood leukocytes. J Urol 1997; 157: 1969-1972.
- 43. Koutsilieris M, Lembessis P, Luu-The V, Sourla A: Repetitive and site-specific molecular staging of prostate cancer using nested reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen and prostate specific membrane antigen. Clin Exp Metastasis 1999; 17: 823-830.
- 44. Hara N, Kasahara T, Kawasaki T, Bilim V, Tomita Y, Obara K et al.: Frequency of PSA-mRNA-bearing cells in the peripheral blood of patients after prostate biopsy. Br J Cancer 2001; 85: 557-562.
- 45. Llanes L, Ferruelo A, Paez A, Gomez JM, Moreno A, Berenguer A: The clinical utility of the prostate specific membrane antigen reverse-transcription polymerase chain reaction to detect circulating prostate cells: an analysis in healthy men and women. BJU Int 2002; 89: 882-885.
- 46. Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Br J Cancer. 1995;71(2):278-81.
- 47. Pantel K, von Knebel Doeberitz M. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. Curr Opin Oncol. 2000 Jan;12(1):95-101.
- 48. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. Clin Cancer Res 2004;10:8152-8162.
- 49. Racila E, Euhus D, Weiss AJ et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. Proc Natl Acad Sci 95:4589-4594, 1998.

- 50. Tibbe AG, Miller MC, Terstappen LW. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. Cytometry A. 2007 Jan; [Epub ahead of print]
- 51. Bartek J, Bartkova J, Scheneider J, Taylor-Papadimitriou J, Kovarik J, Rejthar A. Expression of monoclonal antibody-defined epitopes of keratin 19 in human tumours and cultured cells. Eur J Cancer Clin Oncol 1986; 22:1441-1452.
- 52. Schamhart DH, Maiazza R, Kurth KH. Identification of circulating prostate cancer cells: a challenge to the clinical implementation of molecular biology. Int J Oncol. 2005;26(3):565-77.
- 53. Pujol JL, Grenier J, Davies JP et al. Serum fragment of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer. Cancer Research 1993; 53:61-66.
- 54. Braun S, Pantel K, Muller P et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. N Engl J Med 342:525-533, 2000.
- 55. Soares HP, Del Giglio A, Clark O, Kumar A, Djulbegovic B. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in the peripheral blood of women with breast cancer: A meta-analysis. Proc Am Soc Clin Oncol 2004; 22: 878.
- 56. Fields KK, Elfbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE, Moscinski LC. Clinical significance of bone marrow metastasis using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. J Clin Oncol 14: 1868-1876,1996.
- 57. Harbeck N, Untch M, Pache L, Eierman W. Tumour cell detection in the bone marrow of cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow up. Br J Cancer 1994; 69: 566-571.
- 58. Corey E, Corey MJ. Detection of disseminated prostate cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): technical and clinical aspects.
 - Int J Cancer. 1998;77(5):655-73.

- 59. Resnick MI, Gospodarowickz M, Boccon-Gibbod L et al: Markers and prognostic factors. In Prostate Cancer. 3rd International Consultation on Prostate Cancer. Edited by Denis L, Bartsch G, Khouri S, Murai M, Partin A. Paris: Health Publications; 2003:49-89.
- 60. Nejart RJ, Katz AE, Olsson CA. The role of reverse transcriptase polymerase chain reaction for staging patients with clinically localized prostate cancer. Semin Urol Oncol 1998; 16:40-45.
- 61. Katz AE, Olsson CA, Raffo AJ et al. Molecular staging of prostate cancer with use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. Urology 1994; 43:765-775.
- 62. Cama C, Olsson CA, Raffo AJ et al. Molecular staging of prostate cancer II. A comparison of the application of na enhanced reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for prostate-specific antigen versus prostate-specific membrane antigen. J Urol 1995; 1563:1373-1378.
- 63. Katz AE, Uries GM, Olsson CA et al. Molecular staging of genitourinary malignancies. Urology 1996; 47:948-958.
- 64. Olsson CA, Vries GM, Raffo et al. Preoperative reverse transcriptase polymerase chain-reaction for PSA predicts treatment failures during radical prostatectomy. J Urol 1996; 155:1557-1562.
- 65. Olsson CA, Vries GM, Benson MC et al. The use of RT-PCR for PSA assay to predict potencial surgical failures before radical prostatectomy: Molecular staging of prostate cancer. Br J Urol 1996; 77:411-417.
- 66. Ennis RD, Katz AE, Vries et al. Detection of circulating prostate carcinoma cells via an enhanced RT-PCR in patients with early stage prostate cancer from other pre-treatment characteristcs. Cancer 1997; 79:2402-2408.
- 67. Nejart RJ, Katz AE, Benson MC et al. Enhanced RT-PCR for PSA combined with serum PSA predicts pathologic stage and outcome in 300 radical prostatectomy patients. J Urol 1998; 159:291A (abstract).
- 68. Okegawa T, Yoshioka J, Morita R et al. Molecular staging of prostate cancer: comparison of nested reverse transcription PCR assay using PSA versus PSMA as primers. Int J Urol 1998; 5:349-356.

