

RUI MANUEL TRINDADE OLIVEIRA
LICENCIADO EM BIOLOGIA

**ESTUDO DOS ANTIGÉNIOS HLA
NO
CANCRO DA PRÓSTATA**

ORIENTADO POR:

Prof.^a Dr.^a Maria Berta de Jesus Duarte da Silva

UNIVERSIDADE DO PORTO

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

DEZEMBRO 2001



RUI MANUEL TRINDADE OLIVEIRA
LICENCIADO EM BIOLOGIA

**ESTUDO DOS ANTIGÉNIOS HLA
NO
CANCRO DA PRÓSTATA**

ORIENTADO POR:

Prof.^a Dr.^a Maria Berta de Jesus Duarte da Silva

UNIVERSIDADE DO PORTO

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

DEZEMBRO 2001



DISSERTAÇÃO PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE (MESTRADO EM
MEDICINA LEGAL)

RESUMO

O cancro da próstata, que constitui a segunda maior causa de morte por cancro nos homens a seguir ao cancro do pulmão, é uma doença que encurta dramaticamente a esperança de vida. À excepção dos tumores da pele, nas sociedades ocidentais é a neoplasia maligna mais frequente no homem. Ainda hoje, não se dispõe de tratamento eficaz para a maioria dos carcinomas prostáticos. Assim, a imunologia tumoral é uma área potencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

O Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) desempenha um papel fundamental na resposta imune. É bem conhecida a associação de um ou vários alelos HLA a inúmeras doenças do foro imune.

Está bem definido que o reconhecimento de células tumorais por parte dos linfócitos T CD8⁺, requer a presença à superfície da célula de antígenos HLA classe I e de peptídeos derivados do tumor. A síntese e apresentação de moléculas HLA classe I funcionais envolve uma série de eventos, que podem ser afectados por vários mecanismos e levar a alterações no nível de expressão destas moléculas à superfície das células. Segundo Garrido *et al.* ⁽⁵³⁾ 40% a 90% dos tumores invasivos apresentam diminuição ou ausência total do nível de expressão. Graças a um crescente aumento do painel de anticorpos anti-HLA, cada vez mais específicos, Garrido *et al.* ⁽⁵³⁾ propuseram uma classificação de 5 fenótipos HLA alterados: Fenótipo I, perda total dos antígenos HLA; Fenótipo II, perda de um haplótipo HLA; Fenótipo III, perda de um *locus* HLA; Fenótipo IV, perda de um alelo HLA; Fenótipo V, fenótipo complexo.

Com este trabalho pretendeu-se identificar os alelos do *locus* HLA-DRB1 em indivíduos do Norte de Portugal, submetidos a biópsia prostática transrectal (com suspeita de carcinoma da próstata). Foram calculadas as frequências fenotípicas e comparadas com as de uma população controlo. Outro objectivo foi avaliar o nível de expressão dos antígenos HLA da classe I no tecido, por imunohistoquímica.

Este estudo permitiu encontrar uma associação entre os doentes com carcinoma da próstata e os alelos HLA-DRB1*0701 (com uma frequência fenotípica de 58,3% vs. 24,6% na população controlo) e HLA-DRB1*1001 (com uma frequência fenotípica de 33,3% nos indivíduos com um tumor moderadamente diferenciado vs. 6,6% na população controlo). Estes alelos poderão ser considerados alelos de susceptibilidade à doença. Observou-se ainda uma diminuição do alelo HLA-DRB1*13 na população de

doentes (12,5% vs. 29,5% na população controlo), sugerindo que este poderá ser um alelo de protecção ou de resistência à doença.

Quanto ao estudo imunohistoquímico, observa-se uma diminuição ou perda total da expressão da β 2-microglobulina, no tecido neoplásico, em 80% dos casos. Apesar do reduzido número de casos estudados, para a avaliação da expressão da cadeia α do HLA classe I com o anticorpo HC10, observa-se que em 85,7% dos casos houve perda parcial ou total da expressão destes antigénios.

RÉSUMÉ

Le cancer de la prostate est la deuxième cause de mort par cancer aux hommes, après le cancer du poumon et c'est une maladie qui réduit dramatiquement l'espérance de vie. A l'exception des tumeurs de la peau, le cancer de la prostate est la néoplasie maligne la plus fréquente chez l'homme, dans les sociétés occidentales. Aujourd'hui, on a pas encore une thérapie efficace pour la majorité des carcinomes de la prostate. Alors, l'immunologie tumorale est une matière potentielle pour le développement de stratégies thérapeutiques.

Le Complexe Major d'Histocompatibilité (MHC) a un rôle fondamental dans la réponse immunologique. L'association d'un ou plusieurs allèles HLA a beaucoup de maladies immunologiques est bien connue.

Aujourd'hui, c'est bien connue que la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T CD8 exige l'existence des antigènes HLA classe I et de peptides à la surface de ces mêmes cellules.

La production et présentation des molécules HLA classe I fonctionnelles implique une série d'événements qui peuvent être affectés par plusieurs mécanismes et qui peuvent provoquer des altérations sur le niveau d'expression de ces molécules à la surface des cellules. Garrido *et al.* ⁽⁵³⁾ ont démontré que la plupart des tumeurs invasives (40% à 90%) perdent totalement ou partiellement l'expression cellulaire des antigènes HLA. Les anticorps monoclonaux utilisés en immunohistochimie ont permis à Garrido *et al.* ⁽⁵³⁾ la classification de 5 phénotypes HLA altérés: Phénotype I, perte totale des antigènes HLA; Phénotype II, perte d'un haplotype HLA; Phénotype III, perte d'un locus HLA; Phénotype IV, perte d'un allèle HLA; et Phénotype V, phénotype complexe.

Un des objectifs de ce travail a été l'identification des allèles HLA-DRB1 chez des patients du nord de Portugal, suspects d'avoir un cancer de la prostate. Les fréquences phénotypiques ont été déterminées et comparées avec les fréquences d'une population de référence. L'autre objectif a été l'évaluation de l'expression des antigènes HLA classe I sur les tissus néoplasiques, par immunohistochimie.

On a observé une élévation de la fréquence phénotypique des allèles HLA-DRB1*0701 et HLA-DRB1*1001 chez les patients avec cancer de la prostate: 58,3% vs. 24,6% chez la

population de référence pour HLA-DRB1*0701 et 33,3% chez les patients avec un tumeur modérément différencié vs. 6,6% chez la population de référence pour HLA-DRB1*1001. Ces deux allèles peuvent être des allèles de susceptibilité pour le cancer de la prostate.

On a encore observé une diminution de la fréquence de l'allèle HLA-DRB1*13 chez le group de patients (12,5% vs. 29,5% chez la population de référence). Cette diminution suggère que celui-la est peut-être un allèle de protection où de résistance à la maladie.

Dans l'étude immunohistochimique, on a observé une diminution où perte totale de l'expression de la β 2-microglobuline, sur les tissus néoplasiques, chez 80% des cas. Pour l'évaluation de l'expression de la chaîne α du HLA classe I, on a observé perte partielle où totale chez 85,7% des cas.

SUMMARY

Prostate cancer, which is the second leading cause of cancer death in men after lung cancer, is a life shortening disease. With the exception of skin tumours, in the western societies, prostate cancer represents the most common malignant transformation that occurs in humans. We still don't have an effective treatment for most prostatic carcinomas. So being, tumour immunology is a potential area for the development of therapeutic strategies.

The Major Histocompatibility Complex (MHC) has a key role in immune response. It's well established that many immune diseases are associated with one HLA allele or with a specific HLA haplotype.

It is now well known that the recognition of cancer cells by T CD8 lymphocytes, needs the presence of HLA class I antigens and tumour derived peptides on the cell's surface. The production and presentation of functional HLA class I molecules involves a number of events which can be affected by several mechanisms, and lead to downregulation of HLA class I antigens. Garrido *et al.* ⁽⁵³⁾ have demonstrated that invasive tumours totally or partially lose HLA antigens at a very high frequency (between 40% and 90%). Thanks to a broad panel of anti-HLA monoclonal antibodies, more and more specific, Garrido *et al.* ⁽⁵³⁾ have proposed a classification of 5 altered HLA class I tumour phenotypes. These phenotypes include Phenotype I, total HLA loss; Phenotype II, HLA haplotype loss; Phenotype III, HLA A and B *locus* loss; Phenotype IV, HLA allelic loss; and Phenotype V, compound phenotype.

One of the objectives of this study was to define the HLA-DRB1 alleles in patients of the north of Portugal (with suspicion of having prostate cancer), that have undergone transrectal prostatic biopsy. The obtained phenotypic frequencies have been compared with those of a healthy control group. Another objective was to evaluate, by immunohistochemistry, the level of expression of HLA class I antigens in tumour tissues of patients with prostate cancer.

In this study, we observed in patients with prostate cancer, an elevation in the frequencies of HLA-DRB1*0701 (58,3% vs. 24,6% in the control group) and HLA-DRB1*1001 (33,3% in patients with a moderately differentiated tumour vs. 6,6% in the control group). These two alleles may well be susceptibility alleles to prostate cancer. We also observed that the frequency of HLA-DRB1*13 was lower in patients

population (12,5% vs. 29,5% in control group), suggesting that this may be a protective allele.

In the immunohistochemical study, we observed a partial or total loss of β 2-microglobulin expression in neoplastic tissue, in 80% of cases. We also observed a partial or total loss of HLA class I α chain in 85,7% of cases.

AGRADECIMENTOS

Para a execução deste trabalho, foi fundamental o apoio de várias pessoas que contribuíram, de diferentes formas, para a sua realização.

Agradeço, em primeiro lugar, à minha orientadora, a Prof. Doutora Berta Martins, pela disponibilidade demonstrada durante todo o tempo de execução do trabalho, pelos conhecimentos fornecidos, e pelo auxílio e tempo dispensados durante o estágio realizado no laboratório por ela coordenado.

Ao Dr. Estêvão Lima do Serviço de Urologia do Hospital Geral de Santo António, pelo enorme interesse e apoio sempre demonstrados na execução este trabalho, sobretudo no acompanhamento e elaboração da parte clínica, e pela facultação das amostras biológicas necessárias para a realização do estudo.

Ao Prof. Doutor Vicente Gonçalves do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Geral de Santo António, pelo interesse, disponibilidade e pronta colaboração demonstrados, sobretudo no estudo das amostras histológicas dos doentes. Gostaria também de agradecer à Prof. Doutora Fátima Gärtner pela sua disponibilidade e colaboração, assim como aos restantes que fazem parte do Laboratório de Patologia Veterinária, em especial às técnicas Alexandra Rêma e Eduarda Ribeiro, que tanto me ajudaram nesta parte do trabalho.

Ao Prof. Doutor Pinto da Costa por todo o interesse e disponibilidade facultados, e pelo entusiasmo e encorajamento sempre demonstrados, manifesto os meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Dalila Pinto e Dra. Clara Pereira, pelo enorme apoio e pronta colaboração demonstrados, tanto nas tarefas de laboratório, como na experiência e conhecimentos fornecidos.

À D. Sara Casimiro, pela ajuda indispensável na recolha do material biológico dos doentes e pelas suas palavras amigáveis e força transmitidos. À Dra. Joana Cerqueira, Dra. Sónia Paupério e D. Elisa, com as quais tive oportunidade de conviver na execução da parte prática deste trabalho, agradeço a disponibilidade e ajuda prestadas.

Agradeço também ao Dr. Rui Claro, pela ajuda prestada a nível informático, na elaboração do relatório final.

Desejaria agradecer de forma especial à minha colega e amiga, a Doutora Célia Bessa, pela sua sempre pronta colaboração e interesse demonstrados, pela atenção e disponibilidade sempre facultados, e pela ajuda preciosa entregue durante a execução do

trabalho, quer a nível prático, quer na elaboração do relatório final. A ela, gostaria sobretudo de agradecer a força, o companheirismo e a amizade transmitidos a todo o momento.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família, principalmente aos meus pais e irmã, por todo o carinho e apoio que sempre demonstraram e que também tornou possível a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO

1. O Cancro da Próstata	1
1.1. Principais Factores de Risco	2
1.1.1. Idade	2
1.1.2. História Familiar	3
1.1.3. Etnia	3
1.2. Factores de Risco Prováveis	3
1.2.1. Dieta alimentar	3
1.2.2. Hormonas	4
1.3. Potenciais Factores de Risco	4
1.4. Patologia do Adenocarcinoma da Próstata	5
1.5. Sistema de Gleason	6
1.6. Subtipos de Carcinoma da Próstata	7
1.7. Diagnóstico e Estadiamento	8
1.7.1. Meios de Diagnóstico	8
1.7.1.1. O Exame de Toque Rectal (ETR)	8
1.7.1.2. O Antígeno Específico da Próstata (PSA)	9
1.7.2. Estadiamento	11
2. O Sistema HLA e o Cancro da Próstata	13
2.1. O Sistema HLA	13
2.2. A expressão dos antígenos HLA nos tumores	17
2.2.1. Mecanismos susceptíveis de levarem a alterações no nível de expressão dos antígenos HLA	18
2.2.1.2. Mecanismos inerentes à acção de vírus	19
2.2.1.3. Mecanismos associados à expressão de oncogenes	20
2.2.1.4. Mecanismos que afectam o transporte e processamento das moléculas HLA	21
2.2.2. Fenótipos HLA alterados	22
2.3. Fenótipos HLA alterados associados ao escape às células T e NK	24
3. Aplicação clínica dos conhecimentos na elaboração de uma imunoterapia dirigida	27

II - OBJECTIVOS	29
III - MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Diagnóstico histológico e selecção da população estudada	30
3.2. Material biológico	30
3.2.1. Colheita das amostras	30
3.3. Estudos genéticos	32
3.3.1. Extracção de DNA – Método Clássico: “Salting Out”	32
3.3.2. Tipagem genética HLA classe II- DRB1	33
3.3.2.1. Amplificação de baixa resolução dos alelos do <i>locus</i> HLA-DRB1 por PCR-SSP	33
3.3.2.2. Electroforese em gel de agarose	37
3.3.3. Estudo imunohistoquímico da expressão dos antigénios HLA classe I	37
3.3.3.1. Método da Avidina-Biotina-Peroxidase Complexo (ABC)	39
3.4. Análise estatística	41
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Tipagem genética do <i>locus</i> HLA-DRB1	45
4.1.1. Exemplo de genotipagem HLA Classe II - <i>locus</i> DRB1	45
4.1.2. Frequências fenotípicas obtidas para os alelos HLA-DRB1	47
4.2 Estudo imunohistoquímico da expressão dos antigénios HLA classe I	52
V - CONCLUSÕES	57
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
VII - ANEXOS	

I - INTRODUÇÃO

1. O Cancro da Próstata

O cancro da próstata constitui hoje um dos desafios mais significativos ao qual, tanto a comunidade médica como a comunidade científica, têm tentado fazer face. À excepção dos tumores da pele, o cancro da próstata representa a neoplasia maligna mais comum no homem, causando anualmente quase tantas mortes quanto as causadas pelo cancro da mama nas mulheres ⁽¹⁾. Só na União Europeia são detectados 85 mil novos casos por ano, explicando 9% de todas as mortes por cancro no homem ^(2, 3). O cancro da próstata, que é a segunda maior causa de morte por cancro nos homens a seguir ao cancro do pulmão, é uma doença que encurta dramaticamente a esperança de vida. Após os 50 anos de idade, verifica-se nos homens um aumento quase exponencial das taxas de incidência e de mortalidade do cancro da próstata ⁽⁴⁾. A incidência na Europa é de 30 em 100 mil homens ⁽⁵⁾. No norte de Portugal (região de Vila Nova de Gaia), a taxa de incidência bruta do cancro da próstata é de 13,1 em 100 mil indivíduos e o risco cumulativo (probabilidade de um indivíduo vir a desenvolver cancro da próstata) é de 1,4 ⁽⁶⁾.

Noventa e cinco por cento dos casos de cancro da próstata são diagnosticados em homens com idades compreendidas entre os 45 e os 89 anos, com uma idade média de diagnóstico situada nos 72 anos. Aproximadamente 50% dos indivíduos com este diagnóstico desenvolvem metástases, evoluindo para um tumor maligno ⁽⁴⁾.

O desenvolvimento de estratégias de prevenção com sucesso é facilitado, se houver uma compreensão da etiologia da doença e conhecimento dos factores que contribuem para o processo carcinogénico.

