LUIZ HENRIQUE DE ANDRADE ARAÚJO

**Aplicação de marcadores urinários no diagnóstico
e prognóstico do câncer de próstata**

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

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes

Coorientadora: Dr.^a Sabrina Thalita dos Reis

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Araújo, Luiz Henrique de Andrade

Aplicação de marcadores urinários no diagnóstico e prognóstico do câncer de
próstata / Luiz Henrique de Andrade Araújo. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.

Orientador: Alberto Azoubel Antunes.

Coorientadora: Sabrina Thalita dos Reis

Descritores: 1.Neoplasias da próstata/diagnóstico 2.Urina 3.Expressão gênica
4.Prognóstico 5.Reação em cadeia da polimerase 6.Marcadores genéticos
7.Biópsia

USP/FM/DBD-418/15

Dedicatória

A minha querida esposa Francisca Jackeline Terto Araújo, que nunca hesitou em me apoiar em todos os momentos da minha vida; a minha filha Maria Eduarda Terto Araújo, um presente de Deus para alegrar nossas vidas; aos meus pais, José Araújo da Silva e Lúcia Maria de Andrade e Silva, que sempre me apoiaram e serviram de exemplo para conseguir superar todas as adversidades que temos que enfrentar na vida. Aos meus irmãos Taciano de Andrade Araújo e Luciana de Andrade Araújo, que me ensinaram com os erros e acertos, a melhor maneira de conduzir minha vida.

Agradecimentos

Primeiramente, a **Deus**, por poder viver, sonhar e poder realizar aquilo que sonhei.

Ao **Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes**, meu orientador, meu amigo, por me aceitar como seu aluno, por dar a oportunidade de participar desse projeto desafiador, pela ajuda incessante em todos os momentos, por permitir que eu pudesse mergulhar nesse maravilhoso mundo da pesquisa e por me ensinar que “o homem é movido pelos desafios...”. Muito obrigado.

À **Dra. Sabrina Thalita dos Reis**, minha coorientadora, minha amiga, por aceitar o convite de participar desse projeto, por me introduzir os conceitos básicos de biologia molecular, por ter sido fundamental para a execução do projeto. Muito obrigado.

À **Prof. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite**, por permitir que pudéssemos utilizar toda a estrutura do LIM-55 para realização do projeto, por permitir compartilhar um pouco do seu vasto conhecimento em pesquisa e urologia, por ser sempre acessível e interessada em ajudar. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Miguel Srougi**, pelo incentivo incansável a pesquisa no nosso país e por permitir que possamos conviver um pouco ao seu lado, isso já foi uma grande vitória. Muito obrigado.

À **Dra. Nayara Izabel Viana**, amiga do LIM-55, por sempre nos ajudar em todas as etapas desse projeto. Muito obrigado.

Aos grandes amigos do LIM-55, por toda a ajuda gratuitamente dispensada e pela amizade construída, muito obrigado a **Iran Amorim Silva, Caio Martins Moura, Denis Reis Moraes, Betina Katz, Nelson Dip** e especialmente, **Michele Silva**.

Aos grandes amigos da pós-graduação e da vida, **Dr. Fabio Oliveira, Dr. Fernando Fróes, Dr. Karlo Biolo, Dr. Marco Nunes, Dr. Paulo Sajovic, Dr.**

Alexandre Iscaife, por compartilharem todos os anseios e dificuldades, além de dividirmos os momentos de tristeza e alegria. Muito obrigado.

Aos colegas do grupo da próstata do Hospital das Clínicas, **Dr. Paulo Cordeiro**, **Dr. Geraldo Campos Freire**, **Dr. Laércio**, **Dr. Élcio Nakano**, **Dr. Eduardo Muraca**, por ter a oportunidade de compartilhar os conhecimentos dentro da urologia.

Ao acadêmico **Gabriel dos Anjos**, aluno bolsista, participante do projeto e fundamental para realização de todo o estudo.

Às secretárias do serviço de urologia do Hospital das Clínicas, **lones**, **Teresa**, **Aparecida**, e especialmente, a **Elisa**, por sempre estar disponível a ajudar da melhor maneira possível, seja pessoalmente ou eletronicamente. Muito obrigado.

Às secretárias do ambulatório de urologia do Hospital das Clínicas, por sempre atenderem nossas solicitações de maneira cordial e gentil. Muito obrigado.

Ao serviço de urologia do Instituto de Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), em especial ao **Prof. Dr. Adriano Nesralah**, por ter ajudado de maneira crucial durante algumas etapas do projeto. Muito obrigado.

Ao serviço de urologia do Hospital Amaral Carvalho, em Jaú-SP, em especial **Dr. Renato Prado Costa**, **Dr. Carlos Hermann Schaal**, **Dr. Fernando Cesar Sala**, **Dr. André Vanni**, **Dr. Rafael Scherer**, **Dr. André Pereira da Silva**, **Dr. André Matos de Oliveira**, **Dr. Guilherme Prado Costa**. Os três anos de convívio com vocês foram fundamentais para a minha formação profissional e pessoal, serei eternamente grato por todo o aprendizado dispensado. Obrigado meus professores.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias / elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011. 92p.

Referências: Adaptado de International Comittee of Medical Journal Editors (Vancouver).

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

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer de Próstata.....	2
1.2 Marcadores moleculares em CaP.....	8
2 OBJETIVOS.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Pacientes.....	17
3.2 Critérios de inclusão.....	17
3.3 Coleta das amostras de urina.....	19
3.4 Extração de RNA.....	21
3.5 Síntese de cDNA.....	22
3.6 qRT-PCR.....	22
3.7 ELISA.....	24
3.8 Análise estatística.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Diagnóstico.....	27
4.2 Prognóstico.....	29
5 DISCUSSÃO.....	48
6 CONCLUSÕES.....	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
Apêndice	85

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

CaP: Câncer de próstata

PSA: Antígeno prostático específico

HPB: Hiperplasia prostática benigna

TR: Toque retal

BxP: Biópsia de próstata

MMP9: Metaloproteinase de matriz 9

PSMA: Antígeno prostático específico de membrana

PCA3: Antígeno do câncer de próstata 3

hK3: Calicreína 3

GREB1: Gene regulado por estrogênio no câncer de mama

B2M: Beta 2 – microglobulina

AR: Receptor androgênico

qRT-PCR: Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

Lista de Figuras

Figura 1 – Ilustração caracterizando a detecção do gene PCA3 (seta inferior) através de células prostáticas eliminadas na urina após massagem prostática, enquanto que a glicoproteína PSA (seta superior) é detectado na corrente sanguínea.....	12
Figura 2 – Níveis de expressão dos marcadores urinários (PCA3, PSMA, GREB1, hK3 e MMP9) nos pacientes portadores de CaP em relação aos pacientes do grupo controle.....	27
Figura 3 – Curva ROC para MMP9 urinária no diagnóstico dos pacientes com CaP.....	29
Figura 4 - Representação gráfica do estadio patológico dos pacientes submetidos a PR.....	42
Figura 5 - Representação gráfica do escore de Gleason dos pacientes submetidos a PR.....	42
Figura 6 - Representação gráfica do volume tumoral dos pacientes submetidos a PR.....	43
Figura 7- Representação gráfica do acometimento das vesículas seminais dos pacientes submetidos a PR.....	43
Figura 8 - Representação gráfica do acometimento de linfonodos dos pacientes submetidos a PR.....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Dados Clínico-Epidemiológicos dos pacientes portadores de CaP e grupo controle.....	19
Tabela 2 - Identificação dos genes e a B2M, analisados através de qRT-PCR....	20
Tabela 3 - Porcentagem de aproveitamento das amostras de urina para análise da expressão gênica nos pacientes portadores de CaP em relação ao grupo controle.....	23
Tabela 4 - Média de expressão dos genes estudados nos pacientes com CaP, comparados com os pacientes do grupo controle.....	28
Tabela 5 - Expressão dos genes de acordo com o escore de Gleason.....	30
Tabela 6 - Expressão dos genes de acordo com o estadio clínico (TNM).....	31
Tabela 7 - Expressão dos genes de acordo com os níveis de PSA (ng/ml).....	32
Tabela 8 - Expressão dos genes de acordo com a densidade do PSA.....	33
Tabela 9 - Expressão dos genes de acordo com o número de fragmentos positivos.....	34
Tabela 10 - Expressão dos genes de acordo com a porcentagem de fragmentos positivos na biópsia de próstata.....	35
Tabela 11 - Expressão da MMP9 de acordo com os fatores prognósticos como PSA (<10 ou ≥10), densidade (<0,15 ou ≥0,15), escore de Gleason (6 ou >6), número de fragmentos positivos (1 ou ≥2), porcentagem dos fragmentos (<50% ou ≥50%) e estadiamento clínico (<cT2a ou ≥cT2a).....	36
Tabela 12 - Expressão combinada de genes em relação ao nível do PSA (ng/ml)	37
Tabela 13 - Expressão combinada de genes em relação ao estadiamento clínico (TNM)	38

Tabela 14 - Expressão combinada de genes em relação ao escore de Gleason.....	39
Tabela 15 - Expressão combinada de genes em relação a densidade do PSA...	40
Tabela 16 - Expressão combinada de genes em relação a porcentagem do fragmento na biópsia de próstata.....	41
Tabela 17 - Expressão dos genes de acordo com o estadio patológico (pTNM).	45
Tabela 18 - Expressão dos genes de acordo com o escore de Gleason.....	45
Tabela 19 - Expressão dos genes de acordo com o volume tumoral.....	46
Tabela 20 - Expressão dos genes de acordo com o acometimento de vesículas seminais.....	46
Tabela 21 - Expressão dos genes de acordo com o acometimento de linfonodos.....	47

Araújo LHA. *Aplicação de marcadores urinários no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: O diagnóstico do câncer de próstata é realizado através da dosagem do PSA sérico e da realização do toque retal. Qualquer alteração em um ou ambos indicam a necessidade de realização da biópsia de próstata guiada por ultrassom. Contudo, a grande maioria dos pacientes submetidos a biópsia não tem câncer e, portanto, são submetidos a biópsia desnecessariamente. Além disso, muitos casos diagnosticados não precisam ser tratados devido ao comportamento indolente da neoplasia. Portanto, há necessidade de ferramentas mais acuradas no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata e os marcadores urinários são instrumentos promissores na avaliação dessa neoplasia. **OBJETIVO:** Avaliar o perfil de expressão de 5 genes (MMP9, PSMA, GREB1, hK3, PCA3) na urina de pacientes portadores de câncer de próstata em comparação com pacientes sem a neoplasia e analisar se há relação com os fatores prognósticos pré e pós-tratamento. **MATERIAL/MÉTODOS:** O estudo constituiu na análise de 46 pacientes portadores de câncer de próstata e 28 pacientes sem suspeita da neoplasia (PSA<2,5ng/ml; TR normal; e sem fatores de risco). A urina dos pacientes foi colhida após massagem prostática, armazenada e analisada posteriormente a expressão gênica através de reação em cadeia da polimerase em tempo real. Além da análise do perfil de expressão gênica em relação aos casos sem neoplasia, foram avaliados os perfis de acordo com os fatores prognósticos, como: escore de Gleason, PSA, densidade do PSA, estadiamento clínico e porcentagem do fragmento envolvido na biópsia. Posteriormente, as expressões dos genes foram avaliadas de acordo com as características patológicas da peça operatória, como estadio patológico, escore de Gleason, volume tumoral, comprometimento de vesículas seminais e de linfonodos. **RESULTADOS:** Foi demonstrada uma superexpressão da MMP9 em 85,7% das amostras com câncer em relação ao grupo controle, com média de 6,4x maior. Os genes PSMA, GREB1, hK3 e PCA3 apresentaram um padrão mais heterogêneo, com tendência a subexpressão nos casos de câncer. Quando avaliados conjuntamente, pode-se evidenciar que a superexpressão simultânea da MMP9 e PSMA estava presente em 100% dos pacientes com PSA≥10ng/ml ($p=0,007$) e a superexpressão da MMP9 e GREB1 estava presente em 66,7% dos pacientes com <50% dos fragmentos positivos ($p=0,036$). Após avaliação anátomo-patológica, foi possível identificar superexpressão do GREB1 em casos pT2 em comparação com pT3 ($p=0,031$) e superexpressão do PCA3 em casos com volume tumoral maior ($\geq 11\%$ x $< 11\%$) ($p=0,006$). **CONCLUSÕES:** O estudo demonstrou que os marcadores urinários podem ser uma ferramenta útil no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata. Foi evidenciada a superexpressão da MMP9 nos casos de câncer em relação ao grupo controle. Além disso, a superexpressão da MMP9 e PSMA em conjunto pode estar relacionada a tumores com PSA mais alto e, portanto, com prognóstico mais desfavorável, enquanto que a superexpressão da MMP9 e GREB1 em conjunto pode estar relacionado a tumores de menor volume. Também foi possível correlacionar os genes urinários com os achados anátomo-patológicos, com GREB1 significativamente mais expresso em tumores confinados a próstata, enquanto PCA3 mais expresso em casos de maior volume tumoral.

Descritores: Neoplasias da próstata/diagnóstico; Urina; Expressão gênica; Prognóstico; Reação em cadeia da polimerase; Marcadores genéticos; Biópsia.

Araújo LHA. *The role of urinary markers in the diagnosis and prognosis of prostate cancer* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2015

INTRODUCTION: Currently, prostate cancer diagnosis is performed through the measurement of serum PSA and digital rectal examination. Any alteration in one or both indicates the need for ultrasound-guided prostate biopsy. However, the vast majority of patients undergoing biopsy do not have cancer and therefore undergo unnecessary biopsies. Moreover, many prostate cancer cases do not need to be treated due to the indolent behavior. Therefore, more accurate methods for diagnosis and prognosis of prostate cancer are necessary and urinary markers are promising tools in the evaluation of prostate tumors.

OBJECTIVES: To evaluate the expression profile of 5 genes (MMP9, PSMA, GREB1, hK3, PCA3) in urine of patients with prostate cancer compared with patients without cancer and to determine whether there is a relationship with the pre and post treatment prognostic factors.

MATERIAL/METHODS: The study consisted of the analysis of 46 patients with prostate cancer and 28 patients without cancer (PSA<2.5 ng/ml, normal DRE, and no risk factors). The urine of patients was collected after prostatic massage, stored and subsequently gene expression analyzed by real time polymerase chain reaction. Besides the analysis of gene expression compared to cases without cancer, the profiles according to prognostic factors were evaluated, like Gleason score, PSA, PSA density, clinical staging and percentage fragment involved in the biopsy. Subsequently, gene expressions were evaluated according to the pathological features, such as pathologic stage, Gleason score, involvement of lymph nodes and seminal vesicles.

RESULTS: An over-expression of urinary MMP9 was demonstrated in 85.7% of the samples with cancer compared to non-cancer, with a mean of 6.4x. The PSMA, GREB1, hK3 and PCA3 genes showed a more heterogeneous pattern, with a tendency to under-expression in cancer. When considered together, it can be evidenced that the simultaneous over-expression of MMP9 and PSMA was present in 100% of patients with PSA $\geq$ 10ng/ml (p=0.036) and over-expression of MMP9 and GREB1 was present in 66.7% of patients <50% positive fragments involved (p=0,036). After pathological evaluation were identified over-expression of GREB1 in pT2 cases compared to pT3 (p = 0.031), and over-expression of PCA3 in cases with greater tumor volume ($\geq$ 11% x <11%) (p=0.006).

CONCLUSIONS: The study showed that urinary markers can be a useful tool in the diagnosis and prognosis of prostate cancer. Overexpression of MMP9 was observed in cancer cases compared to control cases and can be helpful to avoid unnecessary prostate biopsies. Furthermore, overexpression of PSMA and MMP9 together may be related to higher PSA tumors and therefore more unfavorable prognosis, whereas overexpression of MMP9 and GREB1 together may be related to lower volume tumors. It was also

possible to correlate urinary genes with pathologic findings with GREb1 significantly more expressed in tumors confined to the prostate, while PCA3 most expressed in cases of higher tumor volume.

Descriptors: Prostatic neoplasms/diagnosis; Urine; Gene expression; Prognosis; Polymerase chain reaction; Genetic markers; Biopsy.

1. Introdução

1.1. Câncer de próstata

Segundo estimativas previstas para 2015 o câncer de próstata (CaP) representará 28% (220.800 casos) dos novos casos de câncer no sexo masculino e será responsável por 10% das mortes por câncer nos Estados Unidos da América (EUA). Entretanto, foi observado uma queda de mais de 40% na mortalidade secundária ao CaP nos últimos 20 anos (Siegel e cols., 2015).

No Brasil, o CaP representa 18,5% do total de casos de câncer e estima-se um risco de 54 casos novos a cada 100.000 habitantes. Ao longo dos anos, observa-se uma tendência de aumento da incidência, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA). (INCA, 2010)

Essas alterações epidemiológicas se devem provavelmente a detecção e tratamento precoce após a introdução do antígeno prostático específico (PSA), a partir do ano de 1988, no rastreamento do CaP, que promoveu aumento na incidência da neoplasia, principalmente nos estágios iniciais. Entre 1989 e 1992, 29,8% dos tumores diagnosticados se encontravam em estágios iniciais, enquanto no período entre 1999 e 2001, 45% dos tumores eram iniciais. Além do mais, a incidência de tumores de alto risco caiu de 41% para 15%. (NCCN, 2011)

O PSA é uma glicoproteína secretada por células prostáticas epiteliais e atua na liquefação do líquido seminal. Originalmente, foi descrito por Hara e cols em estudos forenses que o utilizavam como marcador do sêmen humano. (Hara e cols., 1971). Posteriormente, foi descoberta sua presença na

hiperplasia prostática benigna (HPB) e no tecido prostático maligno (Wang e cols., 1979) e na década de 80 foi aprovado pela agência reguladora americana (FDA) para ser utilizado na monitorização do CaP. (Stamey e cols., 1987)

Apesar da grande importância do PSA na urologia, o mesmo possui falhas, já que não é um marcador específico de câncer de próstata e, sim, do tecido prostático. Portanto, pode apresentar alterações em pacientes portadores de diversas patologias benignas da próstata, como na HPB, prostatites agudas e crônicas, entre outros (SBU, 2005). Assim, quase 70% dos pacientes com PSA elevado não possuem CaP e serão submetidos desnecessariamente a biópsia de próstata (BxP) (Loeb e cols., 2008) (Bozeman e cols., 2002).

Devido a suas falhas e de modo a torná-lo mais acurado, foram estudados meios de avaliar derivados do PSA, como a velocidade (Carter e cols., 2002); a densidade (Benson e cols., 1992); o PSA ajustado a idade (Oesterling e cols., 1993); e a relação do PSA livre/total (Partin e cols., 1996). Contudo, nenhum desses fatores isoladamente tem mais relevância que o próprio PSA total, que permanece como principal marcador de diagnóstico mesmo após quase 30 anos de sua descoberta.