- 69. Zhang Y, Zippe CD, Van Lente F et al. Combined nested reverse transcription
 PCR assay for PSA and PSMA in detecting circulating prostate cells. Clin Cancer Res 1997; 3:1215-1220.
- 70. Martinez-Pineiro L, Rios E, Martinez-Gomariz M, Pastor T, de CM, Picazo ML et al.: Molecular staging of prostatic cancer with RT-PCR assay for prostate-specific antigen in peripheral blood and lymph nodes: comparison with standard histological staging and immunohistochemical assessment of occult regional lymph node metastases. Eur Urol 2003, 43: 342-350.
- 71. Kurek R, Nunez G, Tselis N, Konrad L, Martin T, Roeddiger S, Aumuller G, Zamboglou N, Lin DW, Tunn UW, Renneberg H. Prognostic value of combined "triple"-reverse transcription-PCR analysis for prostate-specific antigen, human kallikrein 2, and prostate-specific membrane antigen mRNA in peripheral blood and lymph nodes of prostate cancer patients. Clin Cancer Res. 2004;10(17):5808-14.
- 72. Gao CL, Rawal SK, Sun L, Ali A, Connelly RR, Banez LL, Sesterhenn IA, McLeod DG, Moul JW, Srivastava S. Diagnostic potential of prostate-specific antigen expressing epithelial cells in blood of prostate cancer patients. Clin Cancer Res. 2003;9(7):2545-50.
- 73. McIntyre IG, Clarke RB, Anderson E, Clarke NW, George NJ. Molecular prediction of progression in patients with conservatively managed prostate cancer. Urology. 2001;58(5):762-6.
- 74. Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Detection of micrometastatic prostate cancer cells in the lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction is predictive of biochemical recurrence in pathological stage T2 prostate cancer. J Urol. 2000;163(4):1183-8.
- 75. Kantoff PW, Halabi S, Farmer DA, Hayes DF, Vogelzang NA, Small EJ: Prognostic significance of reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate-specific antigen in men with hormone-refractory prostate cancer. J Clin Oncol 2001, 19: 3025-3028.
 - 76. Ross RW, Manola J, Hennessy K, Galsky M, Scher H, Small E, Kelly WK, Kantoff PW. Prognostic significance of baseline reverse transcriptase-PCR

- for prostate-specific antigen in men with hormone-refractory prostate cancer treated with chemotherapy. Clin Cancer Res. 2005 Jul 15;11(14):5195-8.
- 77. O'Hara SM, Moreno JG, Zweitzig DR, Gross S, Gomella LG, Terstappen LW. Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormone-refractory prostate cancer. Clin Chem. 2004;50(5):826-35.
- 78. Nussbaum NJ, Kester RR, Mooppan UMM et al. Flow cytometric detection of tumor metastasis during urologic surgery. Urology 1991; 37:151-153.
- 79. Plantz B, Szyska P, Valdor M et al. Detection of circulating prostatic cells during radical prostatectomy. Urol Res 1997; 25:385-389.
- 80. Kramer G, Steiner GE, Madersbacher S: Serial tissue polypeptide specific analysis determinations in the follow-up of hormone treated carcinoma of the prostate. J Urol 1997; 158:1446-51.
- 81. Kaneda T, Hoshi S, Mao H, Takahashi T, Suzuki K, Sato M et al.: [Detection of urogenital malignant cells in the peripheral blood by nested RT-PCR using keratin 19 mRNA]. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 1998, 89: 33-42.
- 82. Bartek J, Taylor Papadimitriou J, Miller N, Millis R. Patterns of expression of keratin 19 as detected with monoclonal antibodies in human tissues and tumors. Int J Cancer 1985; 36: 299-306.
- 83. Peehl DM, Seller RG and Mc Neal JE. Keratin 19 in the adult human prostate: tissue and cell culture studies. Cell Tissue Res 1996; 285:171-176.
- 84. Prasad S, Thraves P, Drischilo A and Kuettel M. Expression of cytokeratin-19 as a marker of neoplastic progression of human prostate epithelial cell. Prostate 1998: 35:203-211.
- 85. del Giglio A, Bendit I, Neto DG. Conceitos básicos de biologia molecular. Rev Soc Bras Cancerol 1999; 5(1):32-38.
- 86. Seiden M, Sklar JL. PCR- and RT-PCR-based methods of tumor detection: potential applications and clinical implications. Important Adv Oncol. 1996; :191-204
- 87. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Oncol 1994; 12: 475-482.