Apesar das fases do processo de carcinogénese já terem sido demonstradas para muitos tipos de cancro no homem, a elucidação da cascata de acontecimentos envolvidos na transformação das células prostáticas tem-se revelado mais difícil, e só recentemente alguns investigadores começaram a identificar os oncogenes e os genes supressores tumorais envolvidos na carcinogénese da próstata ^(4, 7). O cancro da próstata é único entre os tumores sólidos, na medida em que existe essencialmente sob duas formas: uma forma histológica ou latente, que pode ser identificada em

aproximadamente 30% dos homens com idades superiores a 50 anos, e a forma clínica que afecta aproximadamente 1 em cada 6 americanos durante o seu tempo de vida ⁽⁴⁾.

A cinética de crescimento do cancro da próstata depende da relação entre a percentagem de células que proliferam e a percentagem de células que morrem. A transformação das células epiteliais normais da próstata em células neoplásicas intraepiteliais prostáticas de alto grau (PIN), uma provável lesão precursora, pelo menos para determinados tipos de carcinoma prostático, envolve um aumento na proliferação e na morte celular, resultando num aumento de actividade celular e aumentando assim o risco de outras alterações genéticas ^(4, 7, 8).

Tem-se demonstrado que a perda de vários genes supressores tumorais ocorre nas últimas fases de transformação das células prostáticas. Estudos acerca da perda de heterozigotia (LOH – “Loss Of Heterozygosity”), identificando áreas de deleção cromossómica consistente, identificaram importantes genes supressores tumorais nos cromossomas 8p, 10q, 13q, 16q, 17p e 18q ^(4, 7).

A importância do cromossoma 17, onde está localizado o gene p53, assim como outros potenciais genes supressores tumorais, está também a tornar-se mais clara ^(4, 9). Apesar de não parecerem comuns nos tumores de baixo grau clinicamente localizados, as mutações do gene p53 ocorrem em cerca de 50% dos tumores de alto grau, com metástases ⁽⁴⁾.

A mortalidade resultante do cancro da próstata tem vindo a aumentar, se bem que a um ritmo cada vez menor. No entanto, este aumento é secundário, muito provavelmente devido ao facto da esperança média de vida ter aumentado para os homens e pelo facto da mortalidade resultante das doenças cardiovasculares ter diminuído ⁽⁴⁾.

1.1. Principais Factores de Risco

O desenvolvimento do cancro da próstata é dependente de influências hormonais, hereditárias e exposição a agentes ambientais, entre outros factores.

1.1.1. Idade

A prevalência do cancro da próstata continua a aumentar com a idade, e depois dos 50 anos, tanto a taxa de incidência como a de mortalidade aumentam quase

exponencialmente. Além disso, o cancro da próstata é, de todos os cancros, aquele cuja incidência aumenta com a idade. Numa população envelhecida, a prevalência do cancro da próstata continuará a aumentar ^(4, 10).

1.1.2. História Familiar

Uma forma prematura de cancro da próstata pode ser herdada geneticamente, de forma autossómica dominante, através de um alelo de ‘alto risco’ (de susceptibilidade à doença) que é raro. Esta forma de cancro familiar é responsável por cerca de 9% de todos os cancros da próstata diagnosticados, e por 45% dos casos de homens com idades inferiores a 55 anos ^(4, 10).

1.1.3. Etnia

Verifica-se uma grande variação na taxa de incidência de cancro da próstata, registada nos diferentes grupos étnicos. Nos orientais, a taxa de incidência de cancro da próstata é baixa. Constatou-se que os homens de raça negra que vivem nos Estados Unidos têm uma taxa de incidência mais elevada, quando comparada com a taxa de incidência nos homens de raça branca, com nível de educação semelhante e pertencentes às mesmas classes socio-económicas. Na raça negra, a taxa de incidência de cancro da próstata é mais elevada em todas as idades. Os homens de raça negra são frequentemente diagnosticados com estadios mais avançados da doença e as taxas de sobrevivência são mais baixas do que as registadas na raça branca ^(4, 10).

1.2. Factores de Risco Prováveis

1.2.1. Dieta alimentar

Um factor importante no desenvolvimento do cancro da próstata é a dieta. O consumo excessivo de gordura, carne e peixe cozinhados a elevadas temperaturas na dieta alimentar é apontado como um importante factor de risco. Levantou-se a hipótese dos padrões dietéticos poderem alterar a produção de hormonas sexuais e aumentarem o risco de cancro da próstata. Esta hipótese tem implicações, não apenas no consumo de

gordura na dieta alimentar, mas também de vitaminas lipossolúveis, como as vitaminas A, D e E, e ainda micronutrientes associados, como o zinco ^(4, 10).

1.2.2. Hormonas

A próstata é um órgão dependente de androgénios. A testosterona é necessária ao crescimento de um epitélio prostático normal. Além disso, mostrou-se que o cancro da próstata precoce é endócrino-dependente. Ainda pouco se sabe da interacção das hormonas esteróides com o desenvolvimento do cancro da próstata. No entanto, está demonstrado que uma dieta pobre em gorduras e rica em fibras afecta o metabolismo das hormonas sexuais no homem, levando a uma diminuição da testosterona circulante ⁽⁴⁾.

Demonstrou-se que jovens de raça negra apresentam níveis de testosterona cerca de 15% mais elevados que os jovens de raça branca. Esta diferença pode ser o suficiente para explicar o risco aumentado de cancro da próstata encontrado nos homens de raça negra. É certo que as hormonas desempenham um importante papel na fisiologia normal da glândula prostática e sabe-se também que têm um papel importante na carcinogénese desta glândula; no entanto, a sua relação com o risco de cancro da próstata ainda não está bem definida ^(4, 10).

1.3. Potenciais Factores de Risco

Vários estudos sugerem que a **vasectomia** pode aumentar o risco de cancro da próstata, especialmente se a vasectomia foi realizada numa idade jovem (inferior a 35 anos de idade). No entanto, estas observações têm sido fortemente debatidas pelos especialistas. Outros estudos referem que, se a vasectomia está associada a um aumento do risco de cancro da próstata, este risco parece ser baixo ^(4, 10).

Outros estudos revelaram também uma fraca associação entre a **exposição ao cádmio** e o risco de cancro da próstata ⁽⁴⁾.

Verificou-se também que o risco de cancro da próstata associado à dieta rica em **vitamina A** pode, no entanto, ser um reflexo do aumento do risco associado ao consumo excessivo de gordura animal. Nos Estados Unidos, as taxas de mortalidade

associadas ao cancro da próstata são inversamente proporcionais à radiação ultravioleta, que é necessária para a síntese da vitamina D. Em laboratório, demonstrou-se que a vitamina D induz a diferenciação e provoca uma diminuição no crescimento das células tumorais prostáticas ⁽⁴⁾.

1.4. Patologia do Adenocarcinoma da Próstata

Com a chegada da biópsia por agulha fina e do *screening* utilizando os níveis de PSA (“Prostate Specific Antigen”) no soro, tem-se verificado um aumento substancial no número de biópsias realizadas, para confirmar a hipótese de adenocarcinoma da próstata. Com as amostras recolhidas, os patologistas têm que fazer diagnósticos, baseados na escassa quantidade de tecido obtido, assim como a gradação e quantificação do tumor ^(11, 12, 13).

A **neoplasia intraepitelial prostática (PIN)** consiste estruturalmente em ácinos prostáticos benignos ou ductos formados por células citologicamente atípicas. A maioria dos patologistas utiliza os termos **PIN de alto grau** para definir tanto PIN2 como PIN3, e **PIN de baixo grau** para definir PIN1. Há duas razões para que PIN2 e PIN3 sejam considerados como PIN de alto grau: em 1º porque a variabilidade interobservadores é muito elevada na distinção entre PIN2 e PIN3; a outra razão é o facto de na biópsia por agulha fina, tanto PIN2 como PIN3 estarem associadas ao mesmo risco de carcinoma em biópsias subsequentes ⁽¹¹⁾.

Em próstatas com carcinoma, verifica-se um aumento no tamanho e no número de focos PIN de alto grau, quando comparadas com próstatas sem carcinoma. Vários estudos permitiram também observar um aumento de PIN de alto grau na zona periférica da próstata, que corresponde à zona onde têm origem a maioria dos adenocarcinomas da próstata. Quando é encontrado PIN de alto grau em biópsia por agulha fina, existe um risco de 30% a 50% de encontrar carcinoma em biópsias subsequentes ⁽¹¹⁾. Por isso, é conveniente vigiar estes doentes, eventualmente com repetição de biópsias.

Os tumores que parecem ser unilaterais no exame rectal são, na verdade, bilaterais em aproximadamente 70% dos casos quando examinados patologicamente. O adenocarcinoma da próstata é multifocal em mais de 85% dos casos ⁽¹¹⁾.

Apesar da próstata não possuir uma cápsula histológica, o termo *penetração capsular* é um meio conveniente de descrever um tumor que se tenha expandido para além da próstata, para tecido conjuntivo periprostático. A invasão perineural por si própria não piora o prognóstico, porque esta representa meramente a extensão do tumor ao longo de uma zona de menor resistência, e não a invasão dos vasos linfáticos ⁽¹¹⁾.

As metástases mais frequentes do carcinoma da próstata, são em gânglios linfáticos, seguidas das metástases ósseas. As metástases pulmonares do carcinoma prostático são extremamente comuns na autópsia, e quase todos os casos apresentam também envolvimento ósseo. Depois dos gânglios linfáticos, ossos e pulmão, as regiões mais frequentemente afectadas, e segundo dados de autópsia, são a bexiga, o fígado, as glândulas suprenais e os testículos ⁽¹¹⁾.

1.5. Sistema de Gleason

O carcinoma da próstata apresenta frequentemente padrões morfológicos que variam consoante as áreas. O **sistema de Gleason**, de entre os vários propostos para a gradação, é o que se tem revelado mais adequado. Baseia-se no padrão histológico do tumor e reconhece dois padrões básicos: o padrão **primário** (o predominante) e o padrão **secundário** (o segundo mais prevalente). Ambos os padrões histológicos primário e secundário são identificados e é-lhes atribuído um valor de 1 a 5 (graus simples), sendo 1 o mais diferenciado e 5 o menos diferenciado. A gradação final é dada pela soma dos dois padrões, usando-se os termos de “**soma de Gleason**”, “**grau combinado de Gleason**” ou “**pontuação de Gleason**” ^(11, 14). No entanto, os patologistas podem atribuir apenas um padrão de Gleason (grau simples), em vez de uma soma de Gleason, nos casos em que o adenocarcinoma é pouco representativo no tecido obtido por biópsia ⁽¹¹⁾. De qualquer modo, é necessário que o patologista seja claro sobre que tipo de grau está a indicar: grau simples ou soma de Gleason.

Demonstrou-se que pacientes com soma de Gleason inferior a 8, em amostras de biópsias prostáticas, apresentam um intervalo de tempo relativamente longo antes do aparecimento de metástases. Os tumores com soma de Gleason igual a 7 apresentam um prognóstico significativamente pior do que os tumores com soma de Gleason igual a 5 ou 6, apesar de não serem tão agressivos quanto os tumores com soma de Gleason de 8 a 10. É também importante identificar tumores com padrão simples de Gleason de 4,

porque tumores com este padrão apresentam um prognóstico significativamente pior do que aqueles que apresentam unicamente padrão simples de Gleason de 3 ⁽¹¹⁾.

Na quantificação de um tumor a partir de material de biópsia, um erro de quantificação ‘por defeito’ é mais problemático do que um erro de quantificação ‘excessiva’, o que muitas vezes é inevitável, devido aos erros da amostragem ⁽¹¹⁾. No entanto, técnicas de avaliação da morfologia nuclear utilizando um sistema de análise de imagem computadorizada, ajudam a aperfeiçoar o prognóstico obtido pelo sistema de Gleason, mas este equipamento não está frequentemente disponível para ser utilizado nos laboratórios de anatomia patológica ⁽¹¹⁾.

1.6. Subtipos de Carcinoma da Próstata

Reconhecem-se vários subtipos de carcinoma da próstata que, por si próprios, têm significado prognóstico (**Tabela I-1**). Destacam-se nomeadamente o adenocarcinoma mucinoso da glândula prostática, que é uma das variantes morfológicas de cancro da próstata menos comuns. Os carcinomas das células pequenas da próstata são idênticos aos carcinomas das células pequenas do pulmão. Em aproximadamente 50% dos casos, os tumores da próstata são uma mistura de carcinoma das células pequenas e de adenocarcinoma da próstata. O carcinoma escamoso primário da próstata é raro e está associado a uma baixa taxa de sobrevivência ^(11, 15).

Tabela I-1. Subtipos (variantes) de carcinoma da próstata.

Adenocarcinoma e Tumores associados	Padrão Primário de Gleason
Carcinoma dos ductos	3 (sem necrose); 5 (com necrose)
Carcinoma mucinoso	4
Carcinoma das células tipo sinete	5
Carcinoma sarcomatóide	5
Adenocarcinoma com células neuroendócrinas	variável
Carcinoma neuroendócrino (carcinoma das células pequenas)	5
Carcinoma escamoso e adenoescamoso	variável; normalmente de grau elevado
Adenocarcinoma com estruturas oncócicas	variável
Carcinoma tipo linfopitelioma	5

Adaptado de: (15)

1.7. Diagnóstico e Estadiamento

1.7.1. Meios de Diagnóstico

A American Cancer Society (ACS) e a American Urological Association (AUA) recomendam o uso por rotina do exame de toque rectal e uma análise sanguínea anual para averiguar os níveis de PSA (antigénio específico da próstata) em homens assintomáticos com idades superiores a 50 anos, começando aos 40 para os homens em alto risco, como os negros e indivíduos com antecedentes familiares de carcinoma da próstata (com um início de doença mais precoce, em média de 7 anos) ^(16,17).

Na maioria dos casos, o diagnóstico histológico do cancro da próstata é realizado através de **biópsia prostática transrectal (BPT)**. É raro o doente com cancro da próstata apresentar sintomas, a não ser quando este já se encontra num estado muito avançado, porque a maioria dos adenocarcinomas surgem na periferia da glândula, distantes da uretra. Assim, a suspeita de cancro da próstata, que resultará numa recomendação para a realização de uma biópsia prostática transrectal é, na maioria das vezes, levantada por anomalias encontradas no **exame de toque rectal (ETR)** e/ou em elevações do nível do **antigénio específico da próstata (PSA)** no soro dos doentes ^(10,16).

A impotência sexual pode ser uma manifestação de um tumor na próstata, que alastrou para lá da cápsula prostática e envolveu as ramificações do plexus pélvico. As metástases que envolvem o esqueleto axial ou apendicular podem causar dores ósseas ou anemia. Pode ainda surgir edema das extremidades inferiores. Alterações no *screening* do cancro da próstata reduziram o número de doentes detectados através dos sintomas, sugestivos de doença avançada ⁽¹⁶⁾.

Estes três métodos (BPT, ETR, quantificação do PSA) são utilizados na detecção precoce do cancro da próstata. O ETR e a quantificação sérica do PSA são os testes primários mais úteis para avaliar o risco de cancro da próstata num indivíduo ^(10, 16, 17).

1.7.1.1. O Exame de Toque Rectal (ETR)

Devido ao risco significativo de cancro da próstata, a biópsia prostática é recomendada a todos os homens que apresentem anomalias no exame de toque rectal

(ETR), independentemente do nível do PSA. Isto porque 25% dos homens com cancro da próstata apresentam níveis de PSA inferiores a 4.0 ng/ml, ou seja níveis normais de PSA no soro ⁽¹⁶⁾.

A palpação prostática por toque rectal pode identificar alterações em 7% a 15% dos homens com mais de 50 anos ⁽¹⁷⁾. O valor predictivo positivo de um exame rectal anormal é de aproximadamente 15% a 30% ⁽¹⁷⁾. No entanto, o ETR é um teste pouco preciso, pois mesmo nos casos de médicos experimentados, este não detecta um número substancial de tumores e a maioria dos tumores detectados encontram-se já num estadió patológico avançado, quando o tratamento já não é eficaz ^(16, 17).

1.7.1.2. O Antígeno Específico da Próstata (PSA)

A grande parte dos carcinomas da próstata são actualmente diagnosticados por quantificação do antígeno específico da próstata (PSA) no soro dos doentes.

O antígeno específico da próstata é uma protease sérica (codificada por um gene localizado no cromossoma 19) segregada pela próstata normal e glândulas periuretrais. É secretada em elevada concentração (mg/ml) para o líquido seminal e é encontrada em baixa concentração (ng/ml) no soro ^(16, 17). Nos homens sem carcinoma da próstata, a concentração do PSA sérico é proporcional ao volume da próstata. O antígeno pode aumentar devido a diversas situações benignas, incluindo prostatite aguda, hiperplasia benigna da próstata (HBP), biópsia ou intervenção cirúrgica prostática recente e retenção urinária ^(17, 18).