O valor do PSA utilizado como ponto de corte para rastreamento do CaP inicialmente era de 4,0ng/ml, porém Catalona e cols. observaram que grande proporção dos pacientes apresentavam doença localmente avançada quando utilizado este ponto de corte e, a partir da década de 90, o valor considerado adequado passou para 2,5 ng/ml. (Catalona e cols., 1993) (Catalona e cols.,

1997). Assim, a proporção de tumores órgão-confinados passou de 60-70% para 81%, com melhora significativa da sobrevida livre de recorrência. (Antenor e cols., 2005). Em 2004, Thompson e cols ratificaram a necessidade de mudança no ponto de corte do PSA, quando realizou BxP em pacientes com $PSA < 4,0 \text{ ng/ml}$ e TR normal e encontrou tumores com escore de Gleason desfavorável em 14,9% dos casos. Além disso, encontrou CaP em 17% dos pacientes com baixo PSA ($1,1\text{-}2,0 \text{ ng/ml}$), indicando que mesmo critérios de BxP mais rigorosos podem não diagnosticar alguns casos do tumor. (Thompson e cols., 2004)

Contudo, ao mesmo tempo em que se diagnosticava mais pacientes com CaP, mais tumores indolentes eram encontrados. Consequentemente, mais pacientes expostos a tratamentos com seus riscos e complicações não desprezíveis, como disfunção sexual, incontinência urinária e alterações intestinais. Certamente esses pacientes apresentarão comprometimento de suas qualidades de vida. (Sanda e cols., 2008)

Aproximadamente 21-44% dos pacientes com PSA entre $4,0 - 10,0 \text{ ng/ml}$ serão diagnosticados como portadores de CaP, ou seja, a grande maioria dos pacientes serão investigados desnecessariamente. Além disso, foi identificado que 21-25% dos pacientes com PSA entre $2,0\text{-}2,9 \text{ ng/ml}$ possuem CaP e 33% daqueles com PSA entre $3,0\text{-}3,9 \text{ ng/ml}$ também são portadores de tumores, o que demonstra a falta de especificidade do método (Lilja e cols., 2008).

A BxP guiada por ultrassom (US) é o método padrão ouro atualmente para o diagnóstico de CaP (Thompson e cols., 2007). Contudo, é um método

falho no papel de identificar focos de neoplasia na próstata, já que apresenta alta taxa de falso negativo e deixa de diagnosticar 30% dos tumores mesmo com aumento no número de fragmentos. Assim, devido a falta de acurácia na indicação precisa da BxP, muitas vezes será necessária repetição do método, o que causa estresse psicológico tanto no paciente, como no médico; elevação dos custos; e riscos de complicações clínicas não desprezíveis, como hematúria, desconforto perineal, infecção urinária, sepse, etc. (Hambrock e cols., 2010). Dentre as complicações ressaltamos que 18% dos pacientes submetidos a BxP apresentam febre relacionada ao procedimento e 1,3% necessitam internação hospitalar principalmente por sangramento ou complicações infecciosas relacionadas a BxP. A dor e as complicações infecciosas são as principais preocupações dos pacientes que necessitam de uma repetição do procedimento. A sepse urinária vem sendo uma preocupação cada vez maior devido ao aumento da resistência bacteriana às quinolonas, principal classe de antibióticos utilizada na profilaxia durante o procedimento. (Rosario e cols., 2012) (Loeb e cols., 2012)

Após a realização do diagnóstico de CaP, o paciente deve ser avaliado quanto ao prognóstico da neoplasia, afim de estabelecer em qual grupo de risco o mesmo se encontra e, portanto, determinar qual tratamento dever ser indicado, além de ser possível predizer o grau de agressividade do tumor. Atualmente, as principais ferramentas para avaliar o prognóstico do CaP são: escore de Gleason; PSA; TR; densidade do PSA e estadiamento clínico.

Apesar de ser um dos principais fatores para avaliação prognóstica, o escore de Gleason também apresenta falhas, principalmente quando o material

avaliado é colhido através da BxP, provavelmente devido aos artefatos do método e a não uniformidade da avaliação pelos patologistas. Pode haver falta de concordância dos resultados do Gleason na peça da BxP em comparação com a peça cirúrgica pós prostatectomia radical entre 20-50% dos casos, o que compromete o planejamento terapêutico. Leite e cols em 2009 identificaram um valor de Gleason super-estimado na BxP em 14% e sub-estimado em 29,1%, sendo que a concordância entre o escore de Gleason da BxP e da peça de prostatectomia radical ocorreu em 56,9% dos pacientes. (Leite e cols., 2009).

Assim como a avaliação do diagnóstico do CaP, a utilização do PSA e TR na avaliação prognóstica também apresenta limitações devido à falta de especificidade dessas ferramentas, principalmente na avaliação pré-tratamento. O valor preditivo positivo do PSA para a identificação de metástases ósseas ou linfadenopatia pélvica no CaP é elevado quando o valor do $PSA > 20 \text{ ng/ml}$, contudo os casos com valores de $PSA < 20 \text{ ng/ml}$, sem outro fator associado, tem especificidade limitada para detecção de doença disseminada. (Hoenig e cols., 1997). Em relação ao TR, o seu valor prognóstico se restringe aos casos mais avançados, nos quais há evidente extensão extraprostática do tumor a palpação, enquanto que nos casos com TR normal não é possível prever evolução desfavorável.

Alguns desses critérios são utilizados em protocolos de avaliação de risco da neoplasia, como os critérios de Epstein (Epstein e cols., 1994) (Bastian e cols., 2004), os quais foram criados para possibilitar identificação de tumores de próstata insignificantes, ou seja, tumores de evolução favorável que possam ser inclusos em observação vigilante, sem necessidade de tratamento ativo

precocemente. Contudo, foi evidenciado que mesmo quando aplicados critérios restritos como os de Epstein ou outros critérios de risco nos quais são utilizados os mesmos fatores prognóstico, há falha na identificação de doença insignificante em quase 20% dos casos, como presença de extensão extraprostática, estadio patológico desfavorável, invasão de vesículas seminais, linfonodos comprometidos ou escore de Gleason desfavorável. (Ploussard e cols., 2010)

Recentemente, a ressonância magnética da próstata vem sendo estudada tanto como ferramenta de diagnóstico como prognóstico do CaP, com resultados promissores nos estudos iniciais, como Heijmink, em 2011, quando demonstrou a possibilidade de utilização do método na detecção precoce do CaP e, desse modo, a possibilidade de evitar biópsias desnecessárias quando utilizamos apenas o PSA e TR como ferramentas de triagem. Em 2012, Barentz, publicou um estudo no qual descreve um escore chamado PI-RADS (*Prostate Imaging Reporting and Data System*) em que de acordo com as características da imagem a lesão pode ser classificada quanto ao risco de CaP, variando a pontuação entre 1 e 5, sendo 1 o risco mais baixo e cinco o risco mais elevado. Contudo, a aplicação clínica ainda é questionável devido a necessidade de padronização dos protocolos de realização dos exames, assim como os critérios de diagnóstico, além da necessidade de realização de estudos prospectivos validados.

O estudo do CaP a nível molecular se faz necessário para que torne possível uma transição entre o conhecimento de uma patologia desconhecida, pouco entendida a nível molecular e com um curso clínico variável para uma

patologia com subtipos homogêneos, critérios moleculares e perfis de risco distintos. Dessa maneira, poderemos traçar estratégias de tratamento específicos. (Barbieri e cols., 2014)

Desse modo, fica evidente a necessidade de melhora na avaliação diagnóstica e prognóstica do CaP com métodos de maior sensibilidade, para tornar mais acurado o diagnóstico dos tumores; além de métodos com maior especificidade, para reduzir a quantidade de biópsias desnecessárias.

1.2. Marcadores moleculares em CaP

A Introdução dos biomarcadores tem revolucionado a prática médica e em especial a oncologia. Podem ser detectados a partir de amostras teciduais obtidas por biópsia ou ressecção cirúrgica, através de dosagem sanguínea ou de forma não invasiva de fluidos corporais, como a urina. Como o CaP é uma doença multifocal e geneticamente heterogênea, novos testes diagnósticos provavelmente utilizarão painéis desses marcadores para tornar a avaliação mais acurada. (Shah e cols., 2004)

As utilidades dos marcadores são realizar rastreamento populacional de determinada patologia, nesse caso específico, o CaP; realizar estratificação da população portadora de CaP e, assim, poder diferenciar qual paciente com esta neoplasia deve ser tratado mais agressivamente, daqueles que poderiam ser observados; conseguir determinar com maior acurácia qual paciente com PSA elevado e BxP previamente negativa tem maior probabilidade de portar um foco

de CaP e desse modo ser melhor investigado; além de conseguir monitorar os pacientes após tratamento.

O teste ideal é aquele que é sensível; é específico; é não invasivo e seguro; consegue detectar algo que é comum, danoso e determinar se a terapia será efetiva; além de ter bom custo-benefício; e que seja simples (Shahrokh e cols., 2008). Apesar de muitos marcadores sanguíneos já terem sido investigados e correlacionados ao CaP, nenhum marcador isoladamente está próximo de atingir acurácia diagnóstica ou prognóstica ideal para a neoplasia maligna de próstata. (Bensalah e cols., 2008)

A análise de marcadores na urina se constitui a forma mais atraente de estudo devido à facilidade de coleta das amostras e não-invasividade do método. Além disso, ao contrário dos marcadores séricos, os urinários necessitam de pouca quantidade de amostragem, não são alterados pelo metabolismo hepático e tem a capacidade de monitorar CaP com foco heterogêneo. (Truong e cols., 2013) (Jamaspishvili e cols., 2010)

Desde a década de 90, muitos marcadores passaram a ser avaliados utilizando como meio a urina devido as vantagens advindas do método, contudo a maioria deles ainda não são utilizados na prática clínica por motivos diversos, principalmente relacionados a maneira que os estudos são realizados, como falta de reprodutibilidade do método, comparação entre grupos não comparáveis, entre outros. (Prensner e cols., 2012)

Dentre os genes avaliados na urina, alguns foram testados quanto a sua capacidade em detectar precocemente assim como predizer agressividade, por

exemplo os genes com modificações epigenéticas, como o GSTP1 e o RASSF1A; os genes altamente específicos para o CaP, como o PCA3, o TMPRSS2-ETS e o AMACR; entre outros. (Hessels e cols., 2013)

As alterações do DNA celular como, metilação ou acetilação fazem parte das alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento do CaP. Dentre os genes que participam desse evento, o GSTP1, que é detectado em 90% dos pacientes com CaP e não detectado em pacientes com HPB, além de poder ser detectado no ejaculado de pacientes com a neoplasia. Outro gene também envolvido com as alterações do DNA celular, o RASSF1A é um supressor tumoral envolvido em várias neoplasias, como mama, rim, fígado, pulmão e próstata. A metilação desse gene está associado a tumores mais agressivos e de maior grau. De um modo geral, esses genes são altamente específicos para câncer, são frequentes e estáveis. (Nakayama e cols., 2003) (Kuzmin e cols., 2002).

O TMPRSS2-ETS é uma fusão genética entre a serina protease transmembrana 2 e um oncogene homólogo ao vírus eritroblastose da família ETS. Essa fusão está presente em 50% dos casos de CaP e tem uma especificidade alta para neoplasia prostática, além de estar relacionado a agressividade tumoral, como casos com PSA elevado, elevado grau de diferenciação e morte por câncer. (Hessels e cols., 2013).

O AMACR, gene da família das racemases, é encontrado superexpresso no CaP e nos casos metastáticos e resistentes a castração, podendo ser avaliado na urina, no sangue e no tecido. (Luo e cols., 2002)

Atualmente, um dos marcadores urinários mais estudados em CaP é o PCA3, que é um segmento não-codificado de RNAm específico da próstata que está superexpresso em mais de 95% dos casos de CaP, não está relacionado ao volume prostático, independe do PSA e tem aparente relação com agressividade tumoral (Martinez-Piñero e cols., 2010). O PCA3 é colhido através da urina após massagem prostática e apresenta especificidade elevada para a detecção do CaP, em torno de 78%. (Figura 1) (Aubin e cols., 2010). Apesar de ser um marcador amplamente estudado, ainda não é um consenso sua utilização na prática clínica devido a dificuldade de encontrar um ponto de corte ideal de avaliação e alguns estudos não comprovaram sua eficácia em prever evolução dos pacientes com a neoplasia, ou seja, seu benefício ainda é questionável.

*Diagrama extraído do site: <http://prostate-cancer.org/pca3-a-genetic-marker-of-prostate-cancer/>

Figura 1 – Ilustração caracterizando a detecção do gene PCA3 (seta inferior) através de células prostáticas eliminadas na urina após massagem prostática, enquanto que a glicoproteína PSA (seta superior) é detectado na corrente sanguínea.

Vários outros marcadores têm sido estudados com o objetivo de melhorar a acurácia tanto no diagnóstico com no prognóstico do CaP. Antunes e cols. em 2008 avaliaram o valor diagnóstico da expressão de 6 genes no tecido prostático de pacientes com CaP localizado e evidenciaram que o antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) se apresenta superexpresso e o pepsinogênio C (PGC) subexpresso nas amostras de CaP em comparação com pacientes portadores de HPB, o que corrobora com estudos prévios da literatura (Ghosh, 2004; Melle, 2005; Kon, 2008).

O GREB1 é um gene envolvido no crescimento estrogênio-dependente do câncer de mama, relacionado a proliferação celular no CaP e, portanto, pode ser utilizado como marcador no CaP, inclusive com maior expressão gênica relacionada a tumores de melhor prognóstico. (Rae e cols., 2006) (Antunes e cols., 2009).

Outro importante gene sabidamente relacionado com o câncer é o gene da MMP9 (metaloproteinase-9), pertencente a família de enzimas proteolíticas ou endoproteinases que regulam a composição da matriz extracelular através da degradação de seus componentes. Nosso grupo já identificou uma superexpressão deste gene em amostras teciduais de quase 90% dos casos analisados comparados com a HPB, com média de expressão 9,2x maior (Dos Reis e cols., 2009)

Até o presente momento, com exceção do PCA3, estes genes não foram avaliados na urina quanto ao seu potencial de diagnóstico e prognóstico do CaP através da metodologia de qRT-PCR. A possibilidade de análise conjunta destes genes por um método sensível de medida da expressão gênica pode contribuir para melhorar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico desta neoplasia.

2. Objetivos

Objetivo Primário

Avaliar o perfil de expressão dos genes PCA3; MMP9; GREB1; PSMA; e hK3 na urina de pacientes portadores de câncer de próstata em relação a pacientes sem suspeita da doença;

Objetivo Secundário

Comparar os perfis de expressão dos genes PCA3; MMP9; GREB1; PSMA; e hK3 na urina de pacientes portadores de câncer de próstata de acordo com os fatores prognósticos antes do tratamento, como escore de Gleason, PSA, estadiamento clínico, densidade do PSA, número de fragmentos positivos na BxP, porcentagem dos fragmentos envolvidos; e após o tratamento (estadio patológico, escore de Gleason, volume tumoral, envolvimento de linfonodos e vesículas seminais).

3. Material e Métodos

3.1 Pacientes

O estudo incluiu prospectivamente 46 pacientes portadores de CaP e 28 pacientes sem suspeita para CaP atendidos nos ambulatórios de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e no Instituto de Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) entre Outubro/2012 e Fevereiro/2013. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM55) da FMUSP.

Os pacientes foram selecionados para a pesquisa de acordo com a livre demanda dos ambulatórios, após preencherem os critérios de inclusão do estudo e aceitarem participar através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), modelo este redigido e baseado no Manual de Ética em Pesquisa do Comitê de Ética da Instituição, e aprovado sob nº0833/11.

3.2. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão do grupo de pacientes portadores de CaP foram: presença de CaP comprovado através de BxP, localizado ou metastático; estadiamento clínico documentado; ausência de tratamento prévio para a neoplasia prostática; ausência de tratamento radioterápico ou cirúrgico em região pélvica prévios.

Os critérios de inclusão para os pacientes sem CaP foram: PSA abaixo de 2,5 ng/ml; toque retal com próstata sem nódulos ou alterações de consistência; sem história familiar de CaP; pacientes não-negros; ausência de

uso de sonda vesical; ausência de história de biópsia de próstata; ausência de cirurgia prostática prévia. As características clínico-patológicas dos pacientes portadores de CaP e clínico-epidemiológicas dos pacientes do grupo controle estão resumidas na tabela 1 a seguir. Como pode-se notar os pacientes portadores de CaP foram estatisticamente mais velhos e apresentaram níveis de PSA mais elevados em comparação com o grupo controle. Entre os pacientes com CaP, cerca de metade apresentaram escore de Gleason na biópsia igual a 6 e 91% apresentaram doença clinicamente confinada à próstata.

Tabela 1 – Dados Clínico-Epidemiológicos dos pacientes portadores de CaP e grupo controle.

Características	CaP (n=46)	Controle (n=28)	p
Idade (anos)			0,01
Mediana	68	60	
Min-max	55-81	40-77	
PSA (ng/dL)			0,0003
Mediana	8,14	1,0	
Min-max	2,8-94	0,4-2,5	
Toque retal			NA*
Normal	23 (52%)	28 (100%)	
Anormal	22 (48%)	0 (0%)	
Peso da próstata (g)			0,742
Mediana	40	35	
Min-max	20-93,6	17,8-75,5	
Escore de Gleason		NA*	NA*
6	22 (47,8%)	NA*	
>6	24 (52,1%)	NA*	
Estadiamento Clínico		NA*	NA*
cT1c	23 (50%)	NA*	
cT2	19 (41%)	NA*	
cT3-4	4 (9%)	NA*	

NA*: não aplicável

3.3 Coleta das amostras de urina

Todos os pacientes foram submetidos à entrevista para avaliação de parâmetros clínicos (idade; raça; história familiar de CaP; antecedentes

peçoais e patológicos; PSA total; relação PSA livre/total; densidade do PSA, peso prostático; BxP prévia), foram informados sobre o estudo através do TCLE. Após preenchimento dos critérios de inclusão, foi coletada amostra de urina do primeiro jato (50-100ml) após massagem prostática (3 compressões na direção base para ápice: em lobos laterais e linha média). O material foi colhido no ambulatório de urologia, e encaminhado para o LIM55, onde era processado. As expressões dos genes PCA3, PSMA, hK3, GREb1 e MMP9 foram medidas através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e posteriormente foi realizada análise da expressão da MMP9 através de ELISA.

A tabela 2 descreve os genes avaliados e a *B2M*, que foi utilizada como marcador endógeno.