- 88. Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S et al.: Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. J Clin Oncol 1995; 13: 2769-2775.
- 89. Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. Int J Cancer. 1999;80(1):119-25.
- 90. Novaes M, Bendit I, Garicochea B, Del GA: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of cytokeratin 19 expression in the peripheral blood mononuclear cells of normal female blood donors. Mol Pathol 1997, 50: 209-211.
- 91. Manhani AR, Manhani R, Soares HP, Bendit I, Lopes F, Nicoletti AG et al.: CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of breast cancer patients correlates with response to chemotherapy. Breast Cancer Res Treat 2001, 66: 249-254.
- 92. Tobias-Machado M, Simardi LH ,Pinto MA, e cols. Análise anátomopatológica de produtos de biópsia prostática: resultados obtidos na I Campanha de Saúde Prostática da Faculdade de Medicina do ABC. Arq Med ABC. 23(1):12-17, 2000.
- 93. Fugante PE, Tobias-Machado M, Pinto MA et al.: Twelve core prostate biopsy versus six systematic sextant biopsies. Int Braz J Urol. 28(3):207-213,2002
- 94. Tobias-Machado M, Verotti MJ, Aragao AJ, Rodrigues AO, Borrelli M, Wroclawski ER. Prospective randomized controlled trial comparing three different ways of anesthesia in transrectal ultrasound-guided prostate biopsy. Int Braz J Urol. 2006;32(2):172-9
- 95. Tobias-Machado M, Correa TD, De Barros EL, Wrocławski ER. Antibiotic prophylaxis in prostate biopsy. A comparative randomized clinical assay between ciprofloxacin, norfloxacin and chloramphenicol. Int Braz J Urol.

- 2003;29(4):313-9.
- 96. Daly LE, Bourke GJ, McGilvray J. Interpretation and uses of medical statistics. 4^aed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1991.
- 97. Steuber T, Graefen M, Haese A, Erbersdobler A, Chun FK, Schlom T, Perrotte P, Huland H, Karakiewicz PI. Validation of a nomogram for prediction of side specific extracapsular extension at radical prostatectomy. J Urol. 2006 Mar;175(3 Pt 1):939-44
- 98. Hakenberg OW, Frohner M, Wirth MP. Treatment of locally advanced prostate cancer--the case for radical prostatectomy. Urol Int. 2006;77(3):193-9.
- 99. Mueller P, Carsoll P, Bowers E et al. Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant. Cancer 1998; 83 (3):538-546.
- 100. Harper LV, Hilton AC, Jones AF. RT-PCR for the pseudogene-free amplification of the glyceralde-3-phosphate dehydrogenase gene (gapd). Mol Cell Probes. 2003; 17(5):261-265.
- 101. Patel K, Whelan PJ, Prescott S, Brownhill SC, Johnston CF, Selby PJ, Burchill SA. The use of real-time reverse transcription-PCR for prostate-specific antigen mRNA to discriminate between blood samples from healthy volunteers and from patients with metastatic prostate cancer. Clin Cancer Res. 2004 15;10(22):7511-9.
- 102. Chu DC, Chuang CK, Liou YF, Tzou RD, Lee HC, Sun CF. The use of real-time quantitative PCR to detect circulating prostate-specific membrane antigen mRNA in patients with prostate carcinoma. Ann N Y Acad Sci. 2004;1022:157-62.
- 103. Straub B, Muller M, Krause H, Schrader M, Miller K. Quantitative real-time rt-PCR for detection of circulating prostate-specific antigen mRNA using sequence-specific oligonucleotide hybridization probes in prostate cancer patients. Oncology. 2003;65 Suppl 1:12-7
- 104. Gelmini S, Tricarico C, Vona G, Livi L, Melina AD, Serni S, Cellai E, Magrini S, Villari D, Carini M, Serio M, Forti G, Pazzagli M, Orlando C. Real-Time

- quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the measurement of prostate-specific antigen mRNA in the peripheral blood of patients with prostate carcinoma using the taqman detection system. Clin Chem Lab Med. 2001;39(5):385-91.
- 105. Llanes L, Ferruelo A, Lujan M, Pascual C, Garcia-Mediero JM, Berenguer A. Quantitative real-time reverse transcription: polymerase chain reaction of prostate-specific antigen (PSA) for detection of circulating prostatic cells in patients with clinically localized prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2005;8(3):248-52.