A determinação do PSA como teste de rastreio no carcinoma da próstata baseia-se na maior quantidade de PSA libertada pelas células neoplásicas, relativamente à libertada pelo epitélio da próstata normal ^(17, 18). Os carcinomas prostáticos contribuem cerca de 30 vezes mais para uma concentração de PSA sérico do que um volume equivalente de uma próstata normal e cerca de 10 vezes mais do que uma HBP. A expressão do PSA diminui com a indiferenciação do carcinoma, havendo alguns carcinomas da próstata pouco diferenciados que não expressam qualquer PSA, mas estes representam menos de 5% do total destes cancros ⁽¹⁷⁾.

Embora a maioria dos carcinomas da próstata, diagnosticados pela verificação do PSA, estejam confinados ao órgão, cerca de um terço tem uma ou mais características

associadas a um risco de progressão, incluindo grau histológico pouco diferenciado, grande volume ou extensão extracapsular^(10, 17).

O limite superior de um PSA normal foi inicialmente definido como 4,0 ng/ml^(16,18). Cerca de 15% dos homens com mais de 50 anos têm níveis mais altos e a incidência de níveis elevados aumenta com a idade^(17, 19, 20) (**Tabela I-2**).

Tabela I-2. Valores de referência de PSA (ng/ml), segundo a idade e a etnia.

Idade (anos)	Valores de referência de PSA (ng/ml)		
	Negros	Caucasianos	Japoneses
40-49	0,0 – 2,0	0,0 – 2,5	0,0 – 2,0
50-59	0,0 – 4,0	0,0 – 3,5	0,0 – 3,0
60-69	0,0 – 4,5	0,0 – 4,5	0,0 – 4,0
70-79	0,0 – 5,5	0,0 – 6,5	0,0 – 5,0

Adaptado de: (20)

Avanços recentes na interpretação do PSA podem melhorar a eficácia do exame no carcinoma da próstata. Estes avanços implicam ter em conta os seguintes factores:

Âmbitos de referência do PSA específicos da idade. O volume da próstata e o nível de PSA no soro aumentam com a idade^(17, 18).

Densidade do PSA. Define-se como a razão entre o PSA e o volume prostático. Porque os carcinomas da próstata provocam mais PSA por unidade de volume do que o tecido normal ou uma HBP, as densidades elevadas do PSA (superiores a 0,15) podem indicar com maior probabilidade um carcinoma da próstata^(17, 18).

Velocidade do PSA. Refere-se à taxa de alteração do PSA, com o tempo. Aumentos superiores a 0,8 ng/ml por ano são anormais e podem condicionar uma biópsia à próstata, mesmo em homens com um PSA normal para a idade^(17, 18).

Percentagem PSA livre. Um método que permite aumentar a especificidade do PSA é o uso da percentagem de PSA livre^(17, 18). O antígeno específico da próstata existe no soro (PSA sérico total), tanto sob a forma de PSA livre, como sob a forma de PSA

ligado à α_1 -antiquimotripsina ou à α_2 -macroglobulina (ambas proteínas plasmáticas) ^(20, 21). O valor médio de PSA livre varia aproximadamente entre 0 e 3,0 ng/ml, dependendo do estado da doença ⁽²¹⁾. A percentagem de PSA livre refere-se à razão entre a forma de PSA livre e o PSA sérico total. Por razões ainda desconhecidas, sabe-se que os doentes com carcinoma da próstata tendem a apresentar baixas percentagens de PSA livre, enquanto aqueles com um prognóstico benigno apresentam valores mais elevados de percentagem de PSA livre ^(21, 22, 23).

O uso da razão PSA livre/PSA total ajudará a reduzir o número de biópsias realizadas em homens que apresentem níveis séricos de PSA entre 4,0 e 10,0 ng/ml ^(22, 23, 24). O valor mínimo de percentagem de PSA livre, abaixo do qual será recomendável a realização de biópsia prostática, é ainda desconhecido. No entanto, vários autores recomendam o uso de valores entre os 14% e os 28% ^(23, 24, 25).

1.7.2. Estadiamento

Os objectivos do estadiamento do cancro da próstata são: 1) determinar o prognóstico e 2) desenvolver uma terapia dirigida racionalmente, baseada na extensão da doença. Por exemplo, um homem com um tumor palpável envolvendo um lobo da próstata (fase clínica T2a), grau de Gleason 4, e um PSA inferior a 20 ng/ml, pode-se considerar um bom candidato para cirurgia, baseado na alta probabilidade de doença confinada ao órgão ^(16, 17).

O toque rectal por rotina e a determinação do PSA têm aumentado o diagnóstico precoce de carcinoma da próstata. No entanto, quase 50% dos homens sem evidência clínica de doença extracapsular têm-na na avaliação patológica final ⁽¹⁷⁾. Porque o carcinoma prostático extracapsular está associado com taxas mais altas de recorrência, o estadiamento é importante na avaliação do tratamento a longo prazo ^(16, 17). A classificação da American Joint Committee on Cancer (AJCC) relativa ao carcinoma da próstata vem resumida na **Tabela I-3**.

Tabela I-3. Estadiamento do cancro da próstata segundo a AJCC.

T	Tumor Primário
Tx	Tumor primário que não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
T1	Tumor clinicamente não detectável por palpação ou imagem
T1a	Descoberta acidental envolvendo menos de 5% do tecido ressecado
T1b	Descoberta acidental envolvendo mais de 5% do tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia, baseada em elevação do PSA
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor abrangendo um lobo
T2b	Tumor abrangendo ambos os lobos
T3	Tumor disseminado através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
T3b	Tumor abrangendo a vesícula seminal
T4	Tumor fixado ou invadindo estruturas adjacentes (que não as vesículas seminais)

Adaptado de: (26)

2. O Sistema HLA e o Cancro da Próstata

2.1. O Sistema HLA

O **Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC)**, designado por **Sistema HLA** ("Human Leucocyte Antigen") no Homem, está implicado nos mecanismos de reconhecimento do 'self' (ou seja, reconhece como próprios os elementos que fazem parte integrante do seu organismo), despoletando os mecanismos activadores do nosso sistema imunitário contra agentes estranhos, isto é, não próprios (por exemplo, erradicação de infecções virais) e células alteradas (células tumorais). O sistema HLA é um conjunto de genes localizados no braço curto do cromossoma 6 (numa região que abrange cerca de 3500 Kb) distribuídos por três classes: genes da classe I (HLA-A, -B, -C), da classe II (HLA-DP, -DQ, -DR) (Fig. I-1) e da classe III (que codifica para componentes do sistema do complemento como: C2, C4B, C4A, Factor B) ^(27, 28, 29).

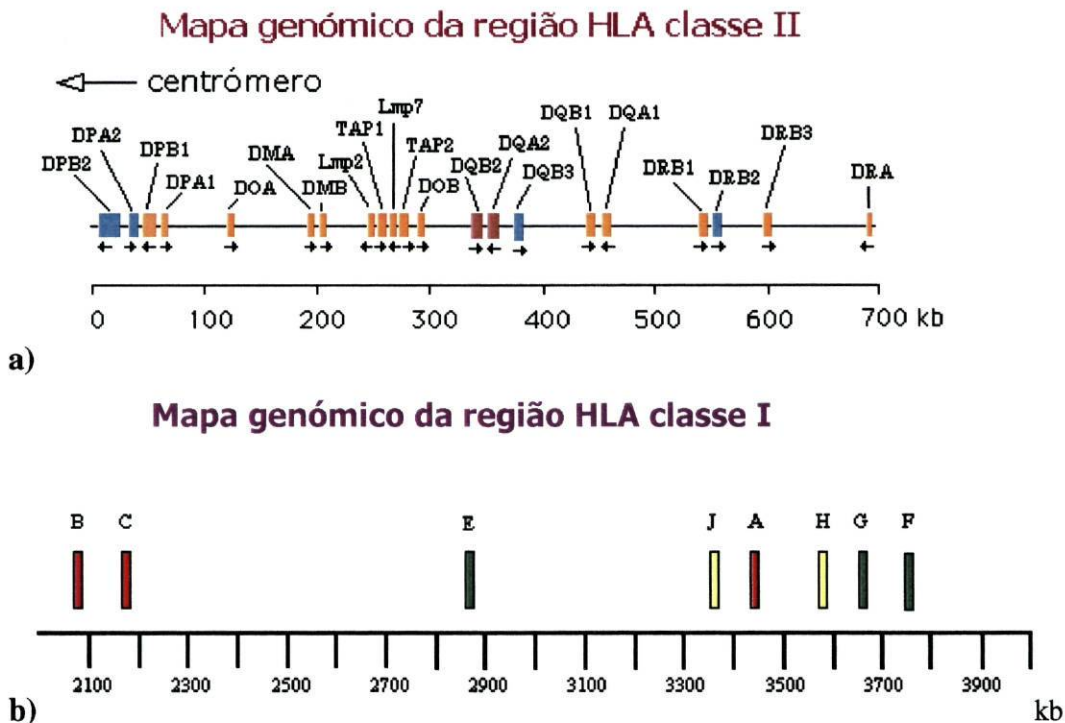


Figura I-1. a) Genes da região HLA classe II; b) Genes da região HLA classe I.
Adaptado de: (30).

As moléculas **HLA classe I** (HLA-A, -B, -C) são glicoproteínas transmembranares altamente polimórficas, compostas por duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia pesada (cadeia α) de 44 KD e uma cadeia leve, não glicosilada, a β 2-microglobulina (β 2m), que é um polipeptídeo não polimórfico de 12 KD. A cadeia pesada (α) é codificada por um gene localizado no braço curto do cromossoma 6 e a cadeia leve (β 2m) é codificada por um gene localizado no braço curto do cromossoma 15. A cadeia pesada possui três domínios: α_1 , α_2 e α_3 ^(27,31) (Figs. I-2 e I-3.a)). As proteínas codificadas por estes genes são constitutivamente expressas na maioria das células nucleadas do organismo humano, enquanto que as moléculas da classe II apresentam uma expressão mais restrita (células dendríticas, células endoteliais, linfócitos B, macrófagos)⁽²⁷⁾. Ainda dentro da classe I existem genes HLA não clássicos, como HLA-D, HLA-E, HLA-F e HLA-G. Para além destes, existem ainda os pseudogenes HLA-H, -J, -K e -L que por não serem expressos, não são funcionais⁽³¹⁾.

As moléculas **HLA classe II** são compostas por duas cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente: a cadeia α (32 a 34 KD) e a cadeia β (29 a 32 KD), ligeiramente mais pequena. A cadeia α possui os domínios α_1 e α_2 ; a cadeia β possui os domínios β_1 e β_2 ⁽³¹⁾ (Figs. I-2 e I-3.b)). A cadeia α e a cadeia β são codificadas por genes diferentes pertencentes ao sistema HLA, e ambas são polimórficas^(27, 31). O mais polimórfico dos genes HLA classe II é o HLA-DRB1, para o qual são conhecidos 293 alelos⁽³²⁾.

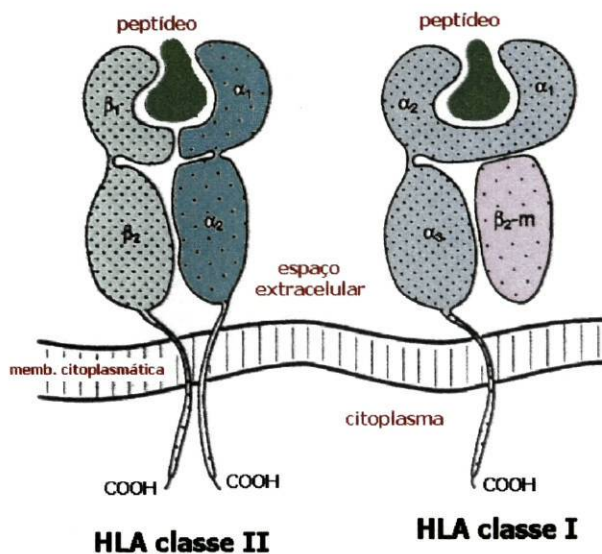


Figura I-2. Representação esquemática da estrutura das moléculas HLA classe I e classe II, mostrando os vários domínios.
Adaptado de: (31).

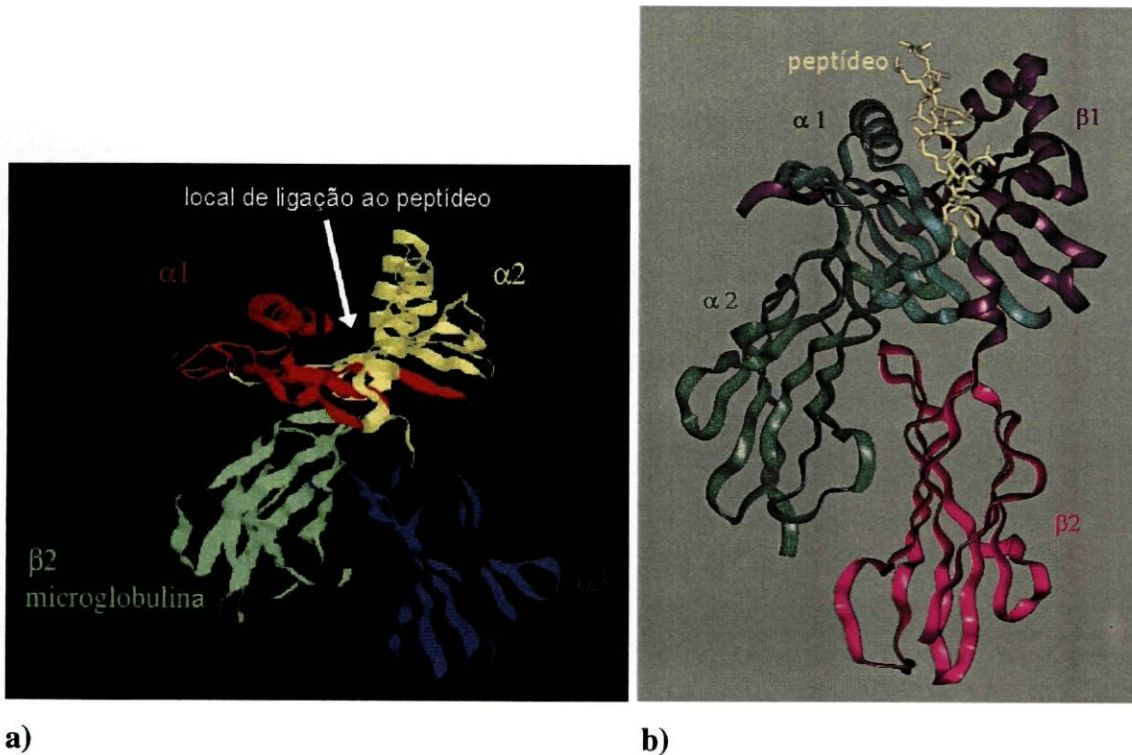


Figura I-3. Estrutura tridimensional das moléculas HLA classe I **a)** e HLA classe II **b)**, mostrando também os domínios e o local de ligação do peptídeo. Adaptado de: (33).

Está bem definido que o reconhecimento de células tumorais por parte dos linfócitos T CD8⁺ requer a presença à superfície da célula de antígenos HLA classe I e de peptídeos derivados do tumor. De facto, os linfócitos T citotóxicos (CTL) e linfócitos T ‘helper’ (Th) têm a capacidade de reconhecer peptídeos, provenientes de antígenos processados, apresentados por moléculas HLA classe I ou classe II, respectivamente (Fig. I-4). A presença de moléculas HLA classe II à superfície das células é necessária para que ocorra a activação dos linfócitos Th (T CD4⁺) que, através da produção de moléculas moduladoras -as citoquinas (IFN, TNF, IL-4)-, são responsáveis pela estimulação e activação das restantes células intervenientes na resposta imune, incluindo os linfócitos T citotóxicos ^(34, 35, 36, 37). A maioria dos antígenos reconhecidos pelos linfócitos T CD8⁺ são proteínas processadas no interior da célula, tais como proteínas virais e produtos resultantes da expressão de oncogenes, degradadas por proteinases (nos proteossomas) em peptídeos que são posteriormente transportados - pelo heterodímero TAP (“Transporter Antigen Protein”) - para o retículo endoplasmático, onde se ligam a estruturas dos domínios $\alpha_1\alpha_2$ da cadeia pesada da molécula HLA classe I. Esta estrutura peptídeo/molécula HLA classe I atravessa o

complexo de Golgi e finalmente exprime-se à superfície da célula (27, 28, 29, 38, 39, 40, 41, 42) (Fig.I-5).