Tabela 2 - Identificação dos genes e a B2M, analisados através de qRT-PCR.

Genes	Assays ID
MMP9	Hs00234579_m1
PCA3	Hs01371937_m1
GREB1	Hs00536409_m1
HK3	Hs01092839_m1
PSMA	Hs00379515_m1
B2M	Hs00984230_m1

3.4 Extração de RNA

Foram utilizados 3 métodos diferentes de extração de RNA a partir das amostras de urina. O kit no qual obtivemos um melhor aproveitamento foi o mirVana® (Ambion, Austin, Tx, EUA).

Após a urina ser centrifugada, o *pellet*, que é o sobrenadante da amostra, foi então colhido para extração do RNA. A este *pellet* foi adicionado 250 µl do tampão de lise e 10% (25 µl) do volume total de aditivo para homogeneização, sendo então colocados no gelo por 10 minutos. Logo após, foram adicionados 250 µl de fenol-clorofórmio, e as amostras foram agitadas em *vórtex* e centrifugadas na velocidade máxima (14.000 rpm) por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo onde foi adicionado um terço do volume de etanol 100%, e, então, a solução foi transferida para um filtro e centrifugada a 10.000 rpm por 15 segundos. Em seguida, realizamos lavagem com 700µl de *wash solution* 1/3, sendo a solução centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm, seguida por mais duas lavagens com 500µl de *wash solution* 2/3, centrifugada nos intervalos por 15 segundos a 10.000 rpm. Ao final foram adicionados 20 µl de água livre de *RNase* a 95°C no filtro, e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 15 segundos. O filtrado contendo o RNA foi então armazenado em *freezer* a - 80°C até ser utilizado.

A pureza e a concentração foram estimadas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280 nM).

3.5 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 2µg de RNA utilizando-se o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) o qual utiliza a Transcriptase reversa *MultiScribe™* e primers randômicos.

O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20µL. A este volume foi acrescentado 4µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 µL do mix de dNTPs (25X), 4µL do tampão da enzima (10X), 2µL (50U/µl) da enzima transcriptase reversa e 8,4µl de água nuclease free. A solução foi submetida a ciclos de temperaturas (25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min) em um termociclador Veridi® (Applied Biosystems). Ao final da reação o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

3.6.qRT-PCR

A expressão dos genes estudados foi avaliada a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) (plataforma Abi7500) utilizando-se o protocolo TaqMan® (*Applied Biosystems*).

Experimentos iniciais de quantificação absoluta com o gene controle β2-microglobulina (B2M) validaram o cDNA antes da realização dos experimentos de quantificação do gene de interesse. Para quantificação relativa dos genes em estudo normalizamos a expressão destes em relação à expressão do gene controle B2M.

Para amplificação dos fragmentos desejados foram utilizadas as seguintes condições de reação: 5,0 µl do master mix *taqman*, 0,5 µl de *primer* (contendo a sonda marcada) (tabela 2), 3,5 µl de água destilada deionizada e 1,0 µl de cDNA, somando um total de 10 µl para cada reação. A condição usual de programação dos ciclos foi um passo a 50°C por dois minutos, um passo a 94°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 60 segundos.

Para calcular a expressão relativa dos genes alvo foi utilizado o método $\Delta\Delta C_T$, que utiliza a seguinte fórmula: $\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ do gene alvo, amostra de CaP} - C_T \text{ do controle endógeno, amostra de CaP}) - (C_T \text{ do gene alvo, amostra de HPB} - C_T \text{ do controle endógeno, amostra de HPB})$. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e cols, 2001).

Devido à baixa celularidade na urina ser um fator limitante para análise da expressão gênica, não conseguimos analisar todos os genes em todos os casos. A tabela 3 demonstra a porcentagem de aproveitamento que obtivemos para cada um dos genes analisados.

Tabela 3 - Porcentagem de aproveitamento das amostras de urina para análise da expressão gênica nos pacientes portadores de CaP em relação ao grupo controle.

Análise da amostragem	PCA3	PSMA	GREb1	hK3	MMP9
Total	46	46	46	46	46
Expressos	19	37	41	46	42
% Expressos	41%	80,4%	89,1%	100%	91,3%

3.7 Elisa

A avaliação de nível proteico de MMP9 foi feito através do teste de ELISA. O primeiro passo para a realização da técnica de ELISA é fazer a diluição do padrão. O padrão foi reconstituído com tampão diluente padrão conforme instrução do fabricante (*Sigma-Aldrich®*, St Louis, MO). Esta reconstituição demora por volta de 10 minutos. O segundo passo foi a diluição seriada do padrão do kit (*Human MMP9 Elisa Kit*). Essa diluição seriada funciona como um controle do método. Ao final da leitura se os marcadores padrão apresentarem um perfil desejado é sinal que a técnica foi realizada de forma correta. Após a diluição do padrão adicionamos na placa 100 µl de urina de cada paciente em duplicata e o processo foi conduzido conforme os protocolos convencionais descritos pelo fabricante.

A placa foi tampada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Após este tempo aspiramos a solução e lavamos 4 vezes com um tampão de lavagem próprio do Kit, os poços foram secos em papel toalha e então foi adicionado 100 µl de biotina conjugada. As amostras foram incubadas por mais 1 hora a temperatura ambiente. Novamente a solução foi aspirada e lavada mais 4 vezes. Então, adicionamos 100 µl de Estreptavidina-HRP e a placa incubada por 30 min a temperatura ambiente também. Após este período lavamos mais 4 vezes com a solução de lavagem do kit, secamos e adicionamos 100 µl de cromógeno estabilizado que também incubou por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após este período adicionamos 100 µl de stop solution, e por fim foi realizada a leitura em leitor de ELISA a 450 nm.

3.8 Análise estatística

Para análise dos níveis de expressão dos 5 genes de acordo com os fatores prognósticos antes do tratamento, como escore de Gleason, nível de PSA (ng/ml), estágio clínico (TNM), número de fragmentos positivos na BxP, porcentagem de fragmentos envolvidos e densidade do PSA além das características anatomopatológicas após o tratamento (estadio patológico, escore de Gleason da peça, volume tumoral, envolvimento de linfonodos e/ou vesículas seminais) foram utilizados os testes de Mann-Whitney, T-test ou Qui-quadrado.

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS 19.0. Em toda análise estatística foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram p-valor inferior a 5% ($p < 0,05$).

4.Resultados

4.1 Diagnóstico

A comparação dos níveis de expressão tecidual da B2M entre as amostras de urina dos pacientes portadores de CaP e grupo controle apresentou padrão de expressão homogênea e desse modo possibilitou a avaliação das amostras utilizadas no estudo.

A análise dos cinco genes através do método de qRT-PCR nas amostras de urina demonstrou que a MMP9 está superexpressa e PSMA, GREB1, hK3 e PCA3 estavam subexpressos em pacientes com CaP, em comparação ao grupo controle (figura 2) (tabela 4). A superexpressão de MMP9 ocorreu em 85,7% dos casos, com uma média de superexpressão 6,4x maior em relação aos pacientes do grupo controle.

Figura 2 – Níveis de expressão dos marcadores urinários (PCA3, PSMA, GREB1, hK3 e MMP9) nos pacientes portadores de CaP em relação aos pacientes do grupo controle.

Tabela 4 - Média de expressão dos genes estudados nos pacientes com CaP, comparados com os pacientes do grupo controle.

	PCA3	PSMA	GREb1	hK3	MMP9
Média	1,3x	1,02x	0,57x	0,65x	6,4x
Mediana	0,01x	0,09x	0,07x	0,23x	4,49x
Superexpressão	10,5%	16,2%	19,5%	26%	85,7%
Subexpressão	89,5%	83,8%	80,5%	74%	14,3%

Os níveis de expressão da MMP9 também foram avaliados utilizando o ELISA e embora não tenhamos encontrado significância estatística foi encontrada uma expressão maior da proteína MMP9 nos pacientes com CaP quando comparados com os pacientes do grupo controle (1,89 x 1,35) ($p=0,082$). Com os valores de expressão proteica disponibilizados no teste de ELISA, construímos uma curva ROC. A área sob a curva foi de 0,628 (figura 3), portanto a expressão proteica de MMP9 na urina não foi considerada satisfatória para discriminar indivíduos com CaP.

Figura 3 –Curva ROC para MMP9 urinária no diagnóstico dos pacientes com CaP.

4.2 Prognóstico

A análise da expressão dos cinco genes foi correlacionada com os fatores prognósticos mais comumente utilizados, como escore de Gleason; estadio clínico; níveis de PSA (ng/ml); densidade do PSA; número de fragmentos positivos na biópsia; e porcentagem dos fragmentos positivos.

Em relação ao escore de Gleason da biópsia (6 ou >6), nenhum gene demonstrou resultados estatisticamente significantes, contudo pôde ser observado que numericamente o PCA3 e a MMP9 apresentaram maiores níveis de expressão nos casos de Gleason 6 (expressão 7x maior e 2x maior em relação ao controle, respectivamente). (Tabela 5).

Tabela 5 - Expressão dos genes de acordo com o escore de Gleason.

Escore de Gleason da biópsia			
Média (desvio padrão)			
Genes	≤6 (n=)	>6 (n=)	p
PCA3	2,37 (9)	0,34 (10)	0,374*
PSMA	1,07 (17)	1,25 (18)	0,847*
GREb1	0,81 (20)	0,52 (19)	0,432*
hK3	0,69 (22)	0,74 (22)	0,839*
MMP9	8,53 (21)	4,08 (20)	0,162*

*T-test

Em relação ao estadió clínico (<cT2a ou ≥cT2a), não houve diferença estatística entre as expressões dos genes, contudo pode ser evidenciado maiores níveis de expressão do PCA3 e PSMA nos estádios <cT2a (6x e 2x maior) (p= 0,383 e p= 0,847, respectivamente) (Tabela 6).

Tabela 6 - Expressão dos genes de acordo com o estadió clínico (TNM).

Estadio Clínico			
Média (desvio padrão)			
Genes	<cT2a (n=)	≥cT2a (n=)	p
PCA3	2,35 (9)	0,36 (10)	0,383*
PSMA	1,61 (18)	0,78 (18)	0,381*
GREb1	0,82 (21)	0,53 (19)	0,420*
hK3	0,65 (23)	0,80 (22)	0,584*
MMP9	7,93 (22)	4,54 (19)	0,262*

*T-test

Na avaliação dos 5 genes em relação aos níveis de PSA (<10 ng/ml ou ≥10 ng/ml) não foi possível identificar nenhuma diferença estatística em relação aos níveis de expressão dos genes, contudo foram identificados maiores níveis de expressão dos genes PCA3 e PSMA no grupo com PSA ≥10 ng/dL (12x e 4x maior) (p=0,165; e p=0,114, respectivamente). (Tabela 7).

Tabela 7- Expressão dos genes de acordo com os níveis de PSA (ng/ml).

PSA			
Média (desvio padrão)			
Genes	<10 (n=)	≥10 (n=)	p
PCA3	0,28 (13)	3,50 (6)	0,165*
PSMA	0,53 (22)	2,24 (14)	0,114*
GREb1	0,52 (24)	0,94 (16)	0,252*
hK3	0,81 (27)	0,60 (18)	0,459*
MMP9	5,42 (25)	7,81 (16)	0,467*

*T-test

Não foi encontrada diferença estatística nos níveis de expressão dos genes com relação a densidade do PSA (<0,15 ou ≥0,15), contudo o gene PCA3 apresentou maiores níveis de expressão nos casos com densidade ≥0,15 (102x maior). (Tabela 8)

Tabela 8 - Expressão dos genes de acordo com a densidade do PSA.

Densidade do PSA			
Média (desvio padrão)			
Genes	<0,15 (n=)	≥0,15 (n=)	p
PCA3	0,02 (7)	2,05 (12)	0,390*
PSMA	0,93 (10)	1,29 (26)	0,724*
GREb1	0,45 (11)	0,77 (29)	0,425*
hK3	0,63 (12)	0,76 (33)	0,691*
MMP9	6,24 (11)	6,40 (30)	0,965*

*T-test

Os níveis de expressão dos genes não apresentaram diferença estatística em relação ao número de fragmentos positivos na biópsia de próstata (1 ou ≥2), porém os genes PCA3 e PSMA apresentaram maiores níveis de expressão quando ≥2 fragmentos eram positivos (11x e 12x maiores, respectivamente) (p= 0,519 e p=0,433, respectivamente) enquanto que a MMP9 apresentou maiores níveis de expressão quando <2 fragmentos era positivo (2x maior) (p=0,470) (Tabela 9).

Tabela 9 - Expressão dos genes de acordo com o número de fragmentos positivos.

Número de fragmentos positivos			
Média (desvio padrão)			
Genes	1 (n=)	2 ou mais (n=)	P
PCA3	0,18 (4)	2,05 (12)	0,519*
PSMA	0,12 (9)	1,41 (22)	0,433**
GREb1	0,54 (11)	0,71 (24)	0,680*
hK3	0,71 (13)	0,78 (26)	0,845*
MMP9	10,12 (13)	4,39 (25)	0,470**

*T-test; **Mann-Whitney

Em relação aos níveis de expressão dos genes quando avaliada a porcentagem de fragmentos envolvida com tumor (<50% ou ≥50%), foi identificado um maior nível de expressão do GREb1 nos pacientes com menor porcentagem de tumor no fragmento (4x maior), porém sem significância estatística ($p=0,065$). Os genes PCA3, PSMA e MMP9 também apresentaram maiores níveis de expressão no grupo com menos que 50% dos fragmentos envolvidos por tumor, porém sem relevância estatística ($p=101$; $p=0,570$; e $p=958$, respectivamente). (Tabela 10).

Tabela 10 - Expressão dos genes de acordo com a porcentagem de fragmentos positivos na biópsia de próstata (<50% ou ≥50%).

Porcentagem de fragmentos positivos			
Média (desvio padrão)			
Genes	<50% (n=)	≥50%(n=)	P
PCA3	7,00 (3)	0,66 (5)	0,101**
PSMA	3,34 (5)	0,18 (7)	0,570**
GREb1	1,93 (7)	0,53 (8)	0,065*
hK3	0,79 (8)	0,96 (11)	0,739*
MMP9	12,13 (7)	4,28 (9)	0,958**

*T-test; **Mann-Whitney

Em relação a avaliação dos níveis de expressão da MMP9 comparando-os aos fatores prognósticos utilizando o ELISA, não observamos nenhuma diferença estatisticamente entre os fatores analisados. (Tabela 11)

Tabela 11 - Expressão da MMP9 com Elisa de acordo com os fatores prognósticos como PSA (<10 ou ≥10), densidade (<0,15 ou ≥0,15), escore de Gleason (6 ou >6), número de fragmentos positivos (1 ou ≥2), porcentagem dos fragmentos (<50% ou ≥50%) e estadiamento clínico (<cT2a ou ≥cT2a).

MMP9			
Fatores Prognósticos		CaP (n=)	p
PSA(ng/dL)	<10	1,88 (17)	0,584*
	≥10	1,62 (12)	
Densidade	<0,15	1,43 (6)	0,271*
	≥0,15	2,13 (16)	
Gleason	6	1,92 (18)	0,393*
	>6	1,51 (11)	
Número de fragmentos	1	1,27 (6)	0,581**
	≥2	1,76 (18)	
Porcentagem de fragmentos	<50%	1,99 (12)	0,833*
	≥50%	1,88 (12)	
Estadiamento clínico	<cT2a	1,61 (16)	0,589**
	≥cT2a	2,09 (13)	

*T-test; **Mann-Whitney

Realizamos uma análise conjunta entre a expressão dos genes e os fatores prognósticos (tabelas 12 a 16). A análise dos genes MMP9 e hK3 em conjunto não apresentou nenhuma relevância estatística. A superexpressão conjunta dos genes MMP9 e GREb1 está fortemente associada a pacientes com <50% dos fragmentos acometidos, com significância estatística ($p=0,036$). A superexpressão conjunta da MMP9 e PSMA foi fortemente associada a pacientes com $PSA \geq 10$ ng/ml ($p=0,007$).

Tabela 12. Expressão combinada de genes em relação ao nível do PSA (ng/ml).

PSA				
Porcentagem % (n=)				
Combinação de Genes		<10	≥ 10	p
MMP9/hK3	Subexpressão	75,0%(18)	81,3%(13)	0,643***
	Superexpressão	25%(6)	18,8%(3)	
MMP9/GREb1	Subexpressão	87%(20)	60%(9)	0,056***
	Superexpressão	13%(3)	40%(6)	
MMP9/PSMA	Subexpressão	100%(21)	69,2%(9)	0,007***
	Superexpressão	0%(0)	30,8%(4)	

***Qui-Quadrado

Tabela 13 - Expressão combinada de genes em relação ao estadiamento clínico (TNM).

Estadiamento clínico				
Porcentagem % (n=)				
Combinação de Genes		<cT2a	≥cT2a	p
MMP9/hK3	Subexpressão	77,3%(17)	77,8%(14)	0,970***
	Superexpressão	22,7%(5)	22,2%(4)	
MMP9/GREb1	Subexpressão	70%(14)	83,3%(15)	0,334***
	Superexpressão	30%(6)	16,7%(3)	
MMP9/PSMA	Subexpressão	88,2%(15)	88,2%(15)	1***
	Superexpressão	11,8%(2)	11,8%(2)	

***Qui-Quadrado

Tabela 14 - Expressão combinada de genes em relação ao escore de Gleason.

Escore de Gleason				
Porcentagem % (n=)				
Combinação de Genes		6	>6	p
MMP9/hK3	Subexpressão	80%(16)	75%(15)	0,705***
	Superexpressão	20%(4)	25%(5)	
MMP9/GREb1	Subexpressão	73,7%(14)	78,9%(15)	0,703***
	Superexpressão	26,3%(5)	21,1%(4)	
MMP9/PSMA	Subexpressão	93,8%(15)	83,3%(15)	0,347***
	Superexpressão	6,3%(1)	16,7%(3)	

***Qui-Quadrado

Tabela 15 - Expressão combinada de genes em relação a densidade do PSA.

Densidade do PSA				
Porcentagem % (n=)				
Combinação de Genes		<0,15	≥0,15	p
MMP9/hK3	Subexpressão	81,2%(9)	75,9%(22)	0,687***
	Superexpressão	18,2%(2)	24,1%(7)	
MMP9/GREb1	Subexpressão	90%(9)	71,4%(20)	0,236***
	Superexpressão	10%(1)	28,6%(8)	
MMP9/PSMA	Subexpressão	100%(9)	84%(21)	0,201***
	Superexpressão	0%(0)	16%(4)	

***Qui-Quadrado

Tabela 16 - Expressão combinada de genes em relação a porcentagem do fragmento na biópsia de próstata.