APÊNDICES

Estadiamento TNM (1992)

- A Não palpável ao exame retal
 - A1 Câncer focal
 - A2 Difuso
- B B1 Unilobar, < 2cm
 - B2 Unilobar, < 2cm
 - B3 Todos os outros, intracapsulares
- D Qualquer extensão local
 - D1 Envolvimento nodal
 - D2 Outras metástase
- T0 Sem evidência de tumor primário
- T1 Tumor clinicamente inaparente, não palpável e invisível por imagem
- T1a Tumor como achado histológico incidental em < 5 % do tecido ressecado
- T1b Tumor como achado histológico incidental em > 5 % de tecido ressecado
- T1c Tumor identificado por punção por agulha (p.e., devido a PSA elevado)
- T2 Tumor confinado à próstata
 - T2a Tumor envolve metade de um lobo ou menos
 - T2b Tumor envolve mais da metade de um lobo, mas não ambos.
 - T2c Tumor envolve ambos os lobos
- T3 Tumor se estende através da cápsula prostática
 - T3a Extensão extracapsular unilateral
 - T3b Extensão extracapsular bilateral

T3c – Tumor invade vesículas seminais

T4 - Invasão da parede pélvica

N0 – Sem metástases para linfonodos

N1 – Metástase num único linofnodo regional, 2 cm ou menos na sua maior extensão

N2 – Metástase em um único linfonodo regional, maior de 2 cm, mas não maior de 5 cm em sua maior dimensão.

N3 – Metástases em um linfonodo regional, maior que 5 cm na sua maior dimensão.

M0 – Sem metástases à distância

M1 – Metástases à distância

M1a – Sem linfonodos regionais

M1b – Osso

M1c - Outros locais

Citações

- Perfil do Câncer de Próstata no estado de São Paulo: estudo epidemiológico da Sociedade Brasileira de Urologia no período de set 2004 a set 2005. Editores: Nardi A, Nardozza Jr A, Moreira Fillho DC, Rios LAS e Zequi SC. SBU Secção SP, pg 41
- 2) Site GeneCards http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KRT19&pubmed=121
- 3) Polish Bioinformatics Site
 http://lib.bioinfo.pl/auth:Fonseca,F
- 4) <u>CiteULike: Tag prostate</u> http://www.citeulike.org/tag/prostate
- 5) <u>server/Human/Authors/desc</u>
 http://veille-srv.inist.fr/bin/dilib/AppliHuman2/desc.cgi?/applis/veille/home/apache/users/genomique/human/Server/EN.Human.Authors.wsh+Tobe,%20T
- 6) ASCO

http://www.asco.org/portal/site/ASCO/menuitem.34d60f5624ba07fd506fe310ee37 a01d/?vgnextoid=76f8201eb61a7010VgnVCM100000ed730ad1RCRD&vmview=a bst_detail_view&confID=34&index=y&abstractID=30764

CYTOKERATIN 19 EXPRESSION BY REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PROSTATE CANCER PATIENTS

Marcos Tobias-Machado¹, Fernando Fonseca², Ana Paula Fantinato², Israel Bendit³, Marcelo Langer Wroclawski¹, Eric Wroclawski¹, and Auro del Giglio²

¹Disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina da Fundação ABC; ²Disciplina de Hematologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Fundação ABC; ³Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da FMUSP, S Paulo

Aims and background: Sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction-based techniques for detection of epithelial antigen expression, such as cytokeratin 19, in the peripheral blood mononuclear fraction of prostate cancer patients may allow the detection of tumor progression at A molecular level. Methods: We studied cytokeratin 19 expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in peripheral blood mononuclear cell samples of 10 control men and serially in 44 patients with prostate cancer every three months for 18 months. Results: None of the 10 normal control men expressed cytokeratin 19 in their peripheral blood mononuclear fraction. In the patients, cytokeratin 19 positivity at entry was not associated

with age, Gleason score, clinical stage, prostate-specific antigen or alkaline phosphatase. Interestingly, having at least one positive cytokeratin 19 result during follow-up correlated significantly with time to prostate-specific antigen progression (P=0.049), especially in the subgroup of metastatic patients (P=0.032).

Conclusions: We conclude that cytokeratin 19 expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the peripheral blood mononuclear cell fraction of prostate cancer patients correlates with time to prostate-specific antigen progression. Further studies are needed to confirm these findings.

Key words: keratin/genetics, neoplasm circulating cells, polymerase chain reaction, prostatic neoplasm.

Introduction

The presence of epithelial cells in the peripheral blood of prostate cancer patients correlates with adverse prognostic factors and seems to impart a worse prognosis in terms of disease-free and overall survival in several series in the literature⁴⁻⁸. The studies mainly evaluated the expression of epithelial cell markers such as prostate-specific membrane antigen (PSMA)^{1,2}, prostatespecific antigen (PSA)^{4,6,7}, and kallikrein^{5,9} by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique in the peripheral blood as potential markers of micrometastatic disease. Therefore, patients with positive RT-PCR in the peripheral blood for the aforementioned epithelial markers may be possible candidates for protocols that investigate earlier and more aggressive systemic treatments. Unfortunately, there are limitations to such tests such as expression of PSA by peripheral leukocytes¹⁰, as well as issues related to non-specificity of the assays^{9,11}.