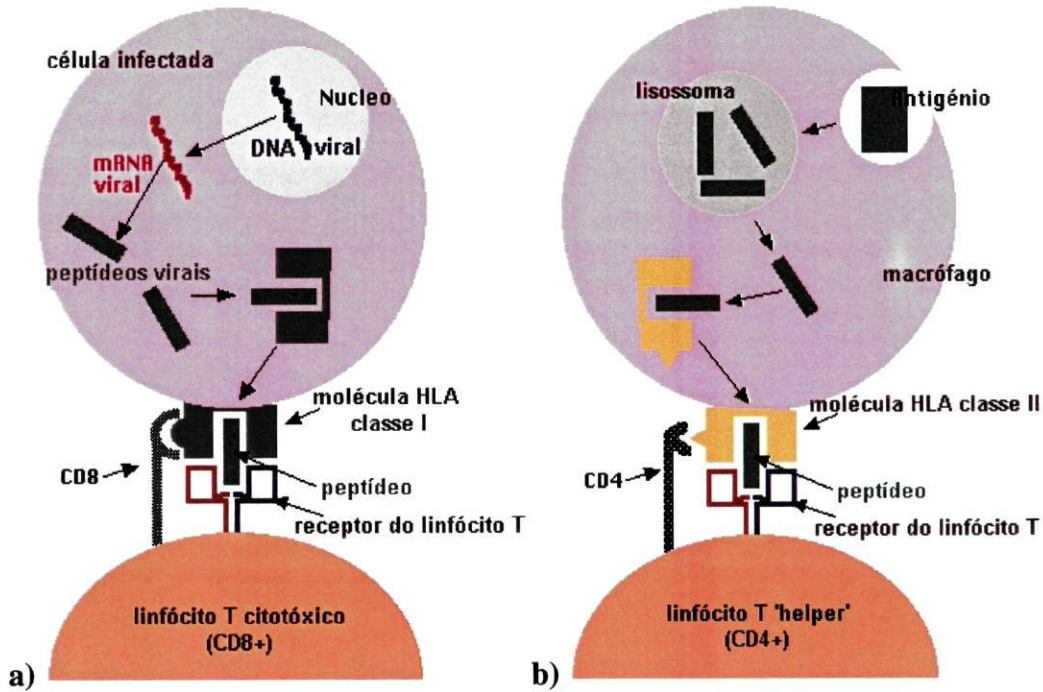


Figura I-4. Representação esquemática da apresentação de peptídeos pelas moléculas HLA classe I a) e HLA classe II b), aos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente. No esquema a) é representada uma situação de infecção viral. Adaptado de: (43).

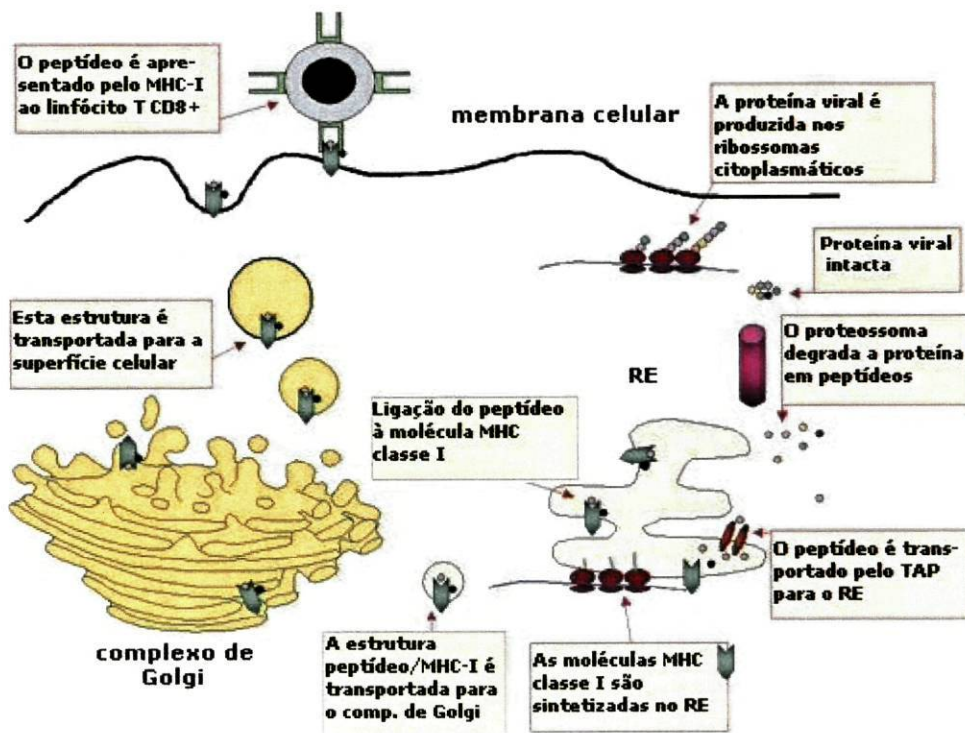


Figura I-5. Esquema representativo do processamento e apresentação do complexo peptídeo/molécula HLA classe I à superfície da célula, numa situação de infecção viral. Adaptado de: (44).

2.2. A expressão dos antígenos HLA nos tumores

O envolvimento do sistema HLA no desenvolvimento do cancro ainda é mal conhecido. As células tumorais expressam uma série de genes que as células normais não exprimem, e os peptídeos resultantes dos produtos desses genes ligam-se a moléculas HLA. As respostas dos linfócitos T estimuladas por estes complexos peptídeo/molécula HLA, não são suficientemente eficazes para eliminar as células tumorais, e o desafio na investigação de tumores é exactamente o de compreender qual o mecanismo utilizado por estas células tumorais, de forma a desenvolver estratégias que ajudem a estimular especificamente a resposta antitumoral ^(45, 46, 47, 48).

É sabido ser a célula neoplásica uma célula cuja expressão génica diverge da expressão da célula normal, dada a própria labilidade génica, base evolutiva e adaptativa da vida. Toda a fuga da célula à obrigatoriedade de diferenciação a que se encontra sujeita nos organismos ditos normais, resulta pois de variações génicas e suas 'nuances', que se podem traduzir na própria variabilidade da expressão dos antígenos HLA.

Sabe-se, desde meados dos anos 70, que ocorrem alterações nas moléculas MHC classe I em tumores do rato e do homem. No entanto, só em meados dos anos 80 é que os investigadores constataram que estes fenótipos alterados poderiam representar um importante mecanismo de escape dos tumores à resposta imune desenvolvida pelos linfócitos T citotóxicos ⁽⁴⁹⁾.

É geralmente aceite que, na maioria dos casos, a expressão das moléculas HLA classe I à superfície das células tumorais, se encontra diminuída ou até mesmo ausente ^(49, 50). Estas alterações fenotípicas foram descritas, ainda antes de se conhecer a função das moléculas MHC na apresentação de antígenos. Pensava-se então que as variantes de células tumorais (isto é, com uma diminuição ou ausência total de expressão de antígenos HLA à superfície) eram resistentes à acção dos linfócitos T CD8⁺. Desta forma, estas células eram seleccionadas, de modo a poderem ser produzidas ⁽⁵⁰⁾. Esta diminuição ou perda total de expressão dos antígenos HLA surge quando o tumor deixa de estar localizado (tumor *'in situ'*) e ultrapassa a membrana basal, invadindo os tecidos circundantes (tornando-se invasivo). Actualmente, estas alterações fenotípicas, no que diz respeito aos antígenos HLA classe I, constituem um dos mecanismos de escape das células tumorais à resposta imune específica (T CD8⁺) em muitos tumores ^(49, 50, 51, 52, 53, 54).

A primeira descrição da associação entre cancro da próstata e a alteração da expressão dos antigénios HLA da classe I foi realizada por Natali *et al.*, que observou uma diminuição da expressão em três de seis casos estudados ⁽⁵⁵⁾. Resultados similares, foram obtidos por Blades *et al.* com a perda completa da expressão em 34% dos casos, uma diminuição da expressão em 85% dos casos e em 100% das metástases ⁽⁵⁶⁾.

As células NK (“Natural Killer”) são células do nosso sistema imunitário que intervêm na resposta imune primária ou inata. No entanto, a ausência de moléculas HLA à superfície das células tumorais pode levar à activação das células NK que, nestas situações, actuam como um sistema de defesa alternativo quando os linfócitos T citotóxicos falham ⁽⁴⁵⁾.

O nível de expressão dos antigénios HLA classe I também pode influenciar a apresentação e imunogenicidade dos epítomos CTL e a modulação da resposta das células NK. Por isso, fenótipos de tumores nos quais não se verifique um aumento da expressão dos antigénios HLA, em resposta às citoquinas, podem condicionar o êxito do tratamento com imunomoduladores ⁽⁴⁹⁾.

A produção e apresentação de moléculas HLA classe I funcionais à superfície das células envolve uma série de etapas, que podem ser moduladas por vários mecanismos e levar a alterações no nível de expressão destas moléculas à superfície das células ^(38, 40, 41, 42, 57, 58, 59).

2.2.1. Mecanismos susceptíveis de levarem a alterações no nível de expressão dos antigénios HLA

O conhecimento do mecanismo exacto, através do qual as células tumorais conseguem escapar ao sistema imune é fundamental, porque pode constituir um factor-chave na escolha de uma estratégia particular de vacinação ou de uma abordagem terapêutica ^(58, 59, 60, 61).

2.2.1.1. Mecanismos genéticos relacionados com as moléculas HLA

Sabe-se que a existência de mutações e/ou deleções em regiões codificantes dos genes estruturais da cadeia pesada e da $\beta 2m$, conduzem a alterações na expressão das

moléculas HLA classe I. É mais frequente a ocorrência de mutações nos genes estruturais da $\beta 2m$, em comparação com as ocorridas nos genes da cadeia pesada, daí que uma diminuição na expressão dos antígenos HLA esteja frequentemente associada a uma diminuição e ausência total de expressão da $\beta 2m$ ^(53, 58, 61). É o que sucede, segundo Ferrone S., nos melanomas, em que mutações nos genes da $\beta 2m$ conduzem a uma perda total da expressão destas moléculas ⁽⁵⁰⁾.

Vários estudos mostraram que, aparentemente, não existem mutações nos genes HLA-A, -B, ou -C, mas que a regulação dos genes da cadeia pesada e da $\beta 2m$ está frequentemente alterada ⁽⁵³⁾. Num estudo recente de Lu *et al.* (2000), no qual se tentou relacionar a quantificação dos alelos HLA-A e a expressão das respectivas proteínas à superfície da célula, efectuado em cancro da próstata, verificou-se que para os alelos HLA-A mais frequentes na população estudada, a deleção homozigótica é um fenómeno raro e é muito improvável que represente a causa de uma perda parcial ou completa da expressão dos antígenos HLA-A em células tumorais ⁽⁶²⁾.

2.2.1.2. Mecanismos inerentes à acção de vírus

Todos os mecanismos de defesa imune representam uma barreira para os agentes patogénicos. Alguns vírus utilizam estratégias específicas para interferir com a expressão das moléculas MHC classe I, dada a sua função de apresentação de péptidos. Uma tática de evasão eficaz, simultaneamente contra as células T e NK, seria bloquear selectivamente a apresentação de péptidos pelas moléculas HLA classe I e, ao mesmo tempo, permitir que as moléculas HLA-E (HLA não clássico) transportassem as 'sequências-sinal' até à superfície celular ⁽⁶³⁾.

Os vírus oncogénicos e não oncogénicos codificam para proteínas, com capacidade de interferirem com o processamento das moléculas classe I e produzirem variantes HLA com deficiências ⁽⁵⁰⁾. A regulação viral da expressão dos antígenos MHC na célula do hospedeiro é um fenómeno comum, encontrado numa série de diferentes grupos virais, incluindo vírus de DNA e RNA ⁽⁶⁴⁾.

Apesar dos mecanismos envolvidos serem frequentemente desconhecidos, há algumas similitudes entre eles. Por exemplo, o adenovírus 12 e o vírus da hepatite B afectam os factores de transcrição dos genes MHC; o vírus Ad2 e o cytomegalovírus do

Homem produzem proteínas virais que bloqueiam o transporte dos antígenos MHC para a superfície da célula; há oncogenes virais que podem afectar a transcrição dos genes MHC (como sucede com alguns retrovírus), da mesma forma que o fazem os oncogenes celulares ⁽⁶⁴⁾.

É, no entanto, interessante constatar que alguns vírus actuam sobre as células que infectam, ajudando a aumentar a expressão dos antígenos MHC, independentemente da acção de interferão, despoletando uma resposta autoimune inapropriada. A transformação celular, despoletada por oncogenes virais que levam a uma diminuição da expressão dos antígenos HLA classe I ou classe II à superfície da célula, resulta na produção de células tumorais que escapam ao sistema imunológico do hospedeiro ⁽⁶⁴⁾.

Certos vírus podem também modular a expressão das moléculas HLA e modificar a resposta dos linfócitos T CD8⁺, independentemente da produção endógena de interferão-gamma (INF- γ) ⁽⁵³⁾. O vírus da hepatite B é capaz de inibir a produção de interferão-alfa (INF- α) e a resposta das células infectadas à acção do IFN, o que pode explicar o facto de alguns doentes não responderem à terapia baseada no IFN ⁽⁶⁴⁾.

Outro vírus de DNA que afecta a expressão dos antígenos HLA classe I é o adenovírus 12 (Ad12). Neste caso, o vírus conduz a uma diminuição da expressão destas moléculas, constitutiva ou induzida por IFN, e o efeito do gene Ad12 é, novamente, ao nível da transcrição génica ⁽⁶⁴⁾.

O cytomegalovírus do Homem (CMV) codifica para uma proteína, o produto do gene H301, que se liga à β 2m. O H301 facilita a infecção de células-alvo por parte do CMV, mas também bloqueia o transporte da β 2m, e logo, das moléculas HLA classe I para a superfície celular. Simultaneamente, a diminuição da expressão destas moléculas induzida pelo CMV, é também um sinal para um aumento do reconhecimento e lise das células infectadas por parte das células NK ⁽⁶⁴⁾.

2.2.1.3. Mecanismos associados à expressão de oncogenes

A inactivação de genes supressores de génese tumoral ou a activação de oncogenes parecem ser um fenómeno importante na transformação maligna de células cancerígenas. A alteração da expressão das moléculas HLA classe I tem sido associada a um aumento de expressão de vários protooncogenes. Não há, no entanto, qualquer

evidência de que a activação de oncogenes afecte directamente a expressão dos antígenos HLA classe I⁽⁵³⁾.

2.2.1.4. Mecanismos que afectam o transporte e processamento das moléculas HLA

As situações mais graves de deficiência de moléculas HLA são, na realidade, causadas por defeitos, não nos genes da classe I ou da classe II, mas noutros genes que influenciam a expressão das moléculas HLA à superfície das células^(28, 37, 38, 42, 53, 58, 60).

A expressão das moléculas HLA classe I requer a sua associação a peptídeos derivados de proteínas processadas endogenamente. Estes peptídeos permitem a estabilidade estrutural das moléculas HLA classe I, no interior do retículo endoplasmático. Durante a evolução de um tumor, podem ocorrer alterações no processamento destes peptídeos, o que poderá aumentar a probabilidade de evasão das células tumorais aos mecanismos imunológicos. A alteração ou ausência de uma das 2 subunidades que compõem o heterodímero proteico transportador associado à apresentação do antígeno (codificadas pelos genes TAP-1 e TAP-2) pode conduzir a uma perda de expressão dos antígenos HLA classe I. Em várias linhas celulares de tumores que apresentam perda de expressão de HLA classe I, verificou-se uma diminuição na expressão dos genes TAP, o que conduzirá a uma falha na formação dos complexos peptídeo-HLA e na subsequente apresentação dos peptídeos antigénicos aos linfócitos T CD8⁺^(38, 40, 42, 53, 58, 59, 65, 66). As moléculas HLA desprovidas do peptídeo antigénico tornam-se instáveis e não são eficientemente transportadas através do aparelho de Golgi, o que faz diminuir os seus números à superfície da célula para 1% a 3% do seu nível normal⁽⁴⁵⁾. A alteração ou ausência das duas subunidades que constituem o proteossoma (codificadas pelos genes LMP2 e LMP7), responsável pelo processamento adequado das proteínas virais ou produtos de oncogenes, também poderá afectar a expressão das moléculas HLA classe I^(38, 53, 59, 65, 66).