Porcentagem do fragmento				
Porcentagem % (n=)				
Combinação de Genes		<50%	≥50%	p
MMP9/hK3	Subexpressão	71,4%(5)	66,5%(6)	0,838***
	Superexpressão	28,6%(2)	33,3%(3)	
MMP9/GREb1	Subexpressão	33,3%(2)	87,5%(7)	0,036***
	Superexpressão	66,7%(4)	12,5%(1)	
MMP9/PSMA	Subexpressão	75%(3)	100%(7)	0,165***
	Superexpressão	25%(1)	0%(0)	

***Qui-Quadrado

Entre os 46 pacientes portadores de CaP submetidos a avaliação no estudo, 23 (50%) foram submetidos a prostatectomia radical (PR) e, desse modo, foi possível a avaliação de fatores prognósticos disponibilizados pelo anatomopatológico da peça (estádio patológico, escore de Gleason, volume tumoral, acometimento de vesículas seminais e linfonodos) e a correlação com os níveis de expressão dos genes urinários em estudo.

As características anatomopatológicas dos 23 pacientes submetidos a PR estão descritas nas figuras 4 a 8.

Figura 4 - Representação gráfica do estadio patológico dos pacientes submetidos a PR.

Figura 5 - Representação gráfica do escore de Gleason dos pacientes submetidos a PR.

Figura 6 - Representação gráfica do volume tumoral dos pacientes submetidos a PR.

Figura 7 - Representação gráfica do acometimento das vesículas seminais dos pacientes submetidos a PR.

Figura 8 - Representação gráfica do acometimento de linfonodos dos pacientes submetidos a PR.

A análise da expressão dos genes de acordo com as características anatomopatológicas da peça cirúrgica demonstrou que o GREb1 foi significativamente mais expresso nos casos de estadio patológico pT2 em comparação com os estádios pT3-4 ($p=0,031$), assim como o PCA3 estava superexpresso nos casos de maior volume tumoral ($\geq 11\%$) em comparação com os casos de menor volume tumoral ($< 11\%$) ($p=0,006$). Os demais genes analisados não apresentaram diferenças estatísticas relação com os fatores anatomopatológicos. (Tabelas 17 a 21)

Tabela 17 - Expressão dos genes de acordo com o estadiopatológico (pTNM).

Estadio Patológico (n=)			
Genes	pT2	pT3-4	p
PCA3	0,40 (9)	0,44 (2)	0,655*
PSMA	0,65 (15)	0,08 (4)	0,481*
GREb1	0,66 (17)	0,009 (4)	0,031**
hK3	0,96 (17)	0,56 (6)	0,708**
MMP9	6,43 (16)	4,67 (5)	0,566*

*T-test; **Mann-Whitney

Tabela 18 - Expressão dos genes de acordo com o escore de Gleason.

Escore de Gleason (n=)			
Genes	6	>6	p
PCA3	0,37 (10)	0,55 (1)	0,774*
PSMA	0,57 (17)	0,17 (2)	0,707*
GREb1	0,59 (19)	0,017 (2)	0,451*
hK3	0,90 (21)	1,11 (3)	0,744*
MMP9	6,21 (19)	4,13 (2)	0,641*

*T-test

Tabela 19 - Expressão dos genes de acordo com o volume tumoral.

Escore de Gleason (n=)			
Genes	<11%	≥11%	p
PCA3	0,020 (7)	0,909 (4)	0,006**
PSMA	0,059 (8)	0,42 (9)	0,158*
GREb1	0,29 (9)	0,27 (9)	0,942*
hK3	0,75 (10)	0,91 (10)	0,739*
MMP9	8,60 (9)	3,82 (9)	0,297**

*T-test; **Mann-Whitney

Tabela 20 - Expressão dos genes de acordo com o acometimento de vesículas seminais.

Acometimento de vesículas seminais (n=)			
Genes	Não	Sim	p
PCA3	0,34 (11)	----- (0)	-----
PSMA	0,57 (17)	0,17 (2)	0,707*
GREb1	0,59 (19)	0,15 (2)	0,449*
hK3	0,90 (21)	0,42 (2)	0,534*
MMP9	6,36 (19)	2,72 (2)	0,410*

*T-test

Tabela 21 - Expressão dos genes de acordo com o acometimento de linfonodos.

Acometimento de linfonodos (n=)			
Genes	Não	Sim	p
PCA3	0,37 (10)	0,03 (1)	0,756*
PSMA	0,60 (16)	0,11 (3)	0,582*
GREb1	0,38 (16)	0,01 (3)	0,430*
hK3	0,72 (18)	0,61 (3)	0,857*
MMP9	5,31 (16)	5,26 (3)	0,988*

*T-test

As expressões dos genes em conjunto MMP9/hK3, MMP9/GREb1 e MMP9/PSMA e as características anatomopatológicas também foram analisadas, porém não houve significância estatística em nenhuma das comparações.

5. Discussão

No presente estudo, avaliamos pela técnica de qRT-PCR a expressão de cinco genes na urina de pacientes portadores de CaP e comparamos os níveis de expressão com pacientes sem a neoplasia, além de relacioná-los com os fatores prognósticos clássicos pré e pós tratamento. Foi evidenciado que a MMP9 urinária apresentou um padrão de superexpressão em 85,7% dos pacientes portadores de CaP em relação aos pacientes do grupo controle, com nível de expressão 6,4x maior. Esse resultado foi ratificado com a análise da expressão da proteína MMP9 através de ELISA, na qual foi evidenciada uma superexpressão da mesma em comparação com pacientes do grupo controle.

Em nosso estudo também foi possível correlacionar os níveis de expressão dos genes urinários com os fatores prognósticos após o tratamento (PR). Nesse caso, o GREb1 estava fortemente associado aos casos mais favoráveis, com estadiopatológico pT2 em comparação com os estádios mais avançados (pT3-4), enquanto o PCA3 esteve fortemente associado a tumores de maior volume ($\geq 11\%$).

Os genes em estudo não se correlacionaram de maneira estatisticamente significativa com os fatores prognósticos pré-tratamento, contudo, gostaríamos de ressaltar alguns resultados relevantes, como níveis de expressão do PCA3 12x maior nos pacientes com PSA $\geq 10\text{ng/dL}$, 102x maior nos pacientes com densidade $\geq 0,15$ e 11x maior nos pacientes com número de fragmentos na biópsia ≥ 2 . O gene PSMA teve expressão 4x maior em pacientes com PSA $\geq 10\text{ng/dL}$, enquanto que a MMP9 apresentou expressão maior em casos com prognóstico mais favorável, como escore de Gleason 6

(2x maior), número de fragmentos <2 (2x maior) e <50% dos fragmentos acometidos (3x maior).

Ainda em relação aos fatores prognósticos, quando os relacionamos com a expressão combinada dos genes, foi possível identificar uma associação entre a superexpressão da MMP9/GREb1 em conjunto com pacientes com <50% dos fragmentos acometidos na BxP ($p=0,036$) enquanto que a superexpressão combinada da MMP9/PSMA esteve associada a pacientes com CaP e PSA mais elevado ($p=0,007$), o que pode assim estar relacionado a pacientes com pior prognóstico.

Os exames que utilizam a urina como meio têm as vantagens de serem não-invasivos, de fácil coleta, já que as células prostáticas são diretamente liberadas na uretra após a massagem prostática, além de serem reproduzíveis. Por esses motivos, no futuro, a urina provavelmente será o meio ideal em testes não-invasivos com biomarcadores e essa deverá ser a nova fronteira da urologia a ser superada em relação a avaliação diagnóstica e prognóstica do CaP. (Truong e cols., 2013)

A utilização desses marcadores urinários pode agregar informação ao cenário propedêutico atual, como predizer tumores de maior volume ou pior prognóstico assim como esclarecer dúvida diagnóstica entre CaP e patologias benignas da próstata, principalmente a HPB. Em casos nos quais o PSA é persistentemente elevado e a BxP é negativa para CaP, a superexpressão da MMP9 urinária poderia predizer os pacientes que se beneficiariam da repetição da BxP e, desse modo, teriam maior possibilidade de serem portadores de um ou mais focos de neoplasia maligna. Aqueles com níveis normais dos

marcadores urinários, poderiam, assim, serem apenas acompanhados clinicamente e poupados dos riscos de uma BxP desnecessária.

Outra aplicação viável de ser realizada são os casos de pacientes portadores de CaP indolente ou insignificante que entraram em protocolos de acompanhamento por vigilância ativa, alternativa realizada atualmente para os casos de CaP com prognóstico favorável (escore de Gleason ≤ 6 ; PSA < 10 ng/ml; $< cT2a$) os quais são acompanhados clinicamente e caso evoluam com sinais de progressão clínica, como elevação do PSA, TR alterado ou piora dos padrões da BxP, são submetidos a tratamento ativo (prostatectomia radical ou RxT). Nesses casos, durante o acompanhamento, além do PSA, TR e biópsias de próstata seriadas, a utilização de marcadores urinários poderia ajudar em prever aqueles pacientes com maiores chances de progressão da doença, com pior prognóstico e, desse modo, indicar tratamento ativo mais precocemente. (Roobol e cols., 2011) (Drake e cols., 2009).

Outras aplicações clínicas envolvendo o uso de biomarcadores extraídos da urina são a possibilidade de monitorar recorrência pós tratamento definitivo (prostatectomia radical ou radioterapia) além de tornar possível o rastreamento de pacientes em uso de medicamentos que afetam os valores de PSA, como os inibidores da 5 α -redutase. (Day e cols., 2011)

Devido ao surgimento relativamente recente, a avaliação de marcadores urinários para o CaP ainda necessita de uma padronização de suas etapas de processamento afim de tornar reproduzível universalmente a sua realização. Portanto, dúvidas quanto a coleta, como a necessidade de massagem

prostática; utilização da amostra de urina, se primeiro jato ou jato médio ou urina de 24h; a utilização da urina total ou sem o sedimento após centrifugação. Ainda existe significativa heterogeneidade nos tipos de coleta, processamento e interpretação dos resultados que muito provavelmente deverão ser superados em breve devido a intensa atenção da comunidade científica a esse tipo de abordagem, tendo sido publicados mais de 600 artigos nos últimos 10 anos a respeito do assunto. (Truong e cols., 2013)

Os primeiros estudos nos quais foram descritos a presença de células de CaP na urina são provenientes do ano 1958, descritos por Papanicolaou. Nesse estudo, contudo, já ficavam evidentes as dificuldades quanto a padronização na coleta, manipulação e armazenamento da urina para posterior análise. (Foot e cols., 1958) (Krishnan e cols., 2000)

Posteriormente, na década de 80, após melhora nos aspectos técnicos de análise de moléculas na urina, Tremblay e cols. relataram o uso de 3 proteínas prostáticas secretadas na urina de pacientes jovens saudáveis, pacientes portadores de HPB e pacientes portadores de adenocarcinoma de próstata. Eles concluíram que o uso desses marcadores poderia contribuir para o entendimento das neoplasias primárias da próstata. (Tremblay e cols., 1987)

No entanto, ainda não era possível estabelecer de maneira global uma padronização na metodologia, como coleta, armazenamento, processamento da urina e análise dos achados e isso gerava algumas controversas quanto aos benefícios do uso de marcadores urinários de CaP na avaliação diagnóstica e prognóstica. Em 1997, Pannek e cols. demonstraram que a utilização de isoformas do PSA e da calicreína humana 2 (hK2) urinárias na detecção e

estadiamento do CaP não eram úteis. Segundo os autores, não foi demonstrada diferença estatística nos níveis dos marcadores acima citados entre os pacientes portadores de HPB, CaP ou saudáveis. (Pannek e cols., 1997). Em outro estudo no mesmo ano, Irani e cols descreveram os benefícios da relação PSA sérico e urinário na detecção do CaP, 8x maior do que nos pacientes sem CaP. (Irani e cols., 1997)

Essas controversas muito provavelmente se devem a falta de padronização da metodologia aplicada na análise de marcadores na urina, ressaltando que até então ainda não eram utilizadas técnicas de qRT-PCR para detecção de marcadores de CaP na urina.

As dificuldades técnicas na análise de marcadores urinários no CaP envolvem vários fatores, muitos deles ainda não esclarecidos. O material extraído da urina pode ser derivado das seguintes estruturas moleculares: proteínas; DNA; e RNA. Em geral, os marcadores que utilizam o DNA celular tem maior estabilidade do que as moléculas de RNA e proteínas, o que de certo modo facilita sua manipulação e evita perdas maiores da amostragem. Além disso, a estabilidade dos marcadores depende de variáveis como composição da urina; PH urinário; temperatura; e tempo da coleta para o processamento. Outro ponto importante é que para se estudar RNAm são necessárias uma quantidade razoável de células o que é mais difícil em amostras de urina, mesmo após massagem prostática. A instabilidade das moléculas avaliadas em nosso estudo, que foi realizado com RNA, além das variáveis ambientais citadas pode ter contribuído para a perda de algumas amostras de urina inicialmente.

Normalmente, a maioria dos estudos com marcadores urinários utilizam a urina do primeiro jato urinário após a massagem prostática teoricamente devido a maior concentração de fluido prostático nesse momento. Porém, não existem estudos comparando a utilização da urina do primeiro jato com urina do jato médio ou urina de 24 horas ou mesmo coleta de urina sem massagem prostática. A utilização da urina sedimentada após centrifugação ou o aproveitamento de toda a amostra também é um ponto ainda não esclarecido.

Os desafios na análise dos marcadores urinários envolvem alguns aspectos técnicos como a diluição da amostragem; metodologia na coleta da amostra (técnica de massagem prostática); a consideração do efeito confundidor de outros componentes urinários; e a própria degradação do biomarcador. (Truong e cols., 2013)

Como consequência das dificuldades técnicas acima descritas, não existia até a década de 90 um marcador urinário que adicionasse informações relevantes do CaP que pudesse influenciar na avaliação propedêutica dessa neoplasia. Em 1999, Bussemakers e cols. descreveram um gene altamente específico para o CaP, o DD3, um RNA não codificado localizado no cromossomo 9q21-22 que apresentou níveis de expressão 10-100x maiores no tecido tumoral em relação ao tecido não-tumoral, além de maiores níveis de expressão nos tumores menos diferenciados. (Bussemakers e cols., 1999). Posteriormente, esse gene foi avaliado na urina pós-massagem prostática de 108 pacientes candidatos a BxP por elevação do PSA ($>3,0$ ng/ml) e foi demonstrada sensibilidade e especificidade para a detecção do CaP de 67% e

83%, respectivamente, além de valor preditivo negativo de 90%. (Hessels e cols., 2003).

A partir desses estudos houve o início de uma era na qual estabeleceu-se um maior entendimento e melhor padronização das técnicas que utilizam a urina como meio para a identificação de biomarcadores em CaP. Devido a alta especificidade e superexpressão para o CaP, o DD3, que posteriormente passou a se chamar PCA3 (*Prostate Cancer Gene 3*), gerou diversos estudos na literatura afim de avaliar sua aplicabilidade na prática urológica.

O desenvolvimento de um teste que pudesse avaliar da melhor maneira possível a performance desse gene altamente específico para o CaP demorou alguns anos. Os primeiros testes avaliados utilizavam a técnica denominada *TRF-Time-Resolved Fluorescence RT-PCR*, contudo a taxa de aproveitamento da amostra ainda não era ideal, abaixo de 90%. Outro teste avaliado foi o NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*), contudo as amostras continuavam não sendo completamente aproveitadas, além de utilizarem como substrato o sedimento urinário, o que limitava o uso de todo o material genético da amostra de urina. A partir do uso do TMA (*Transcription-mediated amplification*), em 2006, foi possível um aproveitamento de quase 100% das amostras de urina através de tecnologia de marcação de alvos em exons específicos do gene estudado, além de utilizar totalmente a urina e não uma parte dela, como nos outros testes (Day JR e cols., 2011)

Desde os anos 2000, a GenProbe Inc. (Hologic Gen-Probe Inc., San Diego, CA, EUA) possui a licença mundial para utilização da tecnologia de avaliação do PCA3, através da plataforma APTIMA, que é um sistema de amplificação do RNA através da RNA polimerase e transcriptase reversa,

utilizado no kit chamado ProgenSA PCA3. O teste consiste em quantificar o número de cópias de PCA3 RNAm, PSA RNAm e posteriormente é realizado um escore no qual a quantidade total de PCA3 RNAm é dividido pela quantidade total de PSA RNAm e multiplicado por 1000. Essa é uma maneira mais efetiva de quantificar o PCA3, já que o mesmo precisa ser normalizado pela quantidade de RNA derivado da próstata e, assim, quantificar exclusivamente o material genético relacionado a célula de câncer. Quanto maior o escore, maior a especificidade para câncer. Utilizando um *cut-off* de 35, a sensibilidade é de 48%, especificidade de 79% e AUC 0,693. (Vlaeminck-Guillem e cols., 2010) (Groskopf e cols., 2006).

Em 2012, Crawford e cols analisaram o valor diagnóstico do PCA3 de maneira prospectiva em 1.962 pacientes submetidos a rastreamento de CaP. Nesse estudo, foi possível aproveitamento de 97.5% das amostras coletada utilizando o kit de análise e processamento da amostra de urina da ProgenSA PCA3® (Gen Probe Inc, San Diego, CA, USA). Os autores encontraram correlação entre os níveis de expressão do PCA3 com o Gleason e porcentagem de envolvimento na BxP, ou seja, relação da superexpressão do marcador com tumores de pior prognóstico.

Em nosso estudo, não foi possível a utilização do kit da GenProbe® e obtivemos um aproveitamento da amostra bem inferior (41%). Essa perda de amostras pode ser justificada pela falta de células prostáticas nas amostras de urina; pela instabilidade do material genético manipulado, nesse caso as cópias de RNA; ou pela dificuldade de quantificação do PCA3 RNAm através da tecnologia aplicada. Contudo, em nosso estudo, foi possível correlacionar a superexpressão do PCA3 com tumores de maior volume, com significância

estatística. Ademais, embora sem significância estatística, foi possível evidenciar uma expressão do PCA3 12x maior nos pacientes portadores de CaP com PSA mais elevado; expressão 102x maior nos pacientes portadores de CaP com densidade do PSA $\geq 0,15$; e expressão 11x maior nos pacientes com maior número de fragmentos positivos na biópsia ($p=0,165$, $p=0,390$ e $p=0,519$, respectivamente), resultados estes que podem sugerir uma maior expressão do PCA3 nos casos de pior prognóstico.