Cytokeratin 19 (CK-19) is an epithelial marker expressed by a variety of epithelial cell types¹² and by carcinomas including breast, lung¹⁴ and prostate^{13,15}. In contrast to breast cancer, few studies have evaluated CK-19 expression in the peripheral blood of patients with prostate cancer. In fact, we could only find a report by Kaneda *et al.*¹⁵, who described 3 of 7 patients with

prostate cancer with a positive RT-PCR assay for CK-19 in their peripheral blood, all of whom had metastatic disease. We decided to evaluate in a larger cohort of prospectively followed men with prostate carcinoma whether the evaluation of CK-19 expression in their peripheral blood was correlated with known prognostic factors and with biochemical (PSA) progression.

Patients and methods

Patients

Our Institutional Surveillance Committee approved the protocol, and each patient provided a written informed consent. Forty-four non-consecutive patients with prostate cancer (21 with localized and 23 with metastatic disease) who were referred for radical surgery (21) for localized disease or hormone therapy (23) for initial palliation of metastatic disease were prospectively enrolled in the study. Ten men who had blood drawn at our clinical pathology laboratory for preoperative evaluation of non-urologic surgeries, without a history of prostate cancer and with normal PSA values (<2 ng/mL), were included as controls. No digital rectal examination or prostatic biopsies were routinely done in these control men. All patients with localized disease were submitted to radical prostatectomy (at least one month before entering the present study), whereas all

Acknowledgments: The study was conducted at the Disciplina de Hematologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Fundação ABC.

Correspondence to: Auro del Giglio MD FACP, Avenida RebouÁas 3387, S Paulo 05410-400, Brazil. Tel/fax 55-11-3819 5007; e-mail sandrabr@netpoint.com.br

those with metastatic disease, as well as those who progressed after prostatectomy, received hormone treatment with orchiectomy or goserelin (10.8 mg every 3 months). We excluded patients with localized disease who underwent prostatic irradiation and those who would not agree to be followed at 3-month intervals at our service. Blood (20 cc) was obtained through a standard venesection technique from the patients enrolled in the study at entry and at 3, 6, 9, 12, 15, and 18 months thereafter.

A digital rectal examination was performed in all patients at study entry and at least a week before the first blood sample collection. Patients were assessed at entry and at 3-month intervals by physical examination and PSA measurements. For those with metastatic disease, we also obtained every 3 months testosterone, prolactin, alkaline phoshatase and a complete blood cell count, and imaging studies (abdominal computed tomography, bone scans and chest X-ray) were performed every 6 months or whenever progressive disease was suspected.

PSA progression was defined as any elevation in PSA values that was confirmed by two other sequential measurements. We considered time to PSA progression as the time interval in months from study entry to the first of the three aforementioned progressively elevated PSA levels. PSA levels were measured by immunoenzymatic assay (Abbott laboratories, Abbott Park, ILL, USA).

RNA isolation and cDNA synthesis

RNA was extracted from the patient's peripheral leukocyte fraction by use of TRIZOLTM (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA). cDNA was synthesized from 1-2 μ g of total RNA with 200 U Superscript II Rnase H⁻ reverse transcriptase (GIBCO BRL) in 5X buffer (supplied by the manufacturer), containing random hexamer primers (10 mmol/L), deoxynucleotide triphosphates (dNTP; 1 mmol/L each), 10% dithiothreitol in diethyl pyrocarbonate-treated water (final reaction volume, 20 μ L) at 42 °C for 1 h. The mixture was heated to 70 °C for 10 mins and then cooled on ice.

The positive control used in the study was the breast cancer cell line MCF-7 and the negative control was the neuroblastoma CEM cell line.

First round PCR

Two microliters of cDNA was added to $50 \mu L$ of a mixture containing 1 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 20 pmol of each external primers as described by Datta *et al.*¹⁶, and 2 U of Taq polymerase (GIB-CO BRL). Samples were submitted to 35 cycles at 94 °C for 50 s and 72 °C for 1 min, 30 s, followed by a final extension at 72 °C for 10 mins in a DNA thermal cycler (MJ Research, Hercules, CA, USA).

Second round PCR

Two microliters of the first round product was added to 50 μ l of a second round mix containing 1 x PCR buffer mix, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 20 pmol of each internal primer as described by Datta *et al.*¹⁶, and 2

U of Taq polymerase and subjected to 35 cycles, under the same conditions as the first round PCR. The PCR product was size fractionated by electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized with ethidium bromide staining. Quality of RNA and efficiency of the reverse transcriptase step were assessed by concurrent application of RRNa and GAPDH transcript from the same cD-NA using oligonucleotide primers and conditions as described elsewhere¹⁷. Each reaction was performed in triplicate to verify the results.