2.2.2. Fenótipos HLA alterados

A alteração de fenótipos HLA, traduzida na diminuição ou perda total de expressão destes antígenos à superfície das células, parece ser um fenómeno frequente. Nos últimos anos, com a utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) anti-HLA - que permitem identificar epítomos específicos de *locus* ou de alelos - tem sido possível observar uma proporção cada vez maior de tumores, nos quais se verifica esta alteração. As perdas totais ou parciais de antígenos HLA classe I podem ser avaliadas por imunohistoquímica, através da utilização de mAbs anti-HLA monomórficos, anti-HLA-A, -B ou -C locus-específicos e alelo-específicos. Segundo Garrido *et al.* ⁽⁵³⁾, 40% a 90% dos tumores - originados de tecidos com expressão normal de antígenos HLA - apresentam diminuição do nível de expressão. Este valor é provavelmente uma subestimativa, devido ao limitado painel de mAbs, passíveis de serem aplicados em secções de tecidos a estudar e que permitem identificar alelos HLA ^(49, 51, 53).

Actualmente, com base na expressão dos antígenos HLA classe I, foi possível definir 5 fenótipos diferentes, que facilitam a identificação e análise dos fenótipos HLA frequentemente encontrados em tecidos tumorais ^(49, 51). Estes fenótipos são:

Fenótipo I (perda total de HLA) - as células tumorais exibem frequentemente uma perda completa de expressão dos antígenos HLA (9-52%) ⁽⁴⁹⁾. Este facto pode resultar de interferências: na síntese de $\beta 2m$, no funcionamento das moléculas TAP ou de defeitos estruturais nos genes HLA. Alterações no gene da $\beta 2m$ estão associadas a este fenótipo em melanomas, tumores colórectais e linfomas. Comparações entre mutações do gene da $\beta 2m$ em diferentes linhas celulares de tumores sugerem uma mutação 'hot spot' no exão 1 ⁽⁴⁹⁾.

A combinação de uma mutação no gene da $\beta 2m$ num alelo e a perda de heterozigotia (LOH) no outro, pode ser um mecanismo importante, mas segundo um estudo recente de Jimenez *et al.* ⁽⁶⁷⁾, as mutações somáticas no gene da $\beta 2m$ não são o principal mecanismo que conduz ao aparecimento deste fenótipo ^(49, 67).

Mutações nas moléculas TAP podem conduzir ao aparecimento deste fenótipo, e estão frequentemente associadas com a ausência de reactividade dos anticorpos específicos das proteínas TAP em células tumorais com ausência de expressão dos

antigénios HLA. Tumores com defeitos estruturais nos genes HLA que produzem este fenótipo, não voltam a exprimir os antigénios HLA, mesmo após o tratamento com citocinas⁽⁴⁹⁾.

A perda completa de expressão dos antigénios HLA está descrita em melanomas (15%), carcinoma das células escamosas da cabeça e pescoço (9%) e tumores colorectais (21%). Em tumores da próstata e da mama, estes valores atingem 34% e 52%, respectivamente⁽⁴⁹⁾.

Fenótipo II (perda de um haplótipo HLA) - este fenótipo tem sido observado apenas em algumas linhas celulares de tumores e pode resultar de uma não-disjunção cromossómica ou de uma recombinação mitótica^(49, 51, 61).

A amplificação de STRs (“Short Tandem Repeats”), também designados de marcadores microssatélite, através da técnica de PCR tem-se revelado um meio fácil e eficaz de diagnosticar este fenótipo HLA^(61, 67, 68). Tem sido ainda descrito a perda de heterozigotia (LOH) em *loci* do cromossoma 6, através da deleção total de um cromossoma 6 ou de uma grande região genómica^(61, 67). A LOH associada com a perda de um haplótipo HLA foi encontrada em 17,6 % dos tumores da laringe e em 49% dos carcinomas das células escamosas da cabeça e pescoço⁽⁶¹⁾.

Jimenez *et al.* também identificou recentemente a perda cromossómica como o mecanismo mais frequente subjacente à perda de um haplótipo HLA em tumores humanos. Além disso, este grupo propôs um protocolo para standardizar estudos de LOH, utilizando um painel de nove marcadores microssatélite (sete para o cromossoma 6 e dois para o cromossoma 15)^(49, 61, 67).

Fenótipo III (perda de um locus HLA) - a perda de expressão de um locus HLA classe I está já documentada em alguns tumores: HLA-A (3-19%) e HLA-B (5-19%)⁽⁴⁹⁾. Pode estar relacionada com os mecanismos de transcrição, já que as sequências promotoras do locus HLA classe I e os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para alguns alelos da classe I nas células tumorais, diferem dos mesmos nas células normais. No entanto, este fenótipo pode muitas vezes ser superado através de um tratamento à base de citocinas⁽⁴⁹⁾.

Fenótipo IV (perda de um alelo HLA) - o uso de um crescente número de mAbs alelo-específicos mostra que uma diminuição na expressão alélica tem sido observada

em muitos tumores (15-51%)⁽⁴⁹⁾. Esta perda alélica pode resultar de mutações pontuais, deleções parciais dos genes HLA classe I ou como consequência de quebra cromossômica ou recombinação somática. O tratamento com citocinas não consegue repor a expressão dos alelos em causa⁽⁴⁹⁾.

Fenótipo V - alguns tumores apresentam fenótipos HLA classe I mais complexos, que não encaixam em nenhuma das categorias anteriores. Tal pode dever-se a múltiplos fenómenos que levam ao aparecimento de fenótipos “mistos”, dos quais pode ser exemplificativo um tumor que conserve a expressão de um único alelo HLA classe I, resultante de mecanismos imunoselectivos que ocorrem durante o desenvolvimento do tumor⁽⁴⁹⁾.

Recentemente, foi identificada numa linhagem celular tumoral, um fenótipo HLA que é o resultado de uma expressão diminuída do locus HLA-B (fenótipo III) e da perda de um haplótipo HLA (fenótipo II)⁽⁴⁹⁾.

Foi também recentemente observado que células infectadas pelo HIV, apresentam uma expressão diminuída dos antígenos HLA-A e HLA-B, mas não dos antígenos HLA-C ou HLA-E. Em teoria, este fenótipo permite às células tumorais escapar à resposta dos linfócitos T (diminuição da expressão dos antígenos HLA-A e HLA-B), mantendo, no entanto, o sinal inibitório para as células NK (expressão do HLA-C), de modo a evitar a lise celular efectuada por estas mesmas células⁽⁶¹⁾.

2.3. Fenótipos HLA alterados associados ao escape às células T e NK

A vigilância efectuada pelos linfócitos T, que reconhecem as moléculas polimórficas HLA classe I e classe II ligadas aos peptídeos apropriados (provenientes de antígenos tumorais), tem lugar nos carcinomas primários ou ‘*in situ*’. A perda total ou parcial de expressão dos antígenos HLA classe I pode ser considerada (como já referido) um mecanismo de evasão ao controlo dos linfócitos T, conduzindo à invasão e proliferação das células tumorais⁽⁵¹⁾.

As células NK (“Natural Killer”), que são facilmente activadas após se ligarem a uma célula-alvo, são impedidas por receptores inibitórios de destruir células saudáveis

do próprio organismo. Estes receptores inibitórios são específicos das moléculas HLA classe I⁽⁶³⁾.

Células tumorais e células infectadas por vírus que escapam à vigilância dos linfócitos T, porque interferem com a expressão dos antígenos HLA à sua superfície, tornam-se alvos da lise mediada pelas células NK activadas, quando o sinal inibitório fornecido pelas moléculas HLA classe I desaparece ou é drasticamente reduzido. Além disso, a expressão de moléculas HLA 'aberrantes', não clássicas (HLA-G, -E, -F, ou moléculas virais homólogas), podem inibir a lise por parte das células NK, apresentando o sinal inibitório às células NK⁽⁵⁰⁾.

Um tipo de receptor inibitório usado pelas células NK no Homem é um heterodímero constituído pelos polipéptidos CD94 e NKG2. O receptor **CD94/NKG2** parece reagir com produtos de diferentes alelos dos loci HLA-A, -B e -C da classe I, assim como com a molécula invariante e não clássica HLA-G. Este receptor parece ser específico para a molécula não clássica HLA-E⁽⁶³⁾.

Além do receptor CD94/NKG2, as células NK também expressam um tipo de receptor inibitório muito diferente, designado por **KIR** ("Killer Inhibitory Receptor"). As células NK que utilizam os receptores KIR como inibidores, conseguem detectar a perda do produto específico de um gene MHC classe I, como sucede em muitos tumores. Por isso, este tipo de receptor tem a capacidade de reconhecer células tumorais que, por não apresentarem expressão dos antígenos HLA classe I, escapam à lise das células T CD8⁺. No entanto, apesar da vigilância efectuada pelas células NK, as células tumorais conseguem proliferar, propagar-se e metastizar. Sendo assim, provavelmente, deverá ocorrer selecção adicional de alelos HLA específicos durante a história natural de um carcinoma, que lhe conferirá resistência ao ataque pelas células NK^(50, 52, 69, 70). Assim, a grande variabilidade verificada nos genes HLA classe I existente entre diferentes pessoas, sugere a necessidade de um repertório diverso de receptores que inibam a acção das células NK⁽⁶³⁾.

As células NK devem possuir, pelo menos, um receptor inibitório que interactue com um alelo HLA classe I, ou vários KIR's que interactuem com diferentes moléculas HLA. A ausência ou presença de diferentes combinações de moléculas HLA irá activar diferentes KIR's. Muitos dos péptidos que se ligam às moléculas HLA-A, -B e -C, conferem protecção contra a lise efectuada pelas células NK que expressam os KIR. Esta protecção conferida à célula-alvo pela expressão das moléculas HLA, pode ser

dependente de péptidos, mas não ser necessariamente específica de determinado péptido (50, 63, 70).

A expressão 'aberrante' de moléculas HLA classe I não clássicas em células tumorais com uma diminuição de expressão de moléculas HLA é, em teoria, um mecanismo de escape, que em primeiro lugar utiliza a estratégia de escape às células T, e em segundo lugar consegue inibir os KIR's, evitando assim o ataque das células NK (50).

A recente descrição de homólogos das moléculas HLA classe I codificados pelo cytomegalovírus (CMV), que inibem a lise pelas células NK, veio elucidar o modo como os vírus conseguem escapar à vigilância efectuada pelas células NK, e reforça a ideia do processo em duas fases, que pode ser utilizado por determinadas células tumorais (50).

Ruiz-Cabello R. e Garrido F. (50) referem-se às células T que possuem KIR's, afirmando que estas podem desempenhar um importante papel no controlo da resposta imune ou contra antígenos do próprio organismo e evitando a autoimunidade. Estas células T com KIR's podem actuar como uma terceira linha de defesa contra células infectadas/tumorais, que escaparam às células T 'comuns', através da perda parcial de expressão dos antígenos HLA, tornando-se assim capazes de reconhecer variantes de *downregulation* de moléculas HLA (50).

Ainda falta percorrer um longo caminho, até se conhecerem e compreenderem todas as implicações da actividade das células NK, incluindo o seu normal desempenho (talvez como uma resposta primária, não específica e alternativa aos agentes patogénicos), a importância do controlo negativo desempenhado por determinantes polimórficos HLA, e o papel das células NK que destroem as células que não expressam moléculas HLA-A, -B e -C à sua superfície, em tecido normal, mas sobretudo em tumores (50).

A compreensão crescente dos mecanismos, através dos quais as células-alvo aberrantes escapam ao reconhecimento e destruição por parte das células T e NK, será sem dúvida, um importante contributo para o desenvolvimento de estratégias de vacinação contra tumores (50).

3. Aplicação clínica dos conhecimentos na elaboração de uma imunoterapia dirigida

A perda total de expressão dos antígenos HLA ou de alguns dos seus alelos específicos, durante a transformação das células para o estado neoplásico, impede que os linfócitos T CD8⁺ reconheçam as células alteradas, permitindo a sua sobrevivência. Tem sido possível correlacionar, de forma significativa, a progressão do tumor, assim como o prognóstico ou agressividade da neoplasia, com a sucessiva perda de expressão dos antígenos HLA.

A incapacidade dos doentes desencadearem uma resposta imune efectiva e o facto da expressão dos antígenos HLA estar frequentemente alterada numa grande variedade de neoplasias humanas, leva-nos a propor o estudo da expressão dos antígenos HLA clássicos (classe I e classe II) em tumores da próstata. A expressão tumoral e integridade funcional dos antígenos HLA da classe I pode contribuir para o desenvolvimento de uma imunoterapia dirigida, provavelmente, com péptidos “semelhantes” aos derivados do tumor, mediada pelas células do sistema imunitário, sendo importante o uso do fenótipo HLA exibido pelo tumor na elaboração de um protocolo imunoterapêutico efectivo. Além disso, poderá representar um importante critério de selecção dos doentes, aos quais será aplicada uma imunoterapia dirigida baseada na actuação das células T ⁽⁴⁹⁾.

O conhecimento da sequenciação parcial do genoma humano tem hoje já aplicações valiosas em Medicina Legal.

Um aspecto importante será, ainda, o da previsão, prevenção, diagnóstico e tratamento de vários tipos de afecções que poderão, havendo fugas à ética e à deontologia, conduzir a problemas em que a Medicina Legal terá de se pronunciar. Um desses aspectos é o da predisposição orgânica para o desenvolvimento de neoplasias, com conhecimentos hoje já bem firmes, por exemplo para a glândula mamária, para o cólon e até para o estômago.

Propusemo-nos verificar o que se passa na célula epitelial da glândula prostática, que na sua diferenciação morfológica exprime o já conhecido antígeno específico da próstata (PSA), e que deverá manifestar modificações da sua composição membranar

para, como célula distinta que é, conseguir o seu objectivo autónómico. Assim, o estudo da variabilidade da expressão dos antígenos do sistema HLA, presentes nas células normais, nas células em modificação, em células neoplásicas iniciais e em células neoplásicas invasivas, poderá ser uma contribuição biopatológica com interesse em Medicina Legal.

II - OBJECTIVOS

- 1) Identificar, no sangue periférico, a expressão dos antígenos HLA classe II (HLA-DRB1) e avaliar se a população de doentes em estudo apresenta um fenótipo particular, quando comparada com a população controlo.

- 2) Averiguar se existem alelos de susceptibilidade ou resistência ao aparecimento e desenvolvimento do cancro da próstata.

- 3) Avaliar o nível de expressão dos antígenos HLA classe I em tumores da próstata, utilizando tecido tumoral e tecido normal adjacente. Isto é, averiguar se este tipo de tumor exhibe um fenótipo HLA alterado particular, de forma a justificar a ineficácia da resposta imunitária observada nos doentes.

III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Diagnóstico histológico e selecção da população estudada

No presente trabalho foram estudados 32 doentes, com idades compreendidas entre os 52 e os 85 anos (com uma média de idades de 66,8 anos). Todos os doentes foram submetidos a biópsia prostática transrectal no Serviço de Urologia do Hospital Geral de Santo António (H.G.S.A.), no período de Setembro de 2000 a Abril de 2001. Vinte desses doentes não apresentavam indicações de carcinoma prostático (**DN**); aos restantes 12 foi-lhes diagnosticado carcinoma da próstata (**DC**), dos quais 3 apresentavam um tumor bem diferenciado (**BD**) com Gleason de 2-4 e os restantes 9 um tumor moderadamente diferenciado (**MD**) com Gleason de 4-7. Destes 12 indivíduos, 3 fizeram uma prostatectomia radical.

Como população controlo foi utilizado um grupo de 61 indivíduos, composto por dadores de sangue saudáveis, não aparentados, de ambos os sexos e oriundos da mesma região geográfica, pertencentes a um registo do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Patologia e Imunologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (I.C.B.A.S.).

Os estudos foram efectuados em sangue periférico, tecido tumoral prostático e tecido prostático aparentemente normal adjacente à lesão. As amostras de carcinomas prostáticos foram graduadas morfológicamente, utilizando o Sistema de Gleason⁸.

3.2. Material biológico

3.2.1. Colheita das amostras

Para a identificação dos genes HLA, através de técnicas de análise molecular de DNA foi utilizado sangue periférico dos indivíduos doentes e da população controlo.

As amostras de sangue periférico foram colhidas por punção venosa, para tubos de colheita (*Vacutainer Kemergard K3 EDTA*), já preparados com um anti-coagulante - EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético). A colheita foi realizada no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Patologia e Imunologia Molecular do I.C.B.A.S e no Hospital Geral de Santo António (H.G.S.A.).

Os estudos imunohistoquímicos foram efectuados em secções de tecido obtido por biópsia prostática.