O PCA3 foi aprovado em 2008 pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) para uso nos pacientes com PSA elevado e BxP negativa afim de avaliar os pacientes que deveriam ser submetidos a novas BxPs caso fosse demonstrada superexpressão desse marcador, o que pode sugerir a presença de foco de CaP nesses pacientes. (Crawford e cols., 2012) (Deras e cols., 2008)

Portanto, os casos de dúvida diagnóstica quanto a presença de CaP, quando o paciente apresenta PSA persistentemente elevado e BxP prévia negativa, pode ser um cenário adequado para a utilização de marcadores urinários, entre os quais, o PCA3 é o marcador mais estudado, como demonstrado por Gittelman e cols que avaliou em um estudo multicêntrico com mais de 400 pacientes a capacidade do marcador em predizer o resultado da 2a BxP em pacientes na situação descrita. Foi possível encontrar uma sensibilidade de 77,5% e especificidade de 57,1%, além de um valor preditivo negativo de 90%. Concluiu-se que o PCA3 é uma ferramenta adjuvante útil em predizer o resultado da BxP em pacientes com PSA persistentemente elevado, evitando a realização de BxPs desnecessárias. (Gittelman e cols., 2013)

A importância da caracterização do perfil genético tumoral é evidente e poderia prever a evolução de determinada neoplasia, como no câncer de mama, no qual a decisão sobre a utilização de tratamento adjuvante com anticorpo monoclonal *Trastuzumab* é baseado na avaliação do gene Her2/neu através de imunohistoquímica. Em neoplasia de próstata, até o momento, ainda não existe esse marcador e a evolução clínica dos pacientes é baseada apenas em fatores clínico-patológicos, contudo mesmo pacientes com mesmas características clínico-patológicas evoluem de forma divergente e até o momento não é possível prever quais pacientes vão progredir e quais irão manter sua doença estacionada.

Com relação a MMP9, o presente estudo demonstrou um padrão homogêneo de superexpressão no CaP em relação aos pacientes do grupo controle, com média 6,4x maior. Isso corrobora os achados de estudos prévios, contudo, inova devido ao uso da expressão do RNAm na urina como meio de análise desse marcador. Como as metaloproteinases tem a característica de degradar a matriz extracelular e seus componentes e, portanto, estar relacionada a invasão e metástases, esse marcador pode ser uma ferramenta útil tanto na avaliação da agressividade tumoral, quanto utilizado como alvo de agentes terapêuticos.

Ravikumar e cols, em 2011, demonstraram em cultura de células e qRT-PCR a capacidade de invasão da membrana celular e degradação de seus componentes como o colágeno IV, fibronectina e laminina; e comprovou a superexpressão da MMP9 em estágios avançados de invasão celular. Era esperado, em nosso estudo, que fosse possível demonstrar sua

superexpressão nos casos de pior prognóstico, entretanto, não foi possível comprovar essa hipótese com significância estatística e o motivo pode estar relacionado a baixa celularidade na urina, mesmo com a massagem prostática ou dificuldades durante processamento da amostra. (Ravikumar e cols., 2011).

Uma vantagem de avaliar esse gene na urina é a possibilidade de conseguir mensurar sua expressão globalmente, ou seja, independente de qual região da próstata apresente maior expressão do marcador. Em 2010, Trudel e cols. avaliaram a expressão da MMP9 através de imunohistoquímica em pacientes portadores de CaP localmente avançados (pT3N0Mx) no tecido envolvido pelo tumor e no estroma prostático livre na mesma peça. O resultado foi uma associação entre níveis maiores de expressão da MMP9 com o escore de Gleason maiores, porém com níveis de expressões diferentes a depender do local onde era avaliado o tecido. (Trudel e cols., 2010)

Em 2009, Dos Reis e cols. demonstraram que a presença de polimorfismos no gene da MMP9 era mais frequente em pacientes com CaP do que nos pacientes sem CaP, aumentando o risco de desenvolvimento desta neoplasia (Dos Reis e cols., 2009). Sabemos que polimorfismos genéticos podem alterar a expressão gênica, e para testar esta hipótese os mesmos autores demonstraram, utilizando como meio o tecido proveniente de peças de prostatectomia radical, a superexpressão da MMP9 nos casos de CaP 9,2 vezes superior a HPB, além de relevância estatística nos casos com PSA mais elevado e maior expressão desse marcador nos casos de recorrência bioquímica, comprovando a utilidade deste marcador na propedêutica do CaP. (Dos Reis e cols., 2011)

Alguns estudos avaliaram a utilização de inibidores das metaloproteinases no tratamento do CaP, como Lara e cols., que realizou um estudo randomizado fase II em que aplicou o BMS275291, um inibidor seletivo das metaloproteinases, principalmente das MMP2 e MMP9, em pacientes portadores de CaP metastático e androgênio independente. Nesse estudo, foram randomizados 80 pacientes entre 1200mg e 2400mg e observado estabilização da doença em 39% e 17% dos casos, respectivamente, além de toxicidade grau 4 em apenas 4% do total de pacientes. (Lara e cols., 2006). Sem dúvida alguma, esse estudo abre perspectivas para a aplicação clínica desses inibidores das metaloproteinases no CaP, entretanto, é necessário evidenciar que grupo de pacientes alcançarão maior benefício com a terapia, além da necessidade de maior seletividade dos inibidores. O nosso estudo demonstrou uma superexpressão homogênea da MMP9 nos casos de CaP e esse aumento de expressão nas células tumorais pode indicar um papel das metaloproteinases como alvo em terapias contra as células neoplásicas.

Em nosso estudo, também foi realizada a detecção das proteínas da MMP9 secretadas na urina dos pacientes portadores de CaP através da técnica de ELISA e as expressões foram avaliadas de acordo com os fatores prognósticos clássicos. Essa é uma maneira viável e eficaz de detecção proteica na urina de pacientes portadores de tumores, além de exigir menos cuidados quando comparamos com análise de RNA, por exemplo, já que nesse caso, por se tratar de material mais instável, exige processamento imediato e cuidados com temperatura e armazenamento para evitar sua degradação. A análise das expressões da MMP9 na urina através de ELISA não apresentou

diferença estatística entre os fatores analisados, contudo, certamente, trata-se de uma técnica viável e deve ser utilizada quando o objetivo é a avaliação de proteínas secretadas na urina, principalmente em tumores de próstata. Wayner e cols em 2012 avaliou a presença de um marcador específico para o CaP, o AGR2, na urina desses pacientes através de ELISA e descreveu a viabilidade de utilizar esse método na detecção de pacientes com tumores de próstata. (Wayner e cols., 2012)

Em relação ao marcador PSMA, foi possível evidenciar uma subexpressão nos pacientes portadores de CaP em relação aos pacientes do grupo controle, contudo nos pacientes com maior número de fragmentos acometidos e PSA ≥ 10 ng/ml, houve uma maior expressão, entretanto não foi evidenciada significância estatística.

Antunes, em 2009, encontrou resultados semelhantes ao nosso estudo, quando avaliou a expressão do PSMA utilizando fragmentos de tecido de BxP e identificou a subexpressão desse gene em 57% dos pacientes com CaP em comparação com o grupo sem câncer. Contudo, na literatura, é possível evidenciar que a maioria dos estudos demonstra padrões de superexpressão desse marcador no tecido prostático de pacientes com CaP em relação aos pacientes sem CaP, como descreveu Murphy GP, na década de 90, quando publicou um estudo que avaliou a aplicação do PSMA como ferramenta de avaliação prognóstica do CaP. Nesse estudo, os autores avaliaram a expressão proteica através de Western blotting no tecido prostático em 3 grupos: pacientes normais em rastreamento para CaP; pacientes com CaP localizado; e pacientes com CaP metastático. Foi evidenciada uma

superexpressão do PSMA em pacientes com CaP em relação aos pacientes sem CaP, sendo que os pacientes com estadio mais avançado apresentaram maior nível de expressão. Outros estudos também demonstraram uma relação entre o PSMA e o CaP, como associação com agressividade tumoral; e associação com recorrência precoce após prostatectomia radical. (Murphy e cols., 1998) (Ross e cols., 2003) (Perner e cols., 2007).

Ainda na década de 90, Israeli e cols descreveram resultados de estudo extenso utilizando o PSMA como marcador de CaP e proporcionou novas perspectivas para a utilização dessa molécula. Nesse estudo, apesar das dificuldades técnicas na análise laboratorial, foi possível encontrar evidencia na relação dos níveis de superexpressão do PSMA com a presença de CaP e relacioná-lo com fatores prognósticos, como estágio e escore de Gleason. O estudo também demonstrou a relação dos níveis de expressão do PSMA com hormônios como testosterona e diidrotestosterona, que influenciam negativamente a expressão gênica do marcador, assim como fatores de crescimento e citocinas, como FGF; TGF- α ; EGF; entre outros. A presença de intermediários no ciclo molecular pode ser uma possível explicação para o achado divergente em nosso estudo, no qual foi encontrada uma subexpressão do marcador quando utilizada urina como meio de análise amostral. (Israeli e cols., 1993) (Diamond e cols., 1995)

Em 2011, Lihong Y e cols. identificaram outro intermediário na regulação da expressão do PSMA no CaP, o TMPRSS2-ERG, que é uma fusão genética presente em aproximadamente 50% no CaP. Nesse estudo, foi demonstrada inibição do PSMA por androgênio mediado por proteína codificada pelo

TMPRSS2-ERG. Esse resultado comprova a importância da avaliação do receptor androgênico no ciclo molecular do CaP e destaca a importância dos intermediários na avaliação dos marcadores da neoplasia prostática. Acreditamos que exista algum mecanismo regulatório que esteja suprimindo a expressão do PSMA em nossos casos e a ação do TMPRSS-ERG pode ser uma das explicações. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados para confirmarmos essa possível regulação. (Yin e cols., 2011)

A importância do PSMA na propedêutica do CaP também foi avaliada, quando alguns trabalhos demonstraram a sua importância no diagnóstico e prognóstico dessa neoplasia com utilização de exames de imagem. Em 2000, Feneley MR e cols. utilizaram anticorpos radiomarcados para o PSMA (CYT-356) e através de radioimunocintigrafia com In-111 conseguiu demonstrar utilidade na avaliação do estadio tumoral antes do tratamento, monitorar progressão e resposta ao tratamento em pacientes com tumores localizados; pacientes em recorrência após tratamento definitivo; e pacientes com PSA em elevação após terapia de bloqueio hormonal. A utilização de exames de imagem molecular pode se tornar uma ferramenta indispensável na avaliação em oncologia e na prática médica por ser uma técnica não invasiva, dinâmica e em tempo real. (Feneley e cols., 2000) (Mease e cols., 2013).

Dentre os marcadores avaliados, o mais extensamente descrito em estudos anteriores é a hK3 ou PSA, que é o principal marcador relacionado a tumores de próstata, utilizado atualmente para diagnóstico, acompanhamento e avaliação de resposta ao tratamento. Usualmente, esse marcador é avaliado na forma de proteína através de imunohistoquímica ou reação por

imunoaglutinação e hibridização in situ quando o objetivo é avaliar o RNA celular. A proteína sérica PSA foi um marco na urologia oncológica na década de 80, porém pouco tem sido estudado a respeito da proteína PSA tecidual e mRNA PSA/hK3. A melhor maneira de avaliar de modo sensível e quantitativo o mRNA é através de qRT-PCR e surpreendentemente poucos estudos demonstraram essa avaliação e os poucos que o fizeram utilizaram o tecido como meio. Em nosso estudo, avaliamos a expressão gênica do mRNA da hK3 através de qRT-PCR em amostras da urina de pacientes com CaP. Demonstramos que pacientes portadores de CaP apresentavam níveis de expressão da hK3 mais baixos do que os pacientes sem CaP, contudo não foi possível demonstrar relação com prognóstico dos pacientes.

Em estudo no qual também foi avaliado o nível de expressão da hK3 mRNA através de qRT-PCR, porém utilizando amostras teciduais de produtos de prostatectomia radical, Sterbis JR descreveu resultados semelhantes ao nosso estudo, contudo, em seu estudo foi possível encontrar relevância em relação a fatores prognósticos, como Gleason e sobrevida relacionada ao CaP, ou seja, quanto menor o nível de expressão da hK3, piores o Gleason e a sobrevida. Esse comportamento divergente em relação aos níveis de expressão do tradicional PSA sérico, que encontra-se superexpresso nos casos de pior prognóstico, pode ser explicado pela presença de mediadores moleculares, como os receptores androgênicos (AR), os quais refletem alterações no microambiente celular do tumor e pode estar relacionado a progressão da doença além de regular os níveis de expressão do mRNA hK3 e, desse modo, traduzirem o status das células tumorais de maneira mais

detalhada e com menor margem de erro. (Sterbis e cols., 2008) (Weir e cols., 2000) (Schrader e cols., 2003) (Brand e cols., 2006)

O GREb1 é um gene relacionado ao crescimento estrogênio-induzido das células do câncer de mama e, por esse motivo, até o momento foi pouco estudado no CaP. Contudo, Rae, em 2005, identificou a participação desse gene na proliferação do tecido prostático e de sua relação com os receptores androgênicos. Posteriormente, em 2006, comprovou sua participação na patogênese do CaP e ratificou os androgênios como seus mediadores no ciclo celular. Desde então, poucos estudos relacionam o GREb1 com o CaP, contudo, em 2012, Antunes e cols. publicaram um estudo no qual identificou uma maior expressão desse gene nos casos de CaP com estadio patológico T2 em comparação aos casos T3, ou seja, o gene foi relacionado a casos de prognóstico mais favorável, apesar de não encontrar os mesmos resultados quando avaliada recorrência bioquímica nos mesmos casos. Em nosso estudo, corroborando com os achados da literatura, foi possível identificar um padrão de subexpressão do GREb1 nos casos de CaP em comparação com o grupo controle e nos pacientes com menor porcentagem de fragmentos envolvidos por tumor foi observada uma expressão 4x maior ($p=0,065$), o que pode sugerir que esse gene na urina pode estar relacionado a tumores de menor volume. Além disso, foi possível correlacionar os níveis de expressão do GREb1 com as características anátomo-patológicas pós tratamento e identificamos uma superexpressão desse gene nos casos de tumores confinados a próstata em comparação com tumores localmente avançados. (Rae e cols., 2005 e 2006) (Antunes e cols., 2012)

Como os tumores prostáticos tem caráter heterogêneo e geralmente são multifocais, é provável que um painel de marcadores, muito mais do que um marcador isoladamente, seja o modo ideal de avaliar esse tipo de neoplasia. Essa é uma vantagem em utilizar a urina como meio de avaliação já que por esse método conseguimos avaliar a glândula prostática de uma maneira global, pois o material genético secretado na urina será proveniente dos múltiplos focos de neoplasia. Desse modo, em nosso estudo foi realizada uma associação de genes para avaliar se seria possível aumentar a possibilidade de fornecer informações relevantes em relação a fatores prognósticos. Dentre as associações de genes realizadas, destacaram-se a avaliação entre MMP9 e GREb1, cuja superexpressão de ambos os genes esteve associada a pacientes com menor volume de doença na biópsia (porcentagem de fragmentos <50%) ($p=0,036$) e a avaliação dos genes MMP9 e PSMA, que quando ambos superexpressos estavam associados em 100% dos casos com $PSA \geq 10\text{ng/ml}$ ($p=0,007$). A associação entre MMP9 e hK3 não forneceu informações relevantes. Esses dados, depois de validados em uma casuística maior, podem fornecer informações importantes a respeito dos pacientes com CaP, como por exemplo, prever aqueles pacientes que devem ser tratados de maneira mais agressiva (MMP9/PSMA superexpressos) daqueles que por possuírem menor volume tumoral, podem ser observados (MMP9/GREb1 superexpressos).

A associação de genes mais estudada atualmente é o PCA3 e o TMPRSS-ERG, sendo este último uma fusão de genes presente em 50% dos casos de CaP, com alta especificidade e relacionado a fatores prognósticos

desfavoráveis, como escore de Gleason mais elevado, doença extra-prostática e maior taxa de recidiva bioquímica. A grande vantagem da avaliação conjunta dos genes é poder emprestar as qualidades de cada gene em um único exame e, desse modo, aumentar a sensibilidade e especificidade na avaliação de determinada doença. Portanto, é possível evitar a realização desnecessária de exames invasivos de diagnóstico, como a biópsia de próstata, e aumentar a acurácia na detecção de doença cujo tratamento realmente seja necessário, evitando assim o diagnóstico de tumores indolentes, que talvez não causariam sintomas ou morte no paciente. (Leyten GHJM, 2014)

Uma das grandes falhas dos estudos que avaliam biomarcadores em tumores de próstata é a falta de correlação com os achados histopatológicos, os quais são fatores importantes na real avaliação prognóstica dos pacientes. Em nosso estudo, foi possível avaliar esses dados nos pacientes que foram submetidos a prostatectomia radical e foi possível correlacionar a superexpressão do GREb1 aos pacientes com estadio patológico mais favorável (pT2 x pT3-4) com significância estatística ($p=0,031$) além de associar a superexpressão do PCA3 a pacientes com volume tumoral maior ($\geq 11\%$ x $< 11\%$) também com significância estatística ($p=0,006$). Essa informação pode ser útil na avaliação prognóstica dos pacientes, por exemplo, em protocolos de vigilância ativa, na qual a superexpressão do PCA3 pode sugerir pacientes com tumores de maior volume e, desse modo, poderiam ser tratados de maneira mais agressiva, ao contrário dos pacientes que apresentarem superexpressão do GREb1, que por estarem associados a

tumores em estadio mais favorável, poderiam ser mantidos em protocolos de observação.

O presente estudo demonstrou que a análise de marcadores urinários para o CaP através de qRT-PCR e Elisa é viável porém algumas dificuldades puderam ser encontradas, como a baixa celularidade da urina que pode comprometer a coleta de material genético para avaliação, a dificuldade de qual técnica utilizar para o melhor aproveitamento possível da amostra e a possibilidade de intermédio de mecanismos genéticos e epigenéticos que podem interferir na expressão dos genes em análise. Certamente, esses mediadores do ciclo celular também devem ser estudados afim de compreender da melhor maneira o comportamento da célula neoplásica.

Nosso estudo apresenta algumas limitações que precisam ser descritas. Dentre elas, a pequena amostragem de pacientes é uma das mais importantes, já que pode não representar a população geral. Contudo, por se tratar de um estudo inicial, prospectivo, com o objetivo de relacionar os marcadores colhidos na urina de pacientes com CaP, a amostragem pode ser aumentada em fases posteriores do estudo para ratificar as hipóteses iniciais. A heterogeneidade da amostra, incluindo pacientes com tumores localizados, localmente avançados e metastáticos também podem ter contribuído para o perfil genético encontrado. Talvez, numa avaliação posterior pode ser necessário analisar as categorias individualmente, principalmente os tumores localmente avançados, afim de determinar o papel desses genes urinários na evolução desses pacientes. Outro importante fator limitante do estudo foram os obstáculos técnicos, como as dificuldades iniciais enfrentadas no processamento e armazenamento da

urina, o que pode contribuir para erros na avaliação da expressão gênica, além da inacessibilidade ao kit de análise do gene PCA3, que ainda não encontrava - se disponível no Brasil e, portanto, teve sua análise prejudicada.