Statistical methods

Chi-squared and Fisher exact tests were used to evaluate correlations between categorical variables. We employed ANOVA tests to evaluate correlations between continuous and categorical variables. Overall survival was computed from the collection of the first sample for CK-19 determination. Overall survival comparisons between groups with CK-19 positive and negative results were performed with the Peto-Wilcoxon test. Multivariate analysis was not carried out due to the small number of patients. We employed the NCCS 2000 statistical software (http://www.ncss.com/).

Results

We included 44 patients with a median age of 74 years (range, 57-95) from whom we obtained 210 blood samples. Twenty-one patients (47.7%) had clinical stages I to III and 23 (52.3%) had clinical stage IV. Nine patients (20%) had Gleason scores 2 to 6; 20 (44.5%) had score 7 and 15 (35.6%) had scores 8 to 10. Blood samples were collected from August 2001 to March 2003, and the median follow-up was 18 months (range, 0-18) at the time of this writing. Data from 4 patients for whom we only had the first collected sample were evaluated for correlations between CK-19 expression and clinical and pathologic variables at diagnosis and were excluded from calculations of time to PSA progression.

All normal control patients were also negative for CK-19 expression in their peripheral blood mononuclear cell fraction by RT-PCR (Figure 1). Figure 2 shows the clinical course of one patient who had a positive RT-PCR assay for CK-19 at entry and who became negative during follow-up.

CK-19 RT-PCR positivity at entry did not correlate with age, Gleason score, clinical stage, lactate dehydrogenase, hemoglobin level, prolactin, PSA, alkaline phosphatase or testosterone levels. There were 27 patients with PSA progression, 13 with localized disease and 14 with metastatic disease. Interestingly, having at least one positive CK-19 result during follow-up correlated significantly with time to PSA progression (P = 0.049), especially in the subgroup of metastatic patients (P = 0.032) (Figures 3 and 4). However, there was no significant correlation between having at least one positive CK-19 result during follow-up and Gleason score, clinical stage, lactate dehydrogenase, hemoglobin level,

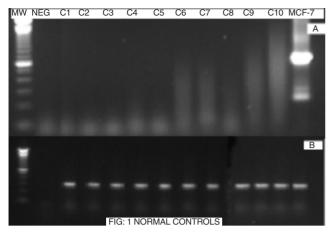


Figure 1 - Panel A: RT-PCR for CK-19; Panel B: GADPH control. From right to left: molecular weight marker (MW), negative control (NEG), lanes 3 to 13: normal control men (C1 to C10) with PSA <2 ng/mL and positive control (cell line MCF-7).

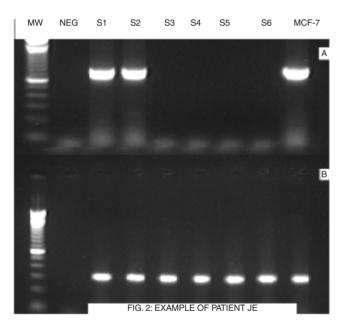


Figure 2 - Panel A: RT-PCR for CK-19; Panel B: GADPH control. From right to left: molecular weight marker (MW), negative control (NEG), samples 1 to 6 (S1-S6) from one patient with prostate cancer (JE) and positive control (cell line MCF-7).

prolactin, PSA, alkaline phosphatase or testosterone levels. So far, few clinical events have been noted (2 progressions and 3 progressions followed by death), all in the group of patients with metastatic disease. As such, no meaningful statistical analysis could be carried out with these clinical end points.

Discussion

The role of RT-PCR is still experimental in the evaluation of epithelial antigen expression in the peripheral blood for the follow-up of patients with prostate

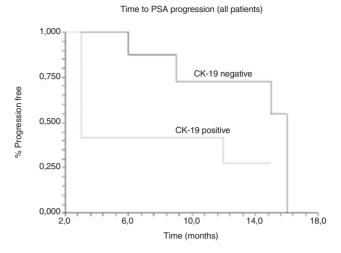


Figure 3 - Time to PSA progression for all patients having at least one positive CK-19 result (CK-19 positive) and with all negative results (CK-19 negative) (P = 0.049).