As biópsias são codirigidas para a região periférica da base, parte média da glândula e ápice, de ambos os lados da próstata (Figura III-1). Foram assim obtidas em cada doente 6 amostras, três de cada lobo prostático ^(71, 72). Os critérios para a realização da biópsia foram:

- a) toque rectal suspeito;
- b) PSA (“Prostate Specific Antigen”) total superior a 10 ng/ml;
- c) PSA total entre 4 ng/ml e 10 ng/ml e razão PSA livre/PSA total inferior a 17%.

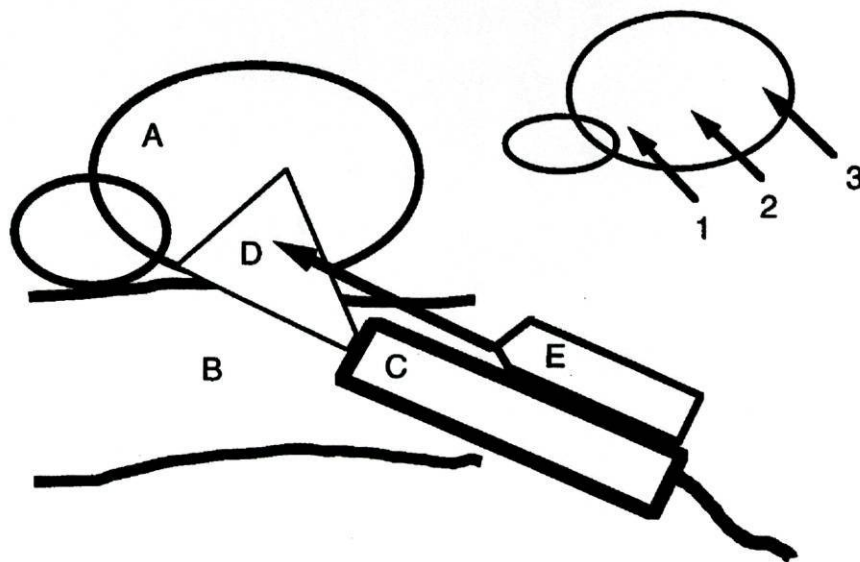


Figura III-1. Representação esquemática sagital de biópsia prostática transrectal: próstata (A), lúmen rectal (B), sonda de ultrassom (C), onda de som (D), e dispositivo de biópsia (E). As biópsias são dirigidas para a região periférica da base (1), parte média da glândula (2) e ápice (3). Adaptado de: (72).

Após colheita, o espécime foi dividido em duas porções idênticas: uma dessas porções foi imediatamente congelada a -70°C e posteriormente armazenada a essa mesma temperatura, até ao seu processamento para estudo imunohistoquímico; a outra porção foi incluída em parafina líquida também para processamento

imunohistoquímico. Este último foi realizado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Geral de Santo António (H.G.S.A.).

Como material controlo foram utilizadas amostras de tecido prostático normal dos próprios doentes, recolhidas durante a biópsia conjuntamente com o tecido tumoral.

3.3. Estudos genéticos

3.3.1. Extração de DNA – Método Clássico: “Salting Out”

O DNA (Ácido Desoxirribonucleico) genómico foi isolado de leucócitos de sangue periférico, utilizando uma modificação do método clássico de “Salting Out”, descrito por Miller *et al.* ⁽⁷³⁾, no qual a solubilidade da maioria das proteínas se apresenta bastante diminuída na presença de elevadas concentrações de sais, permitindo a sua precipitação. Este método permite obter grandes quantidades de DNA, sendo preferencialmente usado quando o DNA extraído se destina a ser armazenado (congelado).

Numa primeira fase, isolaram-se as células mononucleares (leucócitos), centrifugando (centrífuga: *Hettich zentrifugen Universal*) amostras de 10 mL de sangue a 2000 rpm, durante 10 minutos. Após a centrifugação, obteve-se a fase celular (eritrócitos e *buffy coat* - anel de leucócitos) separada da fase líquida (soro). Retirou-se o plasma e o *buffy coat* (com alguns eritrócitos à mistura) para um tubo *Falcon* de 50 mL (*Greiner Labortechnik*). Adicionaram-se 50 mL de um tampão de lise de eritrócitos (RCLB “Red Cell Lysis Buffer” – Concentração Final: 1M Tris-HCl pH7.2; 5 M NaCl e 1 M MgCl₂.6H₂O), homogeneizou-se e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. O passo seguinte consistiu numa centrifugação a 2000 rpm (centrífuga: *Megafuge 1.0 R- Heraeus Sepatech*), durante 10 minutos a 4°C. Decantou-se o sobrenadante (glóbulos vermelhos e outros) e obteve-se o *pellet* de leucócitos que foi submetido a mais duas lavagens com RCLB e a novas centrifugações, até o sobrenadante ficar límpido. Nesta fase, o *pellet* de leucócitos pode ser congelado a – 20°C ou continuar-se o procedimento, adicionando 3,5mL do tampão TE-2 (Tris-EDTA - Concentração Final: 10mM Tris-HCl; 0,4 M NaCl; 2mM EDTA), 200 µL de 10% SDS (“Sodium Dodecyl Sulfate”) e 10 µL da enzima Proteinase K (50mg/mL) (*Sigma*).

O SDS é um detergente que activa a enzima e juntamente com o TE-2 promove a lise membranar. A lise celular leva à libertação do DNA e das proteínas intracelulares. Após agitação no vórtex (*VM 2 CAT, M. Zipperer GmbH D79219 Stanfer*), a amostra foi incubada durante uma noite em banho-maria (*GFL 1083*), a 42°C, de forma a promover a digestão das células lisadas. As amostras digeridas foram, de seguida, transferidas para um tubo cónico de 15 mL (*Greiner Labortechnik*) e adicionou-se 1 mL de NaCl 6M. Este é um tampão salino que precipita as proteínas, rebentando as membranas dos leucócitos, deixando assim, o DNA livre no meio. Depois de ter sido agitada no vórtex, a solução foi submetida a agitação lenta num agitador magnético (*Stuart Scientific-platform Shaker STR 6*) durante 10 minutos, até a mistura apresentar um aspecto leitoso, resultante da precipitação das proteínas. Uma centrifugação a 3000 rpm, cerca de 20 a 30 minutos, a 23°C, permitiu separar o sobrenadante (que contém o DNA), que foi transferido para um tubo *Falcon* 15 mL, desprezando-se assim as proteínas que ficam no fundo do tubo. Finalmente, promoveu-se a precipitação do DNA com 20 mL de etanol absoluto (*Merck*) frio (-20°C), que desidrata a molécula de DNA obrigando-a a sair da solução. Por inversão do tubo várias vezes, obteve-se o DNA concentrado num novelo. Este novelo foi lavado com 5 mL de etanol a 70% frio e depois ressuspendido em tampão TE *buffer* (Tris-EDTA; Concentração Final: 10 mM Tris-HCl PH 7.2; e 1 mM EDTA). A quantidade de TE usada para diluir o DNA foi determinada pela observação empírica do tamanho do novelo, para uma concentração de DNA de aproximadamente 200 ng/μL. A solubilização do DNA foi obtida após 12 horas de permanência num agitador rotativo (*Stuart Scientific*).

3.3.2. Tipagem genética HLA classe II- DRB1

3.3.2.1. Amplificação de baixa resolução dos alelos do locus HLA-DRB1 por PCR-SSP

A identificação dos alelos HLA classe II (*locus* DRB1) foi efectuada por amplificação do DNA genómico, utilizando a técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) - SSP (“Sequence Specific Primers”) com *primers* específicos de sequência (74, 75, 76).

A técnica de PCR foi realizada pela primeira vez em 1985 por Kary Mullis, constituindo actualmente uma ferramenta indispensável no campo da biologia

molecular, nomeadamente, em biologia da evolução, diagnóstico de doenças genéticas humanas e ciências forenses ⁽⁷⁷⁾. É um método simples, rápido, capaz de copiar e amplificar sequências de DNA específicas (acima de 1 kb de comprimento) em minutos, tornando possível identificar material genético. Esta técnica permite analisar uma determinada sequência numa amostra exígua de DNA, qualquer que seja a quantidade e a qualidade do DNA, desde que tenha pelo menos uma cadeia de DNA intacta rodeando a região a ser amplificada ⁽⁷⁷⁾. É necessário conhecer a sequência de DNA que rodeia a região de interesse, para ser possível a construção dos *primers* específicos usados na amplificação. Conhecida a referida sequência é possível escolher os *primers* por forma a permitir a delimitação directa do local polimórfico. A técnica de PCR tornou-se um meio indispensável na análise de regiões polimórficas em amostras de DNA humano, permitindo com o uso do mesmo protocolo, parâmetros de PCR e reagentes, detectar um número elevado de especificidades alélicas, em vários *locus* ⁽⁷⁷⁾.

Este processo baseia-se na amplificação enzimática “in vitro” de um fragmento de DNA de interesse, flanqueado por dois *primers* que hibridizam com as extremidades 3’ da dupla cadeia ⁽⁷⁷⁾. O processo consiste em três fases, as quais são repetidas em 20 ou mais ciclos:

1. A primeira fase é a **desnaturação** da sequência de DNA que se pretende estudar: a dupla cadeia (ds DNA) é aquecida a 95°C para dar origem a cadeias simples de DNA (ss DNA) ⁽⁷⁷⁾.
2. A segunda fase envolve uma diminuição da temperatura entre os 30° a 70°C, o qual permite o “**annealing**” ou hibridização/ emparelhamento dos dois *primers* oligonucleotídicos sintéticos, um para cada um dos modelos de cadeia simples (o *primer 1* hibridiza com a extremidade 3’ da cadeia *anti-sense* e o *primer 2* com a extremidade 3’ da cadeia *sense*)⁴¹. Os *primers* são moléculas pequenas, de cadeia simples, as quais são complementares com o fim do segmento de DNA a ser amplificado ⁽⁷⁷⁾.
3. A última fase é constituída pela **extensão** dos *primers* ao longo do modelo de DNA de cadeia simples. Esta extensão é conduzida pela DNA polimerase termostável (por exemplo: a *Taq* DNA polimerase), na presença de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina - dATP, timina - dTTP, guanina - dGTP e citosina - dCTP) a 72°C. Deste modo, duas moléculas de DNA de cadeia simples são geradas a partir de uma molécula de DNA original ⁽⁷⁷⁾.

Cada ciclo permite uma duplicação teórica da sequência inicial (quantidade de DNA presente), correspondendo a um crescimento exponencial da referida sequência, ou seja, decorridos 20 ciclos o DNA em estudo, delimitado pelos *primers*, cuja sequência de bases foi previamente seleccionada, estará amplificado cerca de 1 milhão de vezes ⁽⁷⁷⁾ (Figura III-2).

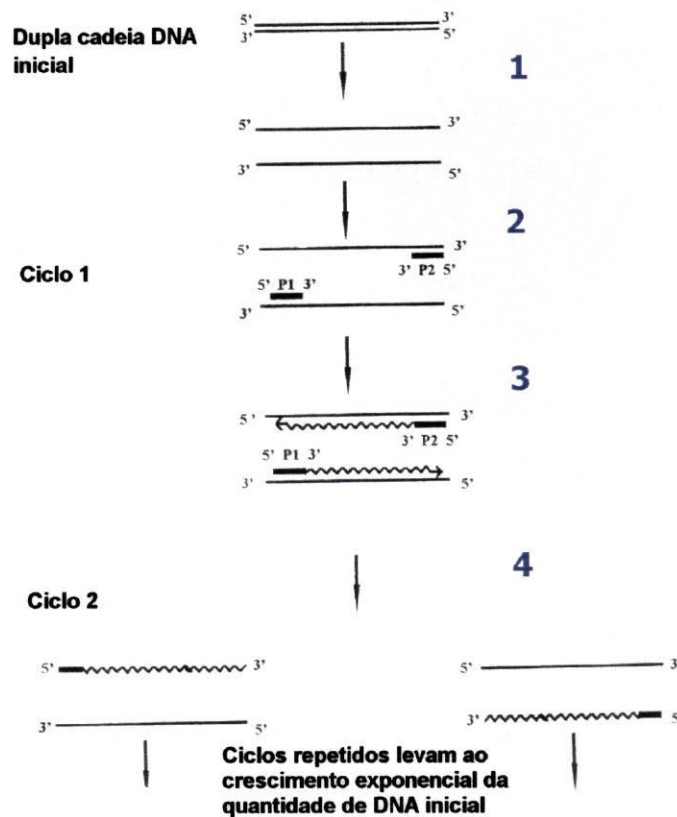


Figura III-2. Representação esquemática das fases que constituem o processo de PCR: 1) desnaturação pelo calor (95°C); 2) redução da temperatura que permite o emparelhamento dos primers; 3) síntese de DNA por extensão dos primers, efectuada pela enzima Taq polimerase (72°C); 4) desnaturação pelo calor (95°C). Adaptado de: (77).

Neste trabalho, foi efectuada a amplificação genérica do *locus* HLA-DRB1 (baixa resolução) por PCR-SSP, utilizando *primers* previamente descritos ^(74, 75, 78) e actualizados no 11º e 12º *Workshop* Internacional de Histocompatibilidade (Tabela III-3).

Para a amplificação de baixa resolução dos alelos do *locus* HLA-DRB1, o primeiro passo consistiu na distribuição das misturas dos *primers* usados para a tipagem de cada alelo. Distribuíram-se 5 µL de cada uma das misturas de *primers* (24 misturas de *primers* para o *locus* HLA-DRB1) (Tabela III-3), em tubos de PCR (*Robbins Scientific*). Como controlo interno de amplificação, foi também adicionado em cada reacção de PCR um par de *primers*: *Primer sense* (P5'): Camp A - tgc caa gtg gag cac cca a e *Primer anti-sense* (P3'): Camp B - gca tct tgc tct gtg cag at.

As misturas foram armazenadas a -20°C até à sua utilização na reacção de PCR.

Para efectuar a reacção de PCR, preparou-se uma mistura de PCR, num tubo de *eppendorf* (*Sarstedt-Aktiengesellschaft*) de 0,5 mL. Esta mistura de PCR continha 84 µL de uma mistura-mãe previamente preparada (*master-mix*)*; 29 µL de DNA (50 ng/µL); 24 µL de água estéril bidestilada e 2,2 µL de *Taq* DNA polimerase.

* A *master-mix* é uma solução composta pelos seguintes reagentes:

- a) 960 µL de água esterilizada;
- b) 1 mL de tampão (10 x NH₄⁺ (s/ Mg²⁺)) (*Bioline*);
- c) 360 µL de MgCl₂;
- d) 500 µL de glicerol (*Sigma*)
- e) 20 µL de dNTPs (*Amersham Pharmacia*);
- f) 100 µL de vermelho de cresol.

Cada um dos componentes referidos foi agitado no vórtex (*Retsch Mixer*), antes de adicionado à mistura de PCR. A enzima *Taq* DNA polimerase (*Bioline*) foi o último reagente a juntar-se à mistura.

Depois de preparada e agitada no vórtex, adicionaram-se 5 µL da mistura de PCR, com uma pipeta de distribuição, a cada tubo de PCR que continha a respectiva mistura de *primers*. Assim, para um volume final de 10 µL usou-se: 5 µL de mistura de *primers* + 5 µL da mistura de PCR. A reacção de PCR foi realizada num termociclador *GeneAmp PCR System 2700* (Perkin-Elmer, Roche, USA), de acordo com o programa de amplificação descrito na tabela III-2.

Tabela III-2: Parâmetros do programa de amplificação para PCR-SSP do polimorfismo HLA-Classe II.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo (minutos/segundos)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	2'	1
Desnaturação	94	10''	10
Emparelhamento ("Annealing")/ /Extensão	65	1'	
Desnaturação	94	10''	
Emparelhamento	61	50''	20
Extensão	72	30''	
Armazenamento (opcional)	4	indefinido	1

3.3.2.2. Electroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados por PCR foram determinados por electroforese horizontal em gel de agarose (*Ultrapure agarose GibcoBRL*) a 1,5 %, durante 30 minutos em tampão TAE 1x (composto por Trizma Base, EDTA.Na₂ e Ácido Acético Glacial). Foi utilizada uma tina de electroforese (*Pharmacia Biotech-hoefer Supersub*) ligada a uma fonte de alimentação (*Desaga Sarstedt-Gruppe desatronic 500/500*).

Os resultados foram visualizados num transiluminador U.V. (*Vilber Lourmat*) com a ajuda de brometo de etídio (*Sigma*), adicionado ao gel durante a sua preparação. O brometo de etídio, quando ligado à dupla cadeia de DNA, produz fluorescência à luz Ultra-Violeta. Finalmente, o gel foi fotografado com uma *máquina Kodak digital science DC120 Zoom Mega Pixel S/N: EK B90400416*.