Em uma fase posterior, como perspectiva futura, poderemos estudar a relação dos genes no diagnóstico do CaP coletando a urina dos pacientes com PSA elevado e suspeita de CaP antes da BxP e correlacionar com os resultados após a BxP. Enquanto que para a avaliação do prognóstico, poderemos coletar urina de pacientes portadores de CaP em protocolo de vigilância ativa e correlacionar as expressões genéticas com a evolução dos pacientes.

Certamente, ainda há um longo caminho até que se alcance um melhor entendimento da biologia molecular dos tumores de próstata e, desse modo, possamos utilizar biomarcadores capazes detectar tumores de maneira mais eficaz, sem submeter pacientes a biópsias desnecessárias; capazes de distinguir lesões agressivas daquelas indolentes, de identificar doença metastática de maneira mais eficaz, e eventualmente possamos responder as seguintes perguntas: A detecção precoce realmente diminui a mortalidade? Quem realmente tem câncer e qual seu grau de risco? Qual seria a evolução dos pacientes se não fosse realizado o tratamento? Qual seria o tratamento apropriado para determinado paciente? Quem vai evoluir com recorrência? E finalmente, qual o risco de um paciente desenvolver CaP no futuro?

6. Conclusões

O estudo demonstrou uma superexpressão da MMP9 em 85,7% dos casos de CaP, com média de expressão 6,4x maior do que os casos sem CaP e subexpressão dos genes PSMA, PCA3, hK3 e GREB1.

De acordo com os fatores prognósticos, antes do tratamento, foi possível identificar que a superexpressão conjunta do MMP9/GREb1 está associada a menor porcentagem de fragmentos acometidos na BxP e a associação MMP9/PSMA quando superexpressa está associada a tumores com PSA mais elevado. Na análise dos pacientes após o tratamento, identificamos associação entre supexpressão do GREb1 com estadió patológico mais favorável assim como superexpressão do PCA3 nos casos de maior volume tumoral.

7.Referências Bibliográficas

Antenor JA, Roehl KA, Eggener SE e cols: Preoperative PSA and progression-free survival after radical prostatectomy for stage T1c disease. *Urology* 2005; 66; 156

Antunes AA, Leite KR, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Camara-Lopes LH, Dall'oglio MF, Srougi M; GREB1 tissue expression is associated with organ-confined prostate cancer; *Urol Oncol*. 2009 Nov 26

Antunes AA, Leite KR, Sousa-Canavez JM, Camara-Lopes LH, Srougi M; The Role of Prostate Specific Membrane Antigen and Pepsinogen C Tissue Expression as an Adjunctive Method to Prostate Cancer Diagnosis; *J Urol* 2009; Vol. 181, 594-600;

Antunes AA, Reis ST, Leite KR, Real DM, Sousa-Canavez JM, Camara-Lopes LH, Dall'Oglio M, Srougi M; PGC and PSMA in prostate cancer diagnosis: tissue analysis from biopsy samples. *Int Braz J Urol* 2013; 39: 649-56

Aubin SMJ, Reid J, Sarno MJ, Blasé A, Aussie J, Rittenhouse H, Rittmaster R, Andriole GL, Groskopf J; PCA3 Molecular Urine Test for Predicting Repeat Prostate Biopsy Outcome in Populations at Risk: Validation in the Placebo Arm of the Dutasteride REDUCE Trial; *J Urol* 2010 Vol. 184; Issue 5; 1947-1952;

Barbieri CE et al; The prostate cancer genome: perspectives and potential; *Urol Oncol* 2014; 32; 53.e15-53.e22.

Barentsz JO, Richenberg J, Clements R, Choyke P, Verma S, Villeirs G. ESUR prostate MR guidelines 2012. *Eur Radiol*. 2012; 22: 746–57.

Bastian PJ, Mangold LA, Epstein JI, Partin AW. Characteristics of Insignificant Clinical T1c Prostate Tumors. *Cancer*, 2004; Vol 101; 9; 2001-05

Bensalah K, Lotan Y, Karam JA, Shariat SF. New circulating biomarkers for prostate cancer; *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2008; 11(2):112-20;

Benson M.C., Whang I.S., Pantuck A., Ring K., Kaplan S.A., Olsson C.A., Cooner W.H. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol* 1992; 147: 815-6;

Bozeman C.B., Carver B.S., Eastham J., Venable D. Treatment Of Chronic Prostatitis Lowers Serum Prostate Specific Antigen, *J Urol* 2002; Vol. 172, Issue 5, Part 1, Pages 1853-1855;

BrandTC, HernandezJ, Canby-Hagino ED, BaslerJW, Thompson IM. Prostate cancer detection strategies. *Curr Urol Rep* 2006;7:181-5.

Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Verhaegh GW, e cols. DD3::A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59:5975-5979.

Carter H.B., Pearson J.D., Metter E.J., Brant L.J., Chan D.W., Andres R., Fozard J.L., Walsh P.C. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease, *JAMA* 1992; 267: 2215-20;

Catalona WJ, Smith DS and Ornstein DK: Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/ml and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *JAMA* 1997; 277, 1452

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL e cols: Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *JAMA* 1993; 270; 948.

Crawford ED, Rove KO, Trabulsi EJ, Qian J, Drewnowska KP, Kaminetsky JC, Huisman TK, Bilowus ML, Freedman SJ, Glover WL, Bostwick DG. Diagnostic Performance of PCA3 to Detect Prostate Cancer in Men with Increased Prostate Specific Antigen: A Prospective Study of 1,962 Cases. *J Urol*; Vol 188, Issue 5, Nov 2012,1726–1731

D'Amico A.V.; Combined-modality staging for localized adenocarcinoma of the prostate; *Oncology* 2001 Aug; 15(8):1049-59; discussion 1060-2, 1064-5, 1069-70,1073-5

Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Young CY, Klee GG, Tindall DJ, Bostwick DG; Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker.; *Urology* 1997 Jun;49(6):857-62;

Day JR, Jost M, Reynolds MA, Groskopf J, Rittenhouse H. PCA3: From basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Letters* 301 (2011) 1–6

Deras IL, Aubin SMJ, Blase A, Day JR, Koo S, Partin AW, Ellis WJ, Marks LS, Fradet Y, Rittenhouse H, Groskopf. PCA3: A Molecular Urine Assay for Predicting Prostate Biopsy Outcome. *J Urol*; Vol 179, Issue 4, April 2008, Pages 1587–1592;

Diamond SM, Fair WR, Wise GJ, et al: Modulation of prostate specific membrane antigen (PSM) expression in-vitro by cytokines and growth factors. *J Urol* 153:382A, 1995

Dos Reis ST, Pontes J Jr, Villanova FE, Borra PM, Antunes AA, Dall'oglio MF, Srougi M, Leite KR; Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases: susceptibility and prognostic implications for prostate cancer. *J Urol*. 2009 May;181(5):2320-5;

Dos Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, Sousa-Canavez JM, Dall'Oglio MF, Passerotti CC, Abe DK, Crippa A, da Cruz JAS, Timoszczuk LMS, Srougi M, Leite KRM. MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. *Int J Biol Markers* 2011;26 (4): 255-261. DOI: 10.5301/JBM.2011.8831

Drake, R.R.; White, K.Y.; Fuller, T.W.; Igwe, E.; Clements, M.A.; Nyalwidhe, J.O.; Given, R.W.; Lance, R.S.; Semmes, O.J. Clinical collection and protein properties of expressed prostatic secretions as a source for biomarkers of prostatic disease. *J. Proteomics* 2009, 72, 907–917.

Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA*. 1994 Feb 2;271(5):368-74.

Feneley MR, Jan H, Granowska M, Mather SJ, Ellison D, Glass J, Coptcoat M, Kirby RS, Ogden C, Oliver RTD, Badenoch DF, Chinegwundoh FI, Nargund VH, Paris MI, Britton KE . Imaging with prostate-specific membrane antigen (PSMA) in prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* (2000) 3, 47±52;

Foot, N.C.; Papanicolaou, G.N.; Holmquist, N.D.; Seybolt, J.F. Exfoliative cytology of urinary sediments; a review of 2829 cases. *Cancer* 1958, 11, 127–137.

Gittelman MC e cols; *J Urol* 2013 Jul; 190(1):64-9. Doi:10.1016/j.uro.2013.02.018

Ghosh A., Heston W.D.; Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2004 15;91(3):528-39. Review;

Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 2006; 52: 1089–95.

Hambrock T, Somford D.M., Hoeks C., Bouwense S.A.W., Huisman H., Yakar D., Van Oort I.M., Witjes A., Futterer J., Barentsz J.O.; Magnetic Resonance Imaging Guided Prostate Biopsy in Men With Repeat Negative Biopsies and

Increased Prostate Specific Antigen *J Urol* 2010 Volume 183, Issue 2 , Pages 520-528;

Hansel D.E, DeMarzo A.M., Platz E.A., Jadallah E., Hicks J., Epstein J.I., Partin A.W., Netto G.J.; Early Prostate Cancer Antigen Expression in Predicting Presence of Prostate Cancer in Men With Histologically Negative Biopsies; *The J Urol* 2007 Vol. 177, Issue 5; 1736-1740;

Hara M, Koyanagi Y, Inoue T e cols: Some physic-chemical characteristics of “-semiprotein”, an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII. 1971. *Nihon Hoigaku Zasshi* 25, 322.

Heijmink SW, Fütterer JJ, Strum SS, Oyen WJ, Frauscher F, Witjes JA. State-of-the-art urologic imaging in the diagnosis of prostate cancer. *Acta Oncol.* 2011; 50: 25–38.

Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ e cols. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003; 44: 8–15; discussion –6.

Hessels D, Schalken JA; Urinary biomarkers for prostate cancer: a review; *Asian J of Androl* 2013; 15: 333–339

Hoening DM, Chi S, Porter C, Tackett L, Smith DS, Cohen SI and Stein BS. Risk of Nodal Métastases at Laparoscopic Pelvic Lymphadenectomy Using PSA, Gleason Score, and Clinical Stage in Men with Localized Prostate Cancer. *J Endourol* Volume 11, Number 4, August 1997;

Instituto Nacional do Câncer e Ministério da Saúde: Câncer no Brasil – Dados dos Registros de Base Populacional; Vol. IV; pág. 466; 2010.

Irani J, Millet C, Levillain P, *et al*: Serum-to-urinary prostate-specific antigen ratio: its impact in distinguishing prostate cancer when serum prostate-specific antigen level is 4 to 10 ng/ml. *J Urol* 157: 185–188, 1997.

Israeli RS, Powell CT, Fair WR, et al: Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostatespecific membrane antigen. *Cancer Res* 53:227,1993

Jamaspishvili T e cols. Urine Markers in Monitoring for PCa. *Prostate Cancer and prostatic Disease* (2010) 13, 12-19

Jemal A., Bray F., Melissa M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global Cancer Statistics, *Ca Cancer J Clin* 2011;61:69–90;

Kon O.L., Yip T.T., Ho M.F., Chan W.H., Wong W.K., Tan S.Y., Ng W.H., Kam S.Y., Eng A., Ho P., et al. The distinctive gastric fluid proteome in gastric cancer reveals a multi-biomarker diagnostic profile. *BMC Med.* 2008 Genomics 1, 54;

Krishnan, B.; Truong, L.D. Prostatic adenocarcinoma diagnosed by urinary cytology. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000, 113, 29–34.

Kuzmin I, Gillespie JW, Protopopov A, Geil L, Dreijerink K, Yang Y, Vocke KD, Duh FM, Zabarovsky E, Minna JD, Rhim JS, Emmert-Buck MR, Linehan WM, Lerman MI. The RASSF1A Tumor Suppressor Gene Is Inactivated in Prostate Tumors and Suppresses Growth of Prostate Carcinoma Cells; *Cancer Res* 2002 62, 3498–3502.

Lara PN, Stadler WM, Longmate J e cols. A Randomized Phase II Trial of the Matrix Metalloproteinase Inhibitor BMS-275291 in Hormone-Refractory Prostate Cancer Patients with Bone Metastases. *Clin Cancer Res* 2006;12:1556-1563.

Leite KRM, Camara-Lopes LHA, Dall'Oglio MF, Cury J, Antunes AA, Sanudo A, Srougi M. Upgrading the gleason score in extended prostate biopsy: Implications for treatment choice. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 73, No. 2, pp. 353–356, 2009.

Leyten GHJM, Hessels D, Jannink SA, Smit FP , de Jong H, Cornel EB, de Reijke TM, Vergunst H, Kil P, Knipscheer BC, van Oort IM, Mulders PFA,

Hulsbergen-van de Kaa CA, Schalken JA. Prospective Multicentre Evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG Gene Fusions as Diagnostic and Prognostic Urinary Biomarkers for Prostate Cancer. *Eur Urol* 2014; 65: 534–542.

Leman E.S., Cannon G.W., Trock B.J., Sokoll L.J., Chan D.W., Mangold L., Partin A.W., Getzenberg R.H.; EPCA-2: a highly specific serum marker for prostate cancer; *Urology*. 2007 Apr;69(4):714-20.

Lilja H., Vickers A.J., Cronin A.M., Scardino P.T., Aus G., Roobol M.J., Hugosson J., Schroder F.H.; Value of PSA velocity for predicting biopsy outcome in previously screened men participating in the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening (ERSPC); *J Urol* 2008 Vol. 179, Supplement N.04;

Loeb S., Catalona W.J. What to do with an abnormal PSA test. *Oncologist* 2008; 13(3):299–305;

Loeb S, van der Heuvel S, Zhu X, Bangma CH, Schroder FH, Roobol MJ. Infectious complications and hospital admissions after prostate biopsy in a European randomized trial. *Eur Urol* 2012; 61: 1110–4;

Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL. Alpha-methylacyl-coa racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 2220–6.

Martinez-Piñeiro L.; Personalised Patient Diagnosis and Prognosis in Prostate Cancer: What Are the Future Perspectives?; *Eur Urol* 2010 supp. 9; 794 – 799;

Mease RC, Foss CA, Pomper MG*, Morgan RH. PET Imaging in Prostate Cancer: Focus on Prostate-Specific Membrane Antigen. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2013, 13, 951-962 951

Melle, C., Ernst, G., Schimmel, B., Bleul, A., Kaufmann, R., Hommann, M., Richter, K.K., Daffner, W., Settmacher, U., Claussen, U., and von Eggeling, F. (2005). Characterization of pepsinogen C as a potential biomarker for

gastric cancer using a histo-proteomic approach. *J. Proteome Res.* 4,1799–1804.

Murphy GP, Kenny GM, Ragde H, Wolfert RL, Boynton AL, Holmes AH, Misrock SL, Bartsch G, Klocker H, Pointner J, Reissigl A, Mcleod DG, Douglas T, Morgan T e Gilbaugh JR J. Measurement of serum prostate-specific membrane antigen, a new prognostic marker for prostate cancer. *Urology* 51 (Suppl 5); 89-97, May 1998.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) 2011: *Prostate Cancer Guideline*;

Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, de Marzo AM; Hypermethylation of the Human Glutathione S-Transferase-Gene (GSTP1) CpG Island Is Present in a Subset of Proliferative Inflammatory Atrophy Lesions but Not in Normal or Hyperplastic Epithelium of the Prostate; *Ame J of Pathol* 2003; 3; 163

Oesterling J.E., Jacobsen S.J., Chute C.G., Guess H.A, Girman C.J., Panser L.A., Lieber M.M., Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA* 1993; 270:860-4;

Pannek J, Rittenhouse HG, Evans CL, Finlay JA, Bruzek DJ, Cox JL, Chan DW, Subong ENP and Partin AW. Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 (hK2) in urine are not clinically useful for early detection and staging of prostate cancer. *Urology* 50, (5); 715-721 1997

Partin A.W., Catalona W.J., Southwick P.C., Subong E.N., Gasior G. H., Chan D.W.. Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume and age. *Urology*. 1996; 48:55-61;

Perner S, Hofer MD, Kim R, Shah RB, Li H, Möller P, Hautmann RE, Rubin MA Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate

cancer progression (2007) *Human Pathology*, 38 (5), pp. 696-701. doi: 10.1016/j.humpath.2006.11.012.

Ploussard G, Salomon L, Xylinas E, Allory Y, Vordos D, Hoznek A, Abbou CC and de la Taille A. Pathological Findings and Prostate Specific Antigen Outcomes After Radical Prostatectomy in Men Eligible for Active Surveillance—Does the Risk of Misclassification Vary According to Biopsy Criteria? *J Urol*; Vol. 183, 539-545, February 2010.

Prensner JR, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM; Beyond PSA: The Next Generation of Prostate Cancer Biomarkers; *Sci Trans Med* 2012; 4: 127

Rae J.M., Johnson M.D., Cordero K.E., Scheys J.O., Larios J.M., Gottardis M.M., Pienta K.J., Lippman M.E.; GREB1 is a novel androgen-regulated gene required for prostate cancer growth; *Prostate*. 2006 Jun 1;66(8):886-94;

Ross JS, Sheehan CE, Fisher HAG, Kaufman Jr RP, Kaur P, Gray K, Webb I, Kallakury BVS. Correlation of Primary Tumor Prostate-Specific Membrane Antigen Expression with Disease Recurrence in Prostate. Cancer (2003) *Clinical Cancer Research*, 9 (17), pp. 6357-6362.