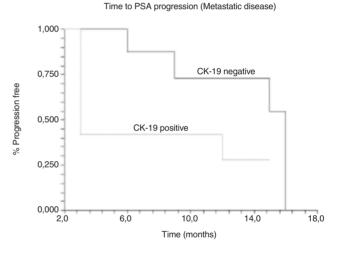


Figure 1 - Panel A: RT-PCR for CK-19; Panel B: GADPH control. From right to left: molecular weight marker (MW), negative control (NEG), lanes 3 to 13: normal control men (C1 to C10) with PSA <2 ng/mL and positive control (cell line MCF-7).

cancer. Several studies have evaluated the expression of epithelial markers such as PSA, prostate-specific membrane antigen and kallikrein in the peripheral blood of prostate cancer patients by the RT-PCR technique. In some of them, statistically¹⁻³ significant correlations have been reported with clinically meaningful prognostic factors such as stage, Gleason score and seminal vesicle invasion. Furthermore, the presence of epithelial cells in the peripheral blood of prostate cancer patients detected by RT-PCR correlated significantly in some of these studies with time to PSA progression, disease-free survival⁴⁻⁸ and overall survival. Other studies, however, did not confirm such findings^{9,18}. Various reasons may explain the variability of experimental results among studies, such as patient selection,

sample preparation and conservation, assay non-specificity¹⁹ and spurious expression of PSA by blood leukocytes¹⁰.

CK-19 is a filamentous cytoskeletal protein expressed in several epithelial cell malignancies such as lung, breast and prostate carcinomas¹². Interestingly, the evaluation of CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood mononuclear cell fraction in patients with breast cancer seems to be specific^{20,21} and, in a previous work by our group, correlated with response to chemotherapy¹³. We thus decided to prospectively evaluate CK-19 expression in the peripheral blood mononuclear cell fraction of prostate cancer patients to ascertain whether it was also correlated with established prognostic factors for the disease and with clinically meaningful end points such as time to PSA progression.

Contrary to Grasso et al. and Shariat et al. we could not show any positive correlations between CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of our patients at study entry and any of the established prognostic factors of the disease such as clinical stage, Gleason score or PSA levels. Grasso et al. and Shariat et al.⁵, who showed positive correlations between epithelial antigen expression in the peripheral blood by RT-PCR and clinical stage and Gleason score, used samples collected before surgery. Furthermore, since we included patients at different time points of their disease, we may not have been able to disclose such correlations in these patients, because in some of them previous treatment or different intervals from prostatectomy may possibly have interfered with CK-19 expression detected by RT-PCR⁴. In fact, Shariat et al.⁴ showed that many of the preoperative positive PSA RT-PCR results were not maintained post surgery during the extended follow-up.

When analyzing patients according to their having at least one positive sample for CK-19 expression, we found a statistically significant correlation with time to

PSA failure, since patients with at least one positive result for CK-19 expression had a significantly shorter time to PSA progression, which was more significant for patients with metastatic disease (Figure 2). We believe that this finding may be due to the fact that patients with metastatic disease may progress earlier than those with localized disease, allowing us to detect biochemical progressions with shorter follow-up periods than those of the present study. Since no correlation of having at least one CK-19 positive sample during followup with Gleason score, stage or initial PSA levels was found, we believe that the correlation with time to PSA progression may be independent of these other prognostic factors. Since the sample size was small, we believe that a larger number of patients should be studied in the future, thus allowing a multivariate analysis to confirm such a hypothesis. In agreement with our results, other authors have also described a significant correlation between the presence of other epithelial markers in the peripheral blood detected by RT-PCR and a shorter time to PSA progression⁴⁻⁸.

As with RT-PCR for PSA, PSMA and cahedrin, concerns have also been voiced as to the nonspecificity of CK-19 RT-PCR¹⁴. We found no expression of CK-19 in the PBMC fraction of any of the 10 normal control men with serum PSA below 2 ng/dL. In terms of sensitivity, we previously described that the assay was able to detect one tumor cell in a mixture with 10⁶ normal non-CK-19 expressing cells²¹. Therefore, we believe that the assay seems to be sensitive and specific and could be useful to further stratify patients according to disease aggressiveness. However, with the data present in the literature, we cannot currently recommend the molecular follow-up of patients with prostate cancer with RT-PCR for the detection of epithelial antigens in the peripheral blood. Further improvements in the molecular techniques and larger studies on a larger number of patients are needed to confirm our findings.

References

- Grasso YZ, Gupta MK, Levin HS, Zippe CD, Klein EA: Combined nested RT-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in prostate cancer patients: correlation with pathological stage. Cancer Res, 58: 1456-1459, 1998.
- Schmidt B, Anastasiadis AG, Seifert HH, Franke KH, Oya M, Ackermann R: Detection of circulating prostate cells during radical prostatectomy by standardized PSMA RT-PCR: association with positive lymph nodes and high malignant grade. Anticancer Res, 23: 3991-3999, 2003.
- Seiden MV, Kantoff PW, Krithivas K, Propert K, Bryant M, Haltom E, Gaynes L, Kaplan I, Bubley G, DeWolf W: Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. J Clin Oncol. 12: 2634-2639, 1994.
- cancer. J Clin Oncol, 12: 2634-2639, 1994.