3.3.3. *Estudo imunohistoquímico da expressão dos antígenos HLA classe I*

A identificação imunohistoquímica dos antígenos HLA classe I foi realizada em secções de tecido prostático incluído em parafina, utilizando os seguintes anticorpos: **HC10**, anticorpo monoclonal (mAb) que reconhece cadeias pesadas de HLA-A, -B, -C (em parafina e cortes congelados), gentilmente cedido pelo Prof. Soldano Ferrone; **NCL-B2Mp** (*Novocastra Laboratories Ltd.*), anticorpo policlonal que reconhece a β 2-microglobulina humana.

Para o estudo imunohistoquímico, foi utilizado o **método complexo da Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC)** descrito por Hsu *et al.* em 1981 ⁽⁷⁹⁾. Este procedimento utiliza um anticorpo biotilado e um complexo avidina/enzima biotilada pré-elaborado. A **avidina** tem uma afinidade extraordinariamente elevada pela vitamina **biotina**, isolada da clara do ovo (mais de 1 milhão de vezes superior à afinidade de um anticorpo pela maioria dos antígenos), daí que a ligação da avidina à biotina seja essencialmente irreversível. Além disso, a molécula de avidina apresenta quatro locais de ligação para a biotina ^(80, 81).

Neste método, após a aplicação do anticorpo primário, é aplicado um anticorpo secundário biotilado (anticorpo de ligação). A biotilação é um processo intermédio, através do qual a biotina se liga covalentemente ao anticorpo. Segue-se a aplicação de um complexo avidina-biotina-enzima pré-elaborado. Os locais de ligação da avidina, pertencente a este complexo, que ainda estão livres vão-se ligar à biotina do anticorpo de ligação ^(79, 80, 81).

Este método apresenta uma sensibilidade mais de 40 vezes superior à de qualquer outro método de imunoperoxidase, além das vantagens de redução da coloração de fundo (inespecífica) e de economia de reagentes, já que os anticorpos podem ser utilizados em diluições maiores que as normalmente utilizadas noutras técnicas ⁽⁷⁹⁾.

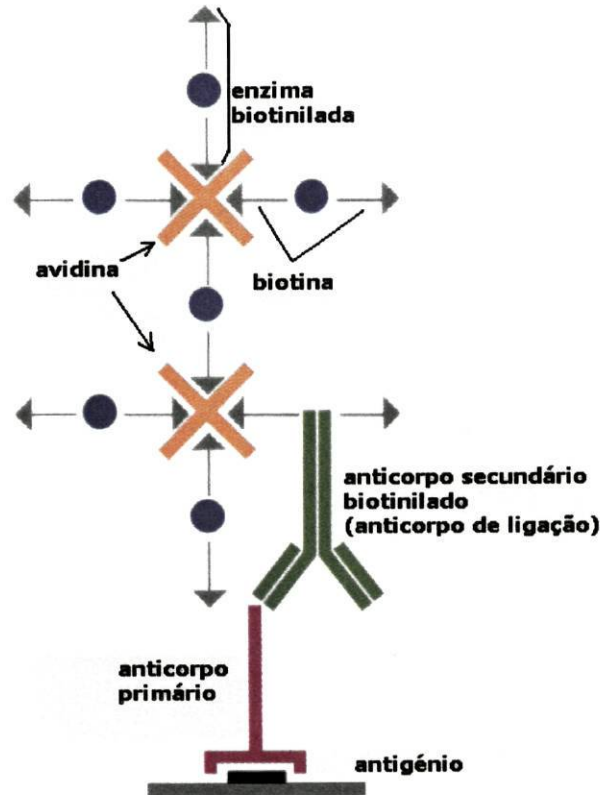


Figura III-3: Esquema representativo em que se baseia o método complexo da Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC).

3.3.3.1. Método da Avidina-Biotina-Peroxidase Complexo (ABC)

A partir dos blocos de parafina onde estavam incluídas as amostras de tecido dos doentes, fizeram-se num micrótopo (*Leica RM2035*) cortes seriados com 3 μm de espessura, que foram colocados sobre lâminas revestidas de gelatina. A gelatina favorece a adesão do corte à lâmina, evitando que este se destaque durante os tratamentos subsequentes. As lâminas de vidro (*Merck*) foram lavadas com etanol e depois de secas foram mergulhadas cinco vezes consecutivas numa solução aquecida (56°C) de gelatina a 0.5% e de $\text{KCr}(\text{SO}_4) \cdot 2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (*Fish*) a 0.05% em água destilada. Secaram durante a noite à temperatura ambiente, sendo posteriormente armazenadas a -4°C para evitar a multiplicação de microorganismos.

As lâminas com os cortes foram colocadas numa estufa (*Memmert 854 Schwabach*) a 37°C, onde permaneceram durante toda a noite, de modo a que os cortes ficassem completamente secos. De seguida, os cortes foram desparafinados com xilol e rehidratados numa série decrescente de álcoois (100%, 95%, 70%) e por último com

água corrente. Os cortes utilizados para avaliar a imunexpressão dos dois anticorpos **não foram sujeitos** a tratamentos de recuperação antigénica (proteólise).

Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena, no qual os cortes incubaram com peróxido de hidrogénio a 30% (*Merck*) diluído a 1:10 em metanol (*Merck*), durante 10 minutos. Este passo é necessário, porque vamos utilizar a peroxidase para localizar o anticorpo, através do uso de um substrato (peróxido de hidrogénio) e um cromogéneo DAB (3'3'-diaminobenzidina tetrahydrocloridro). Posteriormente, os cortes foram lavados com TBS (Tampão TRIS Salino) e incubaram com o soro normal para bloquear as ligações inespecíficas, em câmara húmida durante 20 minutos. O soro normal foi diluído a 1:5 em albumina sérica bovina (BSA, *Sigma*) diluída a 10% em TBS. Os cortes para o anticorpo monoclonal (**HC10**) incubaram com soro normal de coelho SNC (*Dako*) e os cortes para o anticorpo policlonal (**NCL-B2Mp**) com soro normal de porco SNP (*Dako*).

A aplicação do soro normal evita a coloração de fundo, devido à ligação não específica dos anticorpos ao colagénio e elementos do tecido conjuntivo. Se não se aplicar o soro normal antes do anticorpo primário, os anticorpos secundários vão-se ligar a estes anticorpos primários não ligados especificamente e quando reagem com o substrato cromogéneo, vão produzir uma coloração positiva não específica.

Depois de retirar o excesso de soro normal, os cortes incubaram com o respectivo anticorpo primário, em câmara húmida à temperatura de 4°C durante 18 horas (durante a noite). Os dois anticorpos primários utilizados e as respectivas diluições encontram-se sumariadas na tabela III-1.

Tabela III-1: Anticorpos utilizados neste estudo.

Anticorpo	Clone	Origem	Diluição	Pré-tratamento
HC10	SV 99-98	Ferrone S., USA	1:30	Nenhum
NCL-B2Mp	Policlonal	Novocastra, U.Kingdom	1:600	Nenhum

Após a lavagem com TBS, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário marcado com a biotina, produzido na mesma espécie animal que o soro normal não imune e dirigido contra as imunoglobulinas da espécie produtora do anticorpo primário. Sendo assim, para o anticorpo monoclonal utilizamos o anticorpo de coelho anti-ratinho biotilado CAR-B (*Dako*) e para o anticorpo policlonal utilizamos o anticorpo de porco anti-coelho biotilado PAC-B (*Dako*). Os anticorpos secundários foram diluídos a 1:200 com BSA a 5% e os cortes incubaram em câmara húmida à temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Seguidamente, após a lavagem com TBS os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (*Dako*) diluído 1% em BSA a 5%, em câmara húmida durante 30 minutos. Este deve ser preparado 30 minutos antes da sua aplicação.

Depois de nova lavagem, a visualização dos locais de ligação do anticorpo primário ao antigénio tecidual foi efectuada pela adição do substrato cromogénico DAB (*Sigma*) a 1mg/ml em tampão TRIS 0.05M a pH=7.6 (*Dako*), ao qual se adicionou peróxido de hidrogénio a 30% na diluição 0.075% imediatamente antes da utilização. O DAB actuou durante 7 minutos, excepto quando a marcação era evidente mais cedo e o tempo de actuação foi reduzido a fim de evitar ligações inespecíficas com marcação de fundo.

Os cortes foram colocados em água corrente durante cerca de 20 minutos, sendo depois contrastados com hematoxilina de Mayer (*Merck*) durante 1 minuto, e diferenciados em água corrente. Posteriormente, foram desidratados numa série crescente de álcoois (70%, 95%, 100%) e diafanizados com xilol. As preparações foram montadas com o epóxido Entellan (*Sigma*).

As lavagens em TBS foram sempre feitas em duplicado, durante 5 minutos cada. Como controlo positivo foram utilizados cortes de gânglios linfáticos humanos.

3.4. Análise estatística

As frequências fenotípicas para o *locus* HLA-DRB1 foram obtidas por contagem directa em cada um dos grupos de indivíduos estudado. Para analisar a existência de diferenças estatisticamente significativas nas frequências fenotípicas entre a população de doentes e a população controlo, foi utilizado o teste de χ^2 ou teste exacto de Fisher, utilizando o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) (version 10.0 for

Windows). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

Para se poder determinar se o facto de um indivíduo ser portador de um determinado alelo HLA constitui para ele um risco acrescido para contrair a doença, será necessário comparar o risco de contrair a doença nos indivíduos que possuem o alelo e naqueles que não apresentam esse alelo. A razão entre a incidência da doença nos indivíduos com o alelo e a incidência da doença nos indivíduos sem o alelo, dá-nos o Risco Relativo (RR). Se existir associação do alelo à doença, o RR constitui uma medida de força desta associação. Neste trabalho realizou-se um estudo de indivíduos doentes *versus* população controlo, não sendo por isso possível determinar a incidência da doença nos indivíduos com e sem alelo. Deste modo, não se pode calcular o risco relativo directamente. O programa SPSS dá-nos o valor do *Odds Ratio* (OR), que constitui a estimativa mais aproximada ao risco, uma vez que quantifica directamente a probabilidade que uma pessoa que possui um determinado alelo HLA (factor de risco) tem de possuir a doença, por comparação com aqueles indivíduos que não possuem esse alelo.

Assim como há alelos de susceptibilidade à doença, também podem ser encontrados alelos de protecção ou de resistência à doença. Neste caso, é calculada a chamada Fracção Preventiva, a partir da seguinte fórmula:

$$FP = \frac{(1 - RR) * fd}{RR * (1 - fd) + fd}$$

em que: FP = Fracção Preventiva

RR = Risco Relativo = OR (*Odds Ratio*)

fd = frequência do alelo na população de doentes

Tabela III-3: Pares de primers, especificidades e tamanhos dos produtos PCR das 24 misturas de primers utilizadas para a tipagem DRB1 (baixa resolução).

Nº de Mistura de Primer	Primer sense - P5'	Sequência P5'	Primer Anti-sense - P3'	Sequência P3'	Controlo Interno Primer sense		Controlo Interno Primer sense		Tamanho produto PCR (pb)	Especificidades Alélicas
					Primer sense	Primer sense	Primer sense	Primer sense		
1	501	ttg tgg cag ctt aag ttt gaa t	3047 3048	ctg cac tgt gaa gct ctc ac ctg cac tgt gaa gct ctc ca	Camp A	Camp B	255	01		
2	501	ttg tgg cag ctt aag ttt gaa t	315	ceg cct ctg ctc cag gag	Camp A	Camp B	195	0101/2/4		
3	501	ttg tgg cag ctt aag ttt gaa t	310	ccc gct cgt ctt cca gga t	Camp A	Camp B	196	0103		
4	502	tcg tgt ggc agc cta aga g	301	ceg cgc ctg ctc cag gat	Camp A	Camp B	197	1501-3,1505-7		
5	502	tcg tgt ggc agc cta aga g	302	agg tgt cca ccg cgg cg	Camp A	Camp B	213	1601,16021,1603,1605-8		
6	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	303	tgc agt agt tgt cca ccc g	Camp A	Camp B	151	0301-3,0305-8,1608		
7	506	gac gga gcg ggt gcg gta	3048	ctg cac tgt gaa gct ctc ca	Camp A	Camp B	217	0301/4/6/8		
8	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	3047	ctg cac tgt gaa gct ctc ac	Camp A	Camp B	189	0302/5,1109/20,1302/5/26,1402-3/9/13/19/24		
9	504	gtt tct tgg agc agg tta aac a	3047 3048	ctg cac tgt gaa gct ctc ac ctg cac tgt gaa gct ctc ca	Camp A	Camp B	260	04,1122,1410		
10	507	cct gtg gca ggg taa gta ta	3079	ccc gta gtt gtg tct gca cac	Camp A	Camp B	232	0701		
11	508	agt act cta cgg gfg agt gtt	3045 318	tgt tcc agt act cgg cgc t gct gtt cca gta ctc ggc at	Camp A	Camp B	161, 163	08,1317		
12	509	gtt tct tga agc agg ata agt tt	3079	ccc gta gtt gtg tct gca cac	Camp A	Camp B	236	0901		
13	510	egg ttg ctg gaa aga cgc g	3047	ctg cac tgt gaa gct ctc ac	Camp A	Camp B	204	1001		
14	505	gtt tct tgg agt act cta cgt c	306	ctg gct gtt cca gta ctc ct	Camp A	Camp B	176	1101-4,1106-22		
15	508	agt act cta cgg gfg agt gtt	308	cac tgt gaa gct ctc cac ag	Camp A	Camp B	248	1201-2,1204		
16	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	310	ccc gct cgt ctt cca gga t	Camp A	Camp B	130	1116/20,1301-2,1306,1309-10,1315-16,1327,1424		
17	505	gtt tct tgg agt act cta cgt c	3045	tgt tcc agt act cgg cgc t	Camp A	Camp B	171	1303-4,1312,1321,1413		
18	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	317	ccc gcc tgt ctt cca gga a	Camp A	Camp B	130	1305,1318,1326		
19	505	gtt tct tgg agt act cta cgt c	311	tct gca ata ggt gtc cac ct	Camp A	Camp B	224,215	1117,1401,1404-5,1407-8,1411/14/18/23		
20	508	agt act cta cgg gfg agt gtt								
20	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	312	tcc acc gcg gcc cgc c	Camp A	Camp B	140	1109,1305/6/26,1402/6/9/13/17		
21	504	gtt tct tgg agc agg tta aac a	319	ctg ttc cag tgc tcc gca g	Camp A	Camp B	172	1410		

22	551	gtt tct tgc agc agg ata agt a	301	ccg cgc ctg ctc cag gat	Camp A	Camp B	200, 207	DRB5 (2-15,16)
			316	ccg cgg cgc gcc tgt ct				
23	552,1	ttt ctt gga gct gcg taa gtc	313	cig ttc cag gac tgc gcg a	Camp A	Camp B	171, 173	DRB3 (3-17,18 ; 5-11,12 ; 6-13,14)
	552,2	gtt tct tgg agc tgc tta agt c	314	gct gtt cca gta ctc ggc at				
24	553	gag cga gtg tgg aac ctg a	3048	cig cac tgt gaa gct ctc ca	Camp A	Camp B	213	DRB4 (4,7,9)

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tipagem genética do *locus* HLA-DRB1

Para a análise do *locus* HLA-DRB1 foram estudados 32 doentes, 20 dos quais não apresentavam indicações de carcinoma prostático (DN). Aos restantes 12 foi-lhes diagnosticado carcinoma da próstata (DC), dos quais 3 apresentavam um tumor bem diferenciado (BD) com Gleason de 2-4 e os restantes 9 um tumor moderadamente diferenciado (MD) com Gleason de 4-7.

Para comparação das frequências fenotípicas do *locus* HLA-DRB1 obtidas para o grupo de doentes, foi utilizado como população controlo um conjunto de 61 indivíduos saudáveis.

4.1.1. Exemplo de genotipagem HLA Classe II - *locus* DRB1

Para todos os indivíduos estudados, a identificação dos alelos HLA-DRB1 foi efectuada por amplificação do DNA genómico por PCR-SSP (capítulo "Material e Métodos", pág. 33).

Na figura IV-1 encontra-se representada uma fotografia de um gel de agarose, tirada após a corrida electroforética, para um dos doentes (nº registo PR28-01.234). A genotipagem deste indivíduo foi realizada com o auxílio da tabela III-3 apresentada no capítulo "Material e Métodos" (págs. 43 e 44).