Sanda MG, Dunn RL, Michalski J, Sandler HM, Northouse L, Hembroff L, Lin X, Greenfield TK, Litwin MS, Saigal CS, Mahadevan A, Klein E, Kibel A, Pisters LL, Kuban D, Kaplan I, Wood D, Ciezki J, Shah N, and Wei JT: *NEJM* 2008; 358; 1250-61:Quality of Life and Satisfaction with Outcome among Prostate-Cancer Survivors;

Ravikumar A e cols; *Immunological Investigations*, 40: 447-464; 2011 DOI:10.3109\08820139.2011.557795;

Roobol MJ, Haese A and Bjarttel A Tumour markers in prostate cancer III: Biomarkers in urine. *Acta Oncologica*, 2011; 50(Suppl 1): 85–89

Rosario DJ, Lane JA, Metcalfe C et al. Short term outcomes of prostate biopsy in men tested for cancer by prostate specific antigen: prospective evaluation within ProtecT study. *BMJ* 2012; 344: d7894 doi: 10.1136/bmj.d7894;

Schrader AJ, Lauber J, Lechner O, Heidenreich A, Hofmann R, Buer J. Application of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in urological oncology. *JUrol* 2003; 169:1858-64

Shah R.B., Mehra R., Chinnaiyan A.M., Shen R., Ghosh D., Zhou M., Macvicar G.R., Varambally S., Harwood J., Bismar T.A., Kim R., Rubin M.A., Pienta K.J.; Androgen-independent prostate cancer is a heterogeneous group of diseases: lessons from a rapid autopsy program. *Cancer Res.* 2004 Dec 15;64(24):9209-16;

Shahrokh F.S., Karakiewicz P.I.; Perspectives on Prostate Cancer Biomarkers. *Eur Urol* 2008; 54 ;8–10

Siegel R.; Miller K; Jemal A. : Cancer Statistics, 2015; *Cancer J Clin* 2015;65:5–29;

Smith D.S., Carvalhal G.S., Mager D.S., Bullock A.D., Catalona W.J.; Use of lower prostate specific antigen cutoffs for prostate cancer screening in black and white men. *J Urol* 1998; Vol. 160, 1734-1738;

Sociedade Brasileira de Urologia. Diretrizes em Uro-Oncologia, 2005

Stamey TA, Yang N, Hay AR e cols. Prostate-specific antigen as a sérum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987; 317, 909

Stephan C., Jung K., Lein M., Diamandis E.P.; PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection. *Eur J Cancer.* 2007 Sep;43(13):1918-26;

Sterbis J, Gao C, Furusato B e cols . Higher Expression of the Androgen-Regulated Gene *PSA/HK3* mRNA in Prostate Cancer Tissues Predicts Biochemical Recurrence-Free Survival. *Clin Cancer Res* 2008;14:758-763.

Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ e cols. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004; 350, 2239.

Thompson I., Thrasher J.B., *AUA Guideline for the Management of Clinically Localized Prostate Cancer*. 2007 Update;

Tremblay J, Frenette G, Tremblay RR, Dupont A, Thabet M, Dube JY, Excretion of three major prostatic secretory proteins in the urine of normal men and patients with benign prostatic hypertrophy or prostate cancer. *Prostate*. 1987; 10(3):235-43.

Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Têtu B ; Matrix metalloproteinase 9 is associated with Gleason score in prostate cancer but not with prognosis. *Human Pathology* (2010) 41, 1694–1701

Truong M, Yang B and Jarrard DF. Toward the Detection of Prostate Cancer in Urine: A Critical Analysis. *J Urol* Vol. 189, 422-429, February 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2012.04.143>

Vickers A.J., Cronin A.M., Aus G., Pihl C.G., Becker C., Pettersson K., Scardino P.T., Hugosson J., Lilja H.; A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer Screening in Göteborg, Sweden *BMC Med*. 2008 Jul 8;6:19;

Vlaeminck-Guillem V, Ruffion A, Andre J, Devonec M, Paparel P. Urinary prostate cancer 3 test: toward the age of reason? *Urology* 2010; 75: 447–53.

Walsh R.M., Thompson I.M.; Prostate Cancer Screening and Disease Management: How Screening May Have an Unintended Effect on Survival and Mortality – The Camel’s Nose Effect. *J Urol* 2007; Vol 177, 1303-1306;

Wayner E, Quek SI, Ahmad A, Ho ME, Loprieno MA, Zhou I, Ellis WJ, True LD, and Liu AY: Development of an ELISA to Detect the Secreted Prostate Cancer Biomarker AGR2 in Voided Urine. *The Prostate* 2012; 72:1023-1034

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP e cols: Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol*. 1979; 17, 159.

Wang R, Wang H, Zhao C, Hu J, Jiang Y, Tong Y, Liu T, Huang R, Wang X. Evaluation of Multiparametric Magnetic Resonance Imaging in Detection and

Prediction of Prostate Cancer. *Plos One* 2015
DOI:10.1371/journal.pone.0130207.

Weir EG, Partin AW, Epstein JI. Correlation of serum prostate specific antigen and quantitative immunohistochemistry. *J Urol* 2000; 163:1739- 42.

Yin L, Rao P, Elson P, Wang J, Ittmann M, Heston WDW. Role of TMPRSS2-ERG gene fusion in negative regulation of PSMA expression. *PLoS ONE*; Volume 6, Issue 6, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0021319 PubMed ID: 21731703

Apêndice

Estadiamento TNM – Câncer de Próstata:

PRÓSTATA – TNM - 2004	
T1	Não palpável ou visível
T1a	≤5% (achado incidental)
T1b	>5% (achado incidental)
T1c	Biópsia por agulha
T2	Tumor confinado a próstata
T2a	≤metade de um lobo
T2b	>metade de um lobo
T2c	Ambos os lobos
T3	Invasão de cápsula prostática
T3a	Extracapsular
T3b	Vesículas seminais
T4	Fixo ou invade estruturas adjacentes: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores do ânus, parede pélvica
N1	Linfonodos regionais
M1a	Linfonodos não-regionais
M1b	Osso
M1c	Outras localizações

* TNM Classification of Malignant Tumours - 6th ed. Edited by L.H. Sobin and Ch. Wittekind, John Wiley & Sons, INC.,

Publication – 2002. ISBN 0-471-22288-7 (alk. Paper)

Apresentação de estudo no Congresso Brasileiro de Urologia, 2013

Apresentação de estudo no congresso da *Société Internationale d'Urologie* – SIU, em Glasgow, Escócia, 2014.

New Perspectives in Urinary Markers of Prostate Cancer: Role of MMP9, hK3 and PSMA Gene Expressions

Luiz Henrique Araujo, Gabriel dos Anjos, Sabrina Thalita dos Reis, Nayara Viana, Katia Moreira Leite, Miguel Srougi, Alberto Azoubel Antunes*

**Urology Department
Laboratory of Medical Investigations – LIM55
University of São Paulo – São Paulo - Brazil**

BACKGROUND

Prostate cancer is the most common cancer in men, excluding non-melanoma skin tumors, accounting for nearly 240,000 new cases per year and 10 % of all cancer deaths in the United States of America. One in six men will develop prostate cancer throughout their lives.

Currently, the vast majority of patients undergoing biopsy do not have cancer and therefore undergo unnecessary biopsies. Moreover, many prostate cancer cases do not need to be treated due to the indolent behavior.

Therefore, more accurate tools for diagnosis and prognosis of prostate cancer are necessary and urinary markers are promising tools in the evaluation of prostate tumors.

MATERIALS & METHODS

We conducted a case-control study with 28 patients with PCa and 28 patients with low-risk for PCa diagnosis (PSA <2.5 ng/ml; normal digital rectal examination and no risk factors) after the ethics committee approval.

Urine samples were collected after prostatic massage of all patients during the outpatient visit to the urology department at the University of São Paulo and analyzed by qRT-PCR. Expression levels were compared between patients with and without PCa and also compared according to the prognostic factors, as Gleason score, PSA, clinical stage.

RESULTS (Cont.)

Figura 1: Urinary markers expression levels (PSMA, hK3 and MMP9) in prostate cancer patients in comparison to patients without cancer.

OBJECTIVES

Our goal is to evaluate the role of urinary matrix metalloproteinase-9 (MMP9), kallikrein-3 (hK3) and prostate-specific membrane antigen (PSMA) gene expressions in the diagnosis and prognosis of PCa.

RESULTS

It was possible to analyze the expression levels of genes in the sample of 84.8% of MMP9, 100% of hK3, and 66.4% of PSMA gene. Expression levels of urinary markers in PCa cases relative to patients without PCa are shown in Figure 1.

The MMP9 showed an overexpression in 95.4% of with an average overexpression of 8.3 times. When we analyzed genes simultaneously, we found that overexpression of MMP9 and PSMA was related to a Gleason > 6 in 100% of patients (p: 0.036).

The PSMA presented underexpression pattern in cases of PCa, however, in patients with poorer prognostic factors, it showed an overexpression pattern: 3.19 times (Gleason > 6) and 3.45 times (PSA > 10).

hK3 presented an underexpression pattern in cases of PCa and lack of association with prognostic factors. None of the genes correlate with prostate size.

CONCLUSIONS

We have shown that there is an upregulation of MMP9 in 95.4% of PCa patients and a mean expression of 8.3x higher than patients without PCa. In addition, it was demonstrated a downregulation of hK3 and PSMA in PCa cases. This profile might be a characteristic of PCa that may be a useful adjunctive tool for tumor diagnosis.

We also demonstrated a prognostic relevance of PSMA and MMP9 expressions simultaneously by the significant correlation with poorer prognostic factors.

MATERIALS & METHODS

Variables analyzed in Pca cases:
Age (years);
PSA (ng/ml);
PSA density;
Digital rectal examination;
Prostate size;
Gleason score;
Number of positive cores
Clinical staging;

CONTACT INFORMATION:
luizpibe@yahoo.com

The Journal of Urology

New Perspectives in Urinary Markers of Prostate Cancer: Role of MMP9, GREb1, hK3 and PSMA Gene Expressions. --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Investigative Urology Article
Full Title:	New Perspectives in Urinary Markers of Prostate Cancer: Role of MMP9, GREb1, hK3 and PSMA Gene Expressions.
First Author:	LUIZ HENRIQUE ANDRADE ARAUJO, MD
Corresponding Author:	LUIZ HENRIQUE ANDRADE ARAUJO, MD FMUSP RECIFE, PERNAMBUCO BRAZIL
Corresponding Author E-Mail:	lhaurologia@yahoo.com
Corresponding Author's Institution:	FMUSP
Order of Authors:	LUIZ HENRIQUE ANDRADE ARAUJO, MD GABRIEL DOS ANJOS, MD SABRINA THALITA DOS REIS, PhD NAYARA VIANA KATIA MOREIRA LEITE, PhD MIGUEL SROUGI, PhD ALBERTO AZOUBEL ANTUNES, PhD
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Keywords:	prostate cancer, urinary markers, diagnosis, prognosis
Manuscript Classifications:	20: Basic Science/Research; 40: Organs; 60: Diagnosis; 60.201: Tumor markers; 40.210: Prostate; 60.120: PSA; 60.150: Diagnostic test; 60.160: Gene diagnosis
Abstract:	<p>PURPOSE: The vast majority of patients undergoing prostate biopsy do not have cancer and therefore undergo unnecessary biopsies. Moreover, many prostate cancer cases do not need to be treated due to the indolent behavior. Therefore, more accurate tools for diagnosis and prognosis of PCa are necessary and urinary markers are promising tools. To evaluate the expression of 5 genes (MMP9, PSMA, GREb1, hK3, PCA3) in urine of patients with PCa and to determine whether there is a relationship with the prognostic factors. MATERIALS AND METHODS: The study consisted of the analysis of 46 patients with PCa and 28 controls. The urine of patients was collected after prostatic massage and gene expression analyzed by RT-PCR. Besides the analysis of gene expression compared to cases without cancer, the profiles according to prognostic factors were evaluated. RESULTS: An over-expression of urinary MMP9 was demonstrated in 85.7% of PCa patients compared to controls, median 6.4x. The other genes showed a more heterogeneous pattern. When considered together, it can be evidenced that the simultaneous over-expression of MMP9 and PSMA was present in 100% of patients with PSA$\geq$10ng/ml and over-expression of MMP9 and GREb1 was present in 66.7% of patients <50% positive fragments involved. CONCLUSIONS: Overexpression of MMP9 was observed in PCa and it can be helpful to avoid unnecessary prostate biopsies. Furthermore, overexpression of PSMA and MMP9 may be related to higher PSA tumors and therefore more unfavorable prognosis, whereas overexpression of MMP9 and GREb1 together may be related to lower volume tumors.</p>
Author Comments:	NO COMMENTS
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	

Title:

New Perspectives in Urinary Markers of Prostate Cancer: Role of MMP9, GREb1, hK3 and PSMA Gene Expressions.

Introduction:

According to estimates provided for 2015 prostate cancer (PCa) represent 28% (220,800) of new cancer cases in men and is responsible for 10% of cancer deaths in the United States of America (USA). Since PCa screening was disseminated in the 80s, it was possible to increase the number of newly diagnosed cases and a reduction in mortality was observed in 40% in the last 20 years. **(1)**

But the tools currently used for diagnosis and prognosis of PCa are faulty. PSA is a nonspecific marker of prostate cancer and some benign changes in the prostate such as BPH and prostatitis and others can cause false elevations of this biomarker. Around 70% of patients undergo unnecessary prostate biopsy because it does not have PCa, **(2)** besides being an exam with a high rate of false negatives and fail to diagnose 30% of the tumors even with an increase in the number of fragments. Thus, due to lack of accuracy in indicating biopsies, sometimes it is necessary to repeat this exam, which causes both psychological stress on the patient as the physician; increased costs; and risks of not negligible clinical complications such as hematuria, perineal discomfort, urinary tract infection, sepsis, etc. **(3).**

The patient prognosis assessment also has flaws, such as lack of agreement between Gleason biopsy and Gleason of the specimen; no agreement among pathologists regarding the Gleason score; flaws in cancer risk assessment with prognostic criteria, such as the Epstein criteria. **(4). (5).** Almost 30% of patients undergoing radical prostatectomy evolve with biochemical recurrence, but we do not know which patients need to evolve that way.

(6)

The molecular knowledge in PCa is required to make possible a transition from the knowledge of an unknown disease, poorly understood at the molecular

level and with a variable clinical course for a condition with homogenous subtypes molecular criteria, distinct risk profiles. Thus, we can draw specific treatment strategies. (7)

Because of heterogeneity of prostate tumors, individually, the expression of a single gene or protein is not able to adequately predict the evolution of the disease in any particular patient.

Urinary markers constitute an attractive way to study because of the ease of collecting samples and non-invasive method. Moreover, unlike serum markers, urinary require little amount of sample, are not altered by hepatic metabolism and has the ability to monitor PCa with heterogeneous focus. (8) (9)

To date, urinary genes like MMP9, GREb1, PSMA and hK3 were not measured for their potential for diagnosis and prognosis of PCa by qRT-PCR and ELISA methodology. The possibility of joint analysis of these genes by a sensitive method for measuring gene expression can improve the sensitivity and specificity of the diagnosis and prognosis of this cancer.

Materials and Methods:

1. Materials:

The study included prospectively 46 patients with PCa and 28 patients without suspicion for PCa treated in the Hospital's urology clinics of the Faculty of Medicine, University of São Paulo (FM-USP) and in the São Paulo State Cancer Institute (ICESP) from October/2012 to February/2013 and the laboratory analyzes were performed at the Medical Research Laboratory 55 (LIM55) FM-USP. Patients were selected for the study according to the free demand from clinics, after fulfilling the inclusion criteria of the study and accept to participate by signing the Informed Consent and Informed model this drafted and based on the Manual of Ethics in Research the Ethics Committee of the institution and approved under registry 0833/11.

Inclusion criteria for patients with CaP were: presence of PCa proven through biopsy, localized or metastatic; Clinical staging documented; no previous

treatment for prostate cancer; absence of radiotherapy or surgical treatment in previous pelvic region.

Inclusion criteria for patients without PCa were PSA below 2.5 ng/ml; normal digital rectal examination; no family history of PCa; non-black patients; lack of use of urinary catheter; absence of prostate biopsy history; no prior prostate surgery.

The clinical and pathological features of patients with PCa and control patients are summarized in the following table 2:

All patients were submitted to an interview for evaluation of clinical parameters (age, race, family history of CaP, personal and pathological history, total PSA, ratio free / total PSA, PSA density, prostate weight; BXP prior), were informed about the study through the Term of Consent. After completion of the inclusion criteria was collected urine sample of the first jet (50-100ml) after prostatic massage (3 compressions toward base to apex: in lateral lobes and midline). The material was collected in the urology clinic, and quickly routed to the LIM55, where it was processed. The expressions of PSMA, hK3, GREb1 and MMP9 were measured by quantitative polymerase chain reaction technique in real time (qRT-PCR) and was later performed analysis of MMP9 expression by Elisa.

2. RNA extraction and DNA synthesis:

It was used three different methods of RNA extraction from the urine samples. The kit in which we obtained a better use was the mirVana® (Ambion, Austin, TX, USA). After urine is centrifuged, the pellet, which is the sample supernadant was then harvested for RNA extraction. The purity and concentration were estimated at Nanodrop® spectrophotometer (ND-1000, Wilmington, USA) (260/280 nM).

cDNA synthesis was performed from 2µg RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), which utilizes the MultiScribe™ Reverse transcriptase and random primers.

The expression of the genes studied was evaluated from cDNA using reverse transcription methodology followed by quantitative polymerase chain reaction in real-time (qRT-PCR) (ABI7500 platform) using the TaqMan® protocol (Applied Biosystems).

Initial experiments of absolute quantification with β2-microglobulin control gene (B2M) validated the cDNA prior to the experiments to quantify gene of interest. For relative quantification of studied genes the expression of these normalized relative to the expression of B2M control gene (Table 2).

A review of MMP9 protein level was done by ELISA. The first step to carry out the ELISA technique is to make the standard dilution. The standard was reconstituted with standard diluent buffer according to manufacturer's instruction (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO). This reconstitution takes around 10 minutes. The second step was the dilution series of the standard kit (ELISA Kit Human MMP9). This serial dilution acts as a control method. At the end of reading is the standard markers present a desired profile is a sign that the technique was performed correctly. After the standard plate dilution added in 100 µl of urine of each patient in duplicate and the process was conducted according to conventional protocols described by the manufacturer.

For the analysis of clinicopathological variables, patients were divided according to levels of serum PSA (<10 ng / ml vs. ≥10ng / ml), pathological stage (<cT2a vs. ≥cT2a) Gleason score (6 vs. > 6), PSA density (<0.15 vs. ≥0,15), number of fragments in biopsy (≤2 vs. > 2) and percentage of positive fragments (<50% vs. ≥50%). For pathological stage of analysis, we used the 2002 TNM staging system.

3. Statistical Analysis:

To analyze the expression levels of four genes according to the prognostic factors such as Gleason score, level of PSA (ng/ml), disease stage (TNM), number of positive fragments in biopsy and PSA density tests were used Mann-Whitney test, T-test or chi-square.

Statistical analysis was performed using SPSS 19.0 software. In all statistical analysis it was adopted a significance level of 5%, for example they were considered statistically significant results with a p-value less than 5% ($p < 0.05$).

Results:

Comparison of the tissue expression levels of B2M between urine samples from patients with PCa and control group presented homogeneous pattern of expression and thereby made possible the evaluation of samples used in the study.

The analysis of four genes by qRT-PCR in the urine samples showed that MMP9 is overexpressed and PSMA, GREB1 and hK3 were underexpressed in patients with PCa compared to the control group (Figure 1) (Table 3). Overexpression of MMP9 occurred in 85.7% of cases, with an average of 6.4x greater overexpression compared to control patients.