 4. Shariat SF, Kattan MW, Song W, Bernard D, Gottenger E, Wheeler TM, Slawin KM: Early postoperative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy. Cancer Res, 63: 5874-5878, 2003.
- 5. Shariat SF, Gottenger E, Nguyen C, Song W, Kattan MW,

- Andenoro J, Wheeler TM, Spencer DM, Slawin KM: Preoperative blood reverse transcriptase-PCR assays for prostate-specific antigen and human glandular kallikrein for prediction of prostate cancer progression after radical prostatectomy. Cancer Res, 62: 5974-5979, 2002.
- Bianco FJ Jr, Powell IJ, Cher ML, Wood DP Jr: Presence of circulating prostate cancer cells in African American males adversely affects survival. Urol Oncol, 7: 147-152, 2002.
- Kantoff PW, Halabi S, Farmer DA, Hayes DF, Vogelzang NA, Small EJ: Prognostic significance of reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate-specific antigen in men with hormone-refractory prostate cancer. J Clin Oncol, 19: 3025-3028, 2001.
- 8. Mejean A, Vona G, Nalpas B, Damotte D, Brousse N, Chretien Y, Dufour B, Lacour B, Brechot C, Paterlini-Brechot P: Detection of circulating prostate derived cells in patients with prostate adenocarcinoma is an independent risk factor for tumor recurrence. J Urol, 163: 2022-2029, 2000.
- Thiounn N, Saporta F, Flam TA, Pages F, Zerbib M, Vieillefond A, Martin E, Debre B, Chevillard S: Positive prostate-specific antigen circulating cells detected by reverse tran-

- scriptase-polymerase chain reaction does not imply the presence of prostatic micrometastases. Urology, 50: 245-250, 1997.
- Lintula S, Stenman UH: The expression of prostate-specific membrane antigen in peripheral blood leukocytes. J Urol, 157: 1969-1972, 1997.
- Llanes L, Ferruelo A, Paez A, Gomez JM, Moreno A, Berenguer A: The clinical utility of the prostate specific membrane antigen reverse-transcription/polymerase chain reaction to detect circulating prostate cells: an analysis in healthy men and women. BJU Int, 89: 882-885, 2002.
- Bartek J, Bartkova J, Taylor-Papadimitriou J, Rejthar A, Kovarik J, Lukas Z, Vojtesek B: Differential expression of keratin 19 in normal human epithelial tissues revealed by monospecific monoclonal antibodies. Histochem J, 18: 565-575, 1986.
- 13. Manhani AR, Manhani R, Soares HP, Bendit I, Lopes F, Nicoletti AG, Fonseca FL, Novaes M, Zatta SM, Arias V, Giralt S, del Giglio A: CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of breast cancer patients correlates with response to chemotherapy. Breast Cancer Res Treat, 66: 249-254, 2001.
- Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S, Schutte J: Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. J Clin Oncol, 13: 2769-2775, 1995.
- 15. Kaneda T, Hoshi S, Mao H, Takahashi T, Suzuki K, Sato M: Detection of urogenital malignant cells in the peripheral blood by nested RT-PCR using keratin 19 mRNA. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi, 89: 33-42, 1998.

- Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Oncol, 12: 475-482, 1994.
- Lin YC, Chen SC, Hsueh S, Lo YF, Chow-Wu YH, Liaw IC, Cheng AJ: Lack of correlation between expression of human mammaglobin mRNA in peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients. Cancer Sci, 94: 99-102, 2003.
- 18. Martinez-Pineiro L, Rios E, Martinez-Gomariz M, Pastor T, de Cabo CM, Picazo ML, Palacios J, Perona R: Molecular staging of prostatic cancer with RT-PCR assay for prostate-specific antigen in peripheral blood and lymph nodes: comparison with standard histological staging and immunohistochemical assessment of occult regional lymph node metastases. Eur Urol, 43: 342-350, 2003.
- Resnick MI, Gospodarowickz M, Boccon Giron L: Markers and prognostic factors. In: Prostate cancer, Denis L, Bartsch G, Khouri S, Murai M, Partin A (Eds), pp 49-89, Health Publications, Paris, 2003.
- Soares HP, Del Giglio A, Clark O, Kumar A, Djulbegovic B: Reverse transcriptase polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in the peripheral blood of women with breast cancer: a meta-analysis. Proc ASCO, 22: 878, 2004.
- Novaes M, Bendit I, Garicochea B, Del Giglio A: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of cytokeratin 19 expression in the peripheral blood mononuclear cells of normal female blood donors. Mol Pathol, 50: 209-211, 1997