Na interpretação dos géis foram consideradas como amplificações específicas apenas aquelas que apresentaram bandas de peso molecular correspondentes ao do produto amplificado específico, além da banda de controlo interno (Ci).

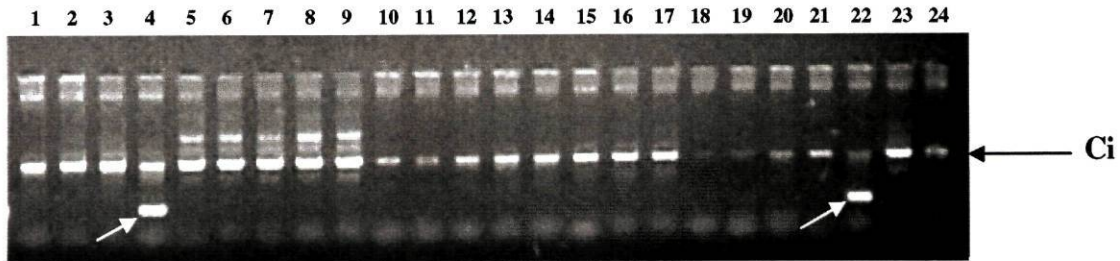


Figura IV-1. Exemplo de genotipagem para o *locus* HLA-DRB1 por PCR-SSP. A direcção da migração electroforética é de cima para baixo. As misturas, numeradas de 1 a 24 (Tabela III-3) foram colocadas no gel por ordem numérica. A banda Ci possui 796 pb. As setas brancas indicam bandas específicas.

Pela observação da figura IV-1 referente ao *locus* HLA-DRB1, pode verificar-se a amplificação da mistura 4, que origina a banda de 197 pb, indicando a presença do alelo HLA-DRB1*15. Esta especificidade é confirmada pela banda de aproximadamente 200 pb, originada da amplificação da mistura 22, específica para o gene DRB5. Uma vez que estas são as únicas bandas específicas que aparecem no gel, o doente PR28-01.234 apresenta apenas um alelo para o *locus* DRB1, o alelo HLA-DRB1*15.

A identificação de apenas um alelo na tipagem genética pode ser o resultado de uma das seguintes situações:

- a) O indivíduo é homozigótico para o único alelo encontrado;
- b) O conjunto de primers utilizado não discrimina o alelo presente no indivíduo em causa;
- c) O indivíduo apresenta um alelo que ainda não foi descrito;
- d) O indivíduo possui um alelo nulo, possivelmente pela ocorrência de uma deleção.

De todas estas hipóteses, a mais provável é a homozigotia. Não sendo, no entanto, possível confirmar esta hipótese, devido à ausência de amostras de DNA dos progenitores, consideram-se todas as possibilidades. Assim, a tipagem genética a considerar para o doente PR28-01.234 é HLA-DRB1*15,X.

4.1.2. Frequências fenotípicas obtidas para os alelos HLA-DRB1

As frequências fenotípicas obtidas para os diferentes grupos de doentes e população controlo, para o *locus* HLA-DRB1, são apresentadas na tabela IV-1. Pela sua observação, pode-se constatar que no grupo total de doentes estudados, a frequência fenotípica do alelo HLA-DRB1*01 apresenta um valor cerca de duas vezes superior ao obtido para a população controlo (31,3% Dtotal vs. 16,4% na P.Cont.) com $OR > 2$. Quando se consideram os subgrupos de doentes, este valor também se encontra aumentado, relativamente à população controlo, nomeadamente no grupo de doentes com tumor (DC), onde atinge um valor de 41,7% (gráf. IV-3).

Para a população total de doentes, destaca-se ainda um aumento na frequência do alelo HLA-DRB1*0701 (gráf. IV-1), presente em 43,8% dos doentes e em apenas 24,6% dos indivíduos pertencentes à população controlo ($OR=2,385$; $p=0,065$). O valor de p é significativo ($p=0,035$; $OR=4,293$), quando apenas se considera o grupo de doentes com carcinoma: 58,3% destes são HLA-DRB1*0701 (gráf. IV-3 e IV-5). A frequência deste alelo nos doentes com um tumor moderadamente diferenciado (MD) é de 66,7% ($OR=6,133$; $p=0,018$) (gráf. IV-4 e IV-5). Estes resultados são concordantes com um estudo semelhante efectuado por Yagci *et al.* ⁽⁸²⁾, que também observou um aumento significativo na frequência deste alelo - HLA-DRB1*0701 - numa população de doentes turcos com carcinoma da próstata.

A observação do gráfico IV-4 permite ainda constatar um aumento significativo na frequência do alelo HLA-DRB1*1001 no grupo de doentes MD (33,3% vs. 6,6% na P.Cont.; $OR=7,125$; $p=0,041$). Embora o subgrupo BD tenha apenas 3 indivíduos, também se observou um aumento nas frequências dos alelos HLA-DRB1*0701 e HLA-DRB1*1001.

Os alelos HLA-DRB1*0701 e HLA-DRB1*1001 poderão assim ser considerados alelos de risco ou de susceptibilidade à doença.

De uma forma interessante, é encontrada uma diminuição no valor da frequência fenotípica do alelo HLA-DRB1*13 na população total de doentes (12,5% vs. 29,5% na P.Cont. ; $OR=0,341$; $p=0,077$) (gráf. IV-1). A diminuição mais acentuada verifica-se no subgrupo DC, no qual a frequência fenotípica observada é apenas de 8,3% (gráf. IV-3).

Estes resultados sugerem que este poderá ser um alelo de protecção ou de resistência à doença. Por isso, foi calculada a Fracção Preventiva deste alelo, para a qual se obteve o valor de 7,19. Este valor significa que quem possuir este alelo, poderá estar 7 vezes mais protegido contra a doença, ou seja, será 7 vezes menos susceptível de a vir a desenvolver, do que uma outra pessoa que não apresente o alelo.

Verifica-se ainda uma diminuição da frequência do alelo HLA-DRB1*15 no grupo total de doentes, em relação à população controlo, em particular no subgrupo DC (8,3% DC vs. 23,0% na P.Cont.), estando também ausente do subgrupo MD. É ainda de salientar a ausência total do alelo HLA-DRB1*08 de qualquer um dos grupos de doentes estudados (tabela IV-1).

O gráfico IV-3 permite ainda observar um aumento não significativo na frequência do alelo HLA-DRB1*04 no grupo de doentes com carcinoma (33,3% DC vs. 26,2% na P.Cont. ; $p=0,725$). Um estudo de Azuma *et al.* ⁽⁸³⁾ sobre uma população de doentes japoneses, mostra que a frequência do alelo HLA-DRB1*04 se encontra significativamente aumentada no grupo de doentes com carcinoma da próstata (36,2% vs. 26,3% na população controlo ; $p<0,05$), embora o OR seja inferior a 2. Verifica-se que o valor da frequência deste alelo na população controlo no estudo japonês é igual ao obtido no nosso estudo. Além disso, também se pode constatar uma aproximação entre os valores da frequência obtida para o grupo de doentes com carcinoma (33,3% no nosso estudo vs. 36,2% no estudo japonês). No entanto, o aumento do alelo HLA-DRB1*04 observado no nosso grupo de doentes não é estatisticamente significativo ($p=0,725$), o que pode ser explicado pelo facto do número de casos por nós estudados ser muito inferior (DC=12 indivíduos) ao utilizado no estudo japonês (mais de 1000 indivíduos).

É ainda de registar um aumento na frequência fenotípica do alelo HLA-DRB1*11 no grupo de doentes aos quais não foi diagnosticado carcinoma da próstata, mas que foram submetidos a biópsia (30,0% DN vs. 14,8% na P.Cont.).

Tabela IV-1: Frequências fenotípicas para o *locus* HLA-DRB1 na população de doentes, diferentes subgrupos e população controlo.

Alelo	D total (N=32)		DN (N=20)		DC (N=12)		BD (N=3)*		MD (N=9)		P.Cont. (N=61)	
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)
HLA-DRB1*01	10	31,3	5	25,0	5	41,7	2	66,7	3	33,3	10	16,4
HLA-DRB1*03	7	21,9	5	25,0	2	16,7	0	0,0	2	22,2	11	18,0
HLA-DRB1*04	8	25,0	4	20,0	4	33,3	2	66,7	2	22,2	16	26,2
HLA-DRB1*0701	14	43,8	7	35,0	7	58,3	1	33,3	6	66,7	15	24,6
HLA-DRB1*08	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	8,2
HLA-DRB1*0901	1	3,1	1	5,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	6,6
HLA-DRB1*1001	3	9,4	0	0,0	3	25,0	0	0,0	3	33,3	4	6,6
HLA-DRB1*11	7	21,9	6	30,0	1	8,3	0	0,0	1	11,1	9	14,8
HLA-DRB1*12	1	3,1	1	5,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	3,3
HLA-DRB1*13	4	12,5	3	15,0	1	8,3	0	0,0	1	11,1	18	29,5
HLA-DRB1*14	1	3,1	1	5,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	3,3
HLA-DRB1*15	3	9,4	2	10,0	1	8,3	1	33,3	0	0,0	14	23,0
HLA-DRB1*X	5	15,6	5	25,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	6	9,8

D total = total de doentes estudados; **DN** = doentes normais (sem carcinoma); **DC** = doentes com carcinoma (presença de tumor); **BD** = doentes com tumor bem diferenciado; **MD** = doentes com tumor moderadamente diferenciado; **P.Cont.** = população controlo; **Freq. (%)** = frequência fenotípica (em percentagem); **N** = número de indivíduos.

* Dado o reduzido número de doentes pertencentes ao grupo BD, os resultados apresentados para este grupo são apenas informativos.

Nota: o alelo HLA-DRB1*16 não é apresentado na tabela, já que não se encontra representado nem na população de doentes, nem na população controlo.

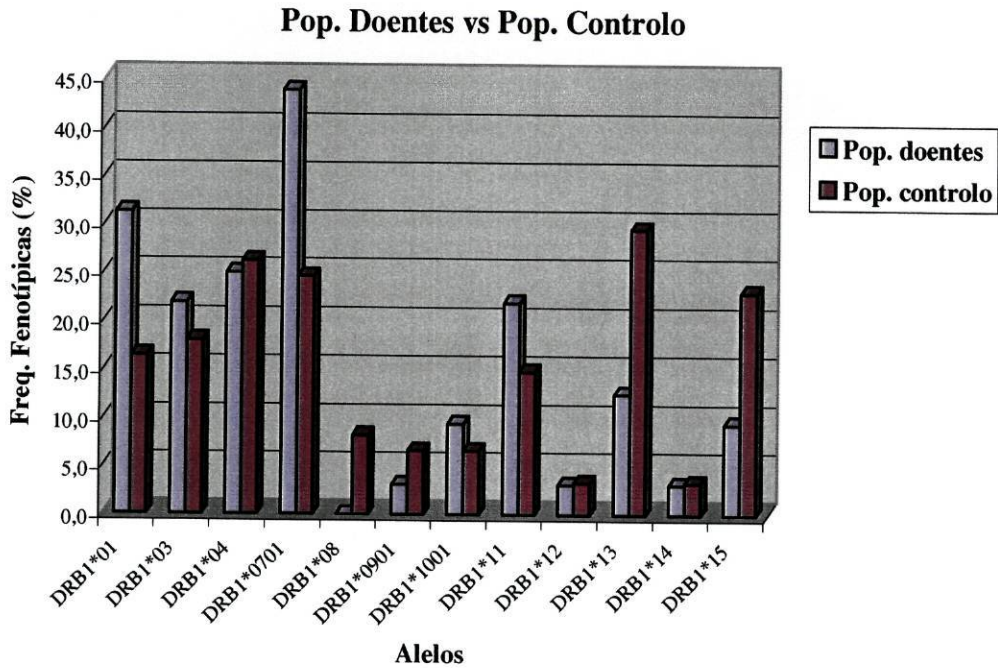


Gráfico IV-1: Representação gráfica das frequências fenotípicas para os vários alelos HLA-DRB1 entre o grupo total de doentes estudados e a população controlo.

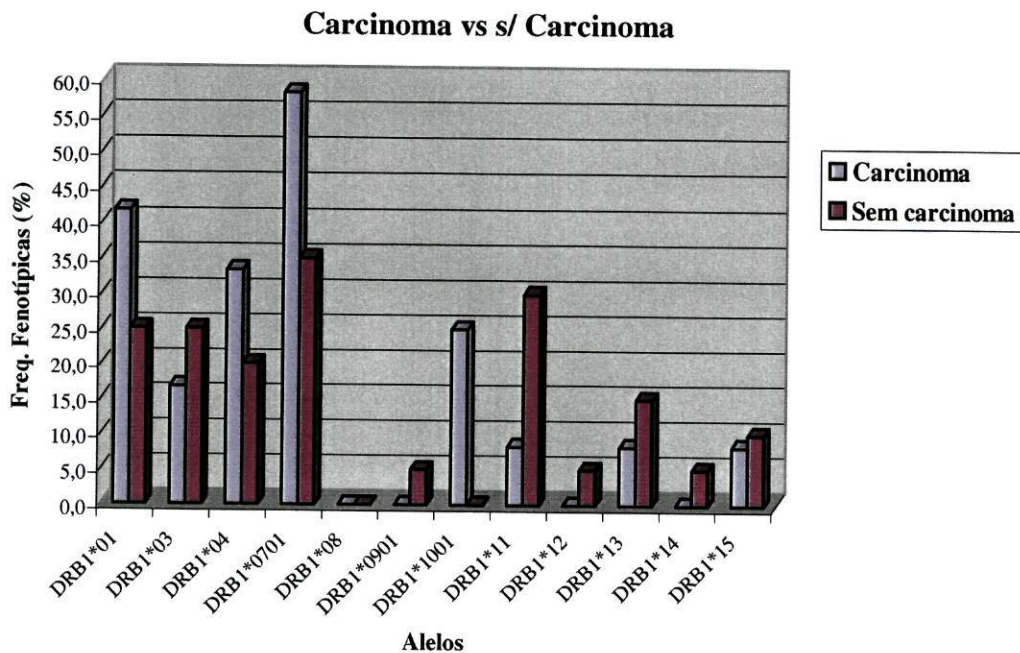


Gráfico IV-2: Representação gráfica das frequências fenotípicas para os vários alelos HLA-DRB1 entre o grupo de doentes com carcinoma e o grupo de doentes sem carcinoma.

Doentes c/ Carcinoma vs Pop. Controle

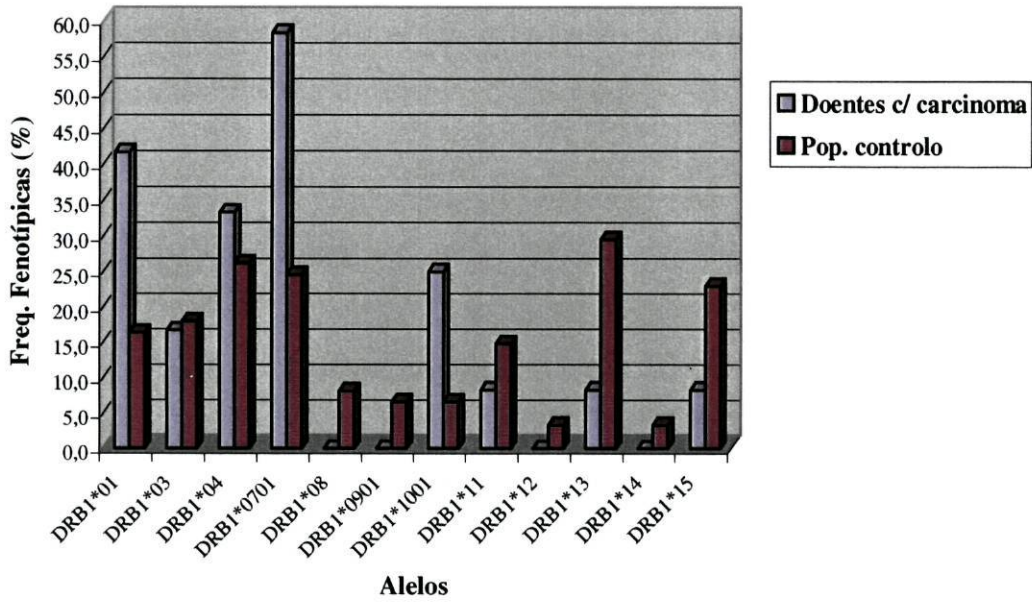


Gráfico IV-3: Representação gráfica das frequências fenotípicas para os vários alelos HLA-DRB1 entre o grupo de doentes com carcinoma e a população controle.

MD vs Pop. Controle