The MMP9 expression levels were also evaluated using the Elisa (Western blot) and was found a overexpression in patients with PCa compared to control patients (1.89 x 1.35) ($p = 0.082$) and AUC : 0.628 (figure 2).

The analysis of gene expression according to the prognostic factors showed no statistical power, however when assessing the joint expression of genes were identified that MMP9 and GREb1 overexpressed were strongly associated with patients with <50% of affected fragments, with significance statistically ($p = 0.036$) and the joint MMP9 and PSMA overexpression was significantly associated with patients with PSA ≥ 10 ng / dL ($p = 0.007$). (Tables 4 and 5)

Regarding the assessment of MMP9 expression levels compared to the prognostic factors using the Elisa, we did not observe any statistically difference between the analyzed factors.

Discussion:

In the present study, we evaluated the technique of qRT-PCR in order pioneered the four-gene expression in the urine of patients with PCa and compared the expression levels with patients without cancer, and relate them to the classic prognostic factors. It was shown that urinary MMP9 showed a pattern of overexpression in 85.7% of patients with PCa compared to control patients, with higher levels of expression 6.4x. This result was confirmed with the analysis of the MMP9 expression by ELISA, which showed overexpression of the same compared to control patients and accuracy of 62.8%.

Among the genes associations, the over-expression between MMP9 and GREb1 was strongly associated with patients with lower volume of disease on biopsy (percentage of fragments <50%) ($p = 0.036$) and MMP9 and PSMA genes were both overexpressed in 100% of cases with PSA ≥ 10 ng / dL ($p = 0.007$). This

data can provide important information about the patients with PCa, for example, predict those patients who should be treated more aggressively (MMP9/PSMA overexpression) of those who because they have lower tumor volume may be observed (MMP9/GREb1 underexpression).

Diagnostic tests that use urine have the advantages of being non-invasive, easy to collect, as the prostate cells are directly released into the urethra after prostatic massage, and are reproducible. For these reasons, in the future, the urine will likely be the ideal means for non-invasive tests with biomarkers and this should be the new frontier of urology to be overcome in relation to diagnostic evaluation and prognosis of PCa. **(8)**

The use of these urinary markers can add information to the current preparatory stage, to predict tumor bulk or worse prognosis as well as clarify diagnostic uncertainty between PCa and benign diseases of the prostate, especially BPH. In cases where PSA is persistently high and prostate biopsy is negative for PCa, overexpression of urinary MMP9 could predict patients who would benefit from repeat biopsy and thus have greater possibility of carrying one or more outbreaks of malignancy. Those with normal levels of urinary markers, could thus only be followed clinically and spared the risks of unnecessary biopsy.

Another viable application to be performed are the cases of patients with indolent or insignificant PCa who entered follow-up protocols for active surveillance, alternative currently held for cases of PCa with favorable prognosis (Gleason score ≤ 6 ; PSA < 10 ng/ml; and $< cT2a$) which are followed clinically and if signs of progression occurs such as elevation of PSA, changed TR or worsening of the biopsy patterns, the patients undergoes active treatment (radical prostatectomy or CxR). In such cases, while monitoring, in addition to PSA, DRE and serial prostate biopsies, the use of urinary markers could help in predicting those patients most likely to disease progression with poor prognosis and thus indicate active treatment earlier. **(9) (10).**

In 2009, Dos Reis et al demonstrated that the presence of certain polymorphisms in alleles of the MMP9 gene in prostate tissue with PCa was more prevalent in this tissue than in controls without PCa. **(11)**

More recently, the same authors have demonstrated, using radical prostatectomy samples, overexpression of MMP9 in cases of PCa 9.2 times higher than BPH cases, and statistically relevant in cases with higher PSA and higher expression of this marker in cases of biochemical recurrence, proving the usefulness of this marker in the diagnosis of PCa. **(12)**

As the prostate tumors has heterogeneous character and are usually multifocal, it is likely that a panel of markers, more than a marker alone, is the ideal way to assess this kind of neoplasia. This is an advantage in using urine as a means of evaluation as that by this method we can evaluate the prostate gland in a global manner, because the genetic material is secreted in urine from multiple tumor foci. Thus, in our study a combination of genes was performed to evaluate whether it would be possible to increase the possibility of providing relevant information in relation to prognostic factors.

The most studied gene association is currently the PCA3 and TMPRSS-ERG 2, the latter being a gene present in 50% of cases of CaP, with high specificity and related to unfavorable prognostic factors, such as higher Gleason score, disease extra- prostate and increased biochemical recurrence rate. The great advantage of the joint assessment of the genes is able to lend the qualities of each gene into a single examination and thereby increase the sensitivity and specificity in the evaluation of a particular disease. PCA3 is also a specific prostate cancer biomarker, overexpressed in more than 95% of PCA cases. So you can avoid unnecessary performing invasive diagnostic tests such as prostate biopsy, and increase accuracy in disease detection which treatment is really necessary, thus avoiding the diagnosis of indolent tumors, which may not cause symptoms or death patient. **(13)**

Our study has some limitations. Among them, the small sample of patients is one of the most important, since it cannot represent the general population. However, because it is an initial prospective study aiming to relate the markers in urine collected with PCa, sampling can be increased in later stages of the study to confirm the initial hypotheses. The heterogeneity of the sample, including patients with localized tumors, locally advanced and metastatic may also have contributed to the genetic profile found. Perhaps at a later assessment may be necessary to analyze the categories individually, especially locally advanced

tumors, in order to determine the role of these urinary genes in these patients. Another important limiting factor of the study were technical barriers, such as the initial difficulties in processing and storage of urine, which can contribute to errors in the evaluation of gene expression.

At a later stage, as a future perspective, we could study the relationship of genes in the diagnosis of PCa collecting the urine of patients with elevated PSA and suspicion of PCa before biopsy and correlate with the results after this procedure. While for the assessment of prognosis, we may collect the urine of PCa patients on active surveillance protocol and correlate the genetic expressions with the evolution of patients.

Conclusion:

Urinary MMP9 is overexpressed in patients with PCa compared to patients without PCa and can be used as a tool for diagnosis of neoplasm.

The joint overexpression of MMP9 and GREb1 genes may be related to lower volume tumors while joint overexpression of MMP9 and PSMA genes may be related to tumors with higher PSA, possibly indicating tumors of poorer prognosis.

ABSTRACT

PURPOSE: The vast majority of patients undergoing prostate biopsy do not have cancer and therefore undergo unnecessary biopsies. Moreover, many prostate cancer cases do not need to be treated due to the indolent behavior. Therefore, more accurate tools for diagnosis and prognosis of PCa are necessary and urinary markers are promising tools. To evaluate the expression of 5 genes (MMP9, PSMA, GREB1, hk3, PCA3) in urine of patients with PCa and to determine whether there is a relationship with the prognostic factors. **MATERIALS AND METHODS:** The study consisted of the analysis of 46 patients with PCa and 28 controls. The urine of patients was collected after prostatic massage and gene expression analyzed by RT-PCR. Besides the analysis of gene expression compared to cases without cancer, the profiles according to prognostic factors were evaluated. **RESULTS:** An over-expression of urinary MMP9 was demonstrated in 85.7% of PCa patients compared to controls, median 6,4x. The other genes showed a more heterogeneous pattern. When considered together, it can be evidenced that the simultaneous over-expression of MMP9 and PSMA was present in 100% of patients with PSA $\geq$ 10ng/ml and over-expression of MMP9 and GREb1 was present in 66.7% of patients <50% positive fragments involved. **CONCLUSIONS:** Overexpression of MMP9 was observed in PCa and it can be helpful to avoid unnecessary prostate biopsies. Furthermore, overexpression of PSMA and MMP9 may be related to higher PSA tumors and therefore more unfavorable prognosis, whereas overexpression of MMP9 and GREb1 together may be related to lower volume tumors.

ABBREVIATIONS

PCa: Prostate cancer

PSA: prostate specific antigen

BPH: Benign prostatic hyperplasia

DRE: Digital rectal examination

MMP9: Matrix metalloproteinase 9

PSMA: Prostate specific membrane antigen

hK3: kalikrein 3

GREB1: Gene regulated by estrogen in breast cancer

B2M: Beta 2 – microglobulin

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

Table 1 – Clinical-Pathological data of patients with PCa and control group.

Characteristics	PCa (n=46)	Control (n=28)	p
Age (years)			0,01
Median	68	60	
Min-max	55-81	40-77	
PSA (ng/ml)			0,0003
Median	8,14	1,0	
Min-max	2,8-94	0,4-2,5	
DRE			NA*
Normal	23 (52%)	28 (100%)	
Abnormal	22 (48%)	0 (0%)	
Prostate weight (g)			0,742
Median	40	35	
Min-max	20-93,6	17,8-75,5	
Gleason score		NA*	NA*
6	22 (47,8%)	NA*	
>6	24 (52,1%)	NA*	
Clinical staging		NA*	NA*
cT1c	23 (50%)	NA*	
cT2	19 (41%)	NA*	
cT3-4	4 (9%)	NA*	

NA*: not aplicable

Table 2. Identification of genes and B2M, analyzed by qRT-PCR

Gene	Assays IDs
<i>MMP9</i>	<i>Hs00234579_m1</i>
<i>GREB1</i>	Hs00536409_m1
<i>HK3</i>	<i>Hs01092839_m1</i>
<i>PSMA</i>	Hs00379515_m1
<i>B2M</i>	Hs00984230_m1

Table 3. Average expression of genes studied in patients with PCa compared with control patients.

	PSMA	GREb1	hK3	MMP9
Average	1,02x	0,57x	0,65x	6,4x
Median	0,09x	0,07x	0,23x	4,49x
Over-expression	16,2%	19,5%	26%	85,7%
Under-expression	83,8%	80,5%	74%	14,3%

Table 4. Combined gene expression compared to the level of PSA (ng/ml).

PSA Percentage (%)				
Gene combination		<10	≥10	p
MMP9/hK3	Underexpression	75,0%(18)	81,3%(13)	0,643***
	Over-expression	25%(6)	18,8%(3)	
MMP9/GREb1	Underexpression	87%(20)	60%(9)	0,056***
	Over-expression	13%(3)	40%(6)	
MMP9/PSMA	Underexpression	100%(21)	69,2%(9)	0,007***
	Over-expression	0%(0)	30,8%(4)	

*T-test; **Mann-Whitney; ***Qui-Quadrado

Table 5. Combined gene expression with respect to percentage of fragment in the prostate biopsy.

Percentage of fragment				
Percentage (%)				
Gene combination		<50%	≥50%	p
MMP9/hK3	Underexpression	71,4%(5)	66,5%(6)	0,838***
	Over-expression	28,6%(2)	33,3%(3)	
MMP9/GREb1	Underexpression	33,3%(2)	87,5%(7)	0,036***
	Over-expression	66,7%(4)	12,5%(1)	
MMP9/PSMA	Underexpression	75%(3)	100%(7)	0,165***
	Over-expression	25%(1)	0%(0)	

*T-test; **Mann-Whitney; ***Qui-Quadrado

Figure 1 – Expression levels of urinary markers (PSMA, GREB1, hK3 and MMP9) in patients with PCa compared to controls.

Figure 2 – ROC curve analysis for urinary MMP9 in the diagnosis of patients with CaP.

***The Journal of Urology*® Author Submission Requirement Form**

TITLE:

New Perspectives in Urinary Markers of Prostate Cancer: Role of MMP9, GREb1, hK3 and PSMA Gene Expressions.

Authors:

Luiz Henrique Araujo*, Gabriel dos Anjos, Sabrina Thalita dos Reis, Nayara Viana, Katia Moreira Leite, Miguel Srougi, Alberto Azoubel Antunes

Each author must read and sign (electronic signatures are acceptable) the statements below before manuscripts will be considered for publication in *The Journal of Urology*®. **Manuscripts submitted without all signatures on all statements will be returned immediately to the authors.** This form is available online at www.editorialmanager.com/ju. One author should be designated as the correspondent, and the complete address, telephone number, facsimile number and e-mail address provided.

Authorship credit should be based on 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; AND 3) final approval of the version to be published.

When a large, multicenter group has conducted the work, the group should identify as authors only those individuals who fulfill the above requirements and accept direct responsibility for the manuscript. The corresponding author must clearly indicate the preferred citation and identify all individual authors as well as the group name. Members of the group who are not designated as authors by the corresponding author will be listed in the Acknowledgments at the end of the manuscript.

I. Authorship Responsibility, Criteria and Contributions

A. By checking the appropriate boxes below, each author certifies that

- ☒ the manuscript represents valid and original work;
- ☒ the manuscript or portions thereof are not under consideration by another journal or electronic publication and have not been previously published except as an abstract;
- ☒ the manuscript or portions thereof have not been considered previously by *The Journal of Urology* and/or its supplements (including joint supplements);
- ☒ if requested I will provide raw data on which the manuscript is based for examination by the editors and reviewers;
- ☒ if I am the corresponding author I agree to be responsible for indicating the source of extra-institutional funding, in particular that provided by commercial sources, internal review board approval of study, accuracy of the references and all statements made in the work, including changes made by the copy editor, upon review of the proof; or if I am not the corresponding author I agree to assign the aforementioned responsibilities to the corresponding author;
- ☒ I have read and approve the final manuscript; and
- ☒ I have made a substantive contribution to the information or material submitted for publication to take public responsibility

B. To qualify for authorship each author must indicate his/her substantive contribution to the intellectual content of the manuscript by checking a minimum of 1 box for each of the following 3 categories of contributions and complete number 4.

1. **Conception and design**
Data acquisition
Data analysis and interpretation
2. **Drafting the manuscript**
Critical revision of the manuscript for scientific and factual content
3. **Statistical analysis**

I HAVE PARTICIPATE IN ALL 3 TOPICS ABOVE.

Supervision

Other (specify) _____

4. Indicate the length of time for the work itself, from initial conception and planning to the present: 4 years.

↑

II. Conflict of Interest/Disclosure Policy. Please check the appropriate box below

- ☒ I have no direct or indirect commercial financial incentive associated with publishing the article
- ☒ No funding agreement limits my ability to complete and publish this research/study
- ☒ I have full control of the primary data
- ☒ I have read and signed the AUA Disclosure Form.

III. Copyright Transfer. In consideration of the Editors of *The Journal of Urology*® taking action in reviewing and editing my submission, the author(s) undersigned hereby transfers, assigns or otherwise conveys all copyright ownership to the American Urological Association, Inc., Copyright Owner of *The Journal of Urology*®, in the event that such work is published in The Journal. Authors employed by the U.S. Federal Government are exempt from Copyright Transfer. All authors have read and comply with the requirements set forth herein and in the Information for Authors.

LUIZ HENRIQUE ARAÚJO

Author Signature

09/29/2015

Date Signed

The following 2 sections require only the Corresponding Author signature:

IV. Ethical approval of studies.

1. By checking the appropriate boxes the corresponding author certifies that a statement(s) has been included in the manuscript documenting

☒ Institutional review board, ethics committee or ethical review board study approval

↑ ☒ Institutional animal care and use committee approval

☒ In lieu of a formal ethics committee, the principles of the Helsinki Declaration were followed

☒ All human subjects provided written informed consent with guarantees of confidentiality

2. IRB approved protocol number is _____

3. Animal approved project number is _____

V. Acknowledgment Statement. As corresponding author check the box below that applies:

☒ I certify that all individuals named in an Acknowledgment have given me permission to be named

X I certify that no other persons have made substantial contributions to this manuscript to warrant an Acknowledgement section.

LUIZ HENRIQUE ARAUJO
Corresponding Author Signature

09/29/2015
Date Signed

Copyright ©2014 by American Urological Association

American Urological Association (AUA) Disclosure Form for Authors

The AUA requires that prior to participating in programs all individuals make full disclosure of relationships, business transactions, presentations or publications related to healthcare or AUA activities. The time frame for this reporting is that of the work itself, from the initial conception and planning to the present. If you have questions, please review the [AUA Principles, Policies and Procedures for Managing Conflicts of Interest](#) or the [Frequently Asked Questions](#) document.

Each disclosure begins by asking the following questions:

1. To whom does this disclosure apply?
☒ Self ☐ Family ☐ Business Partner
2. What is the name of company or organization?
3. Is this a financial relationship?
 - ☐ Yes Financial relationships are those relationships in which individuals benefit by receiving a salary, royalty, intellectual property rights, consulting fee, honoraria, ownership interest (e.g., stocks, stock options or other ownership interest, excluding diversified mutual funds), or other financial benefit. Financial relationships consist of employment, management position, independent contractor (including contracted research), consulting, speaking and teaching, membership on advisory committees or review panels, board membership, and other activities from which remuneration is received, or expected.
 - ☒ No Relationships should be reported regardless of whether or not compensation was received.
4. What is the type of relationship?
All relationships in commercial interests should be reported. A commercial interest is any entity producing, marketing, re-selling or distributing healthcare goods or services consumed by, or used, on patients.

☐ Leadership Position	Board, officer, trustee, editor or other leadership position in commercial society or organization
☐ Health Publishing	Editorial boards and authors, including any publishing, royalty arrangements.
☐ Consultant/ Advisor	Includes service on advisory boards.
☐ Meeting Participant /Lecturer	Honoraria, reimbursements or in-kind payments received as faculty members, speakers' bureau, industry sponsored lectures, presenters, chairs, proctors or consultants. Any role which is beyond that of meeting attendee should be disclosed.
☐ X Scientific Study/ Trial	Includes research as a principle investigator as well as grant support for scientific studies or trials within a member's institution where a member has direct knowledge of these activities.
☐ Investment Interest	Personal or family stock ownership, dividends or revenue received from commercial interests providing healthcare or services. <i>Passive stock ownership such as mutual funds need not be disclosed.</i>
☐ Owner, Product Development	Ownership in any commercial entity, including publishing, known outstanding patents, royalties, internet, e-commerce, ancillary services or other business enterprise that provides healthcare products or services related to AUA activities.
☐ Employee	Salaries from any commercial entity, including any publishing, internet, e-commerce or other business enterprise that provides healthcare products or services related to AUA activities.
☐ Expert Witness	Expert medical testimony for a trial, hearing, deposition, affidavit or any other type of legal proceeding
☐ Other (please specify)	<input type="text"/>
5. General Memo Statement: Provide a brief description of the nature of the relationship being disclosed. (500 characters or less)

6. Indicate the length of time for the work itself, from initial conception and planning to the present. 4YEARS
7. I have no direct or indirect commercial incentive associated with publishing the article.

Signature LUIZ HENRIQUE ARAUJO
09/29/2015

Date

Formatted: Portuguese (Brazil)

Formatted: Portuguese (Brazil)

Please return signed form to: AUA, Publications Department, 1000 Corporate Blvd. Linthicum, MD 21090 (FAX: 410-689-3906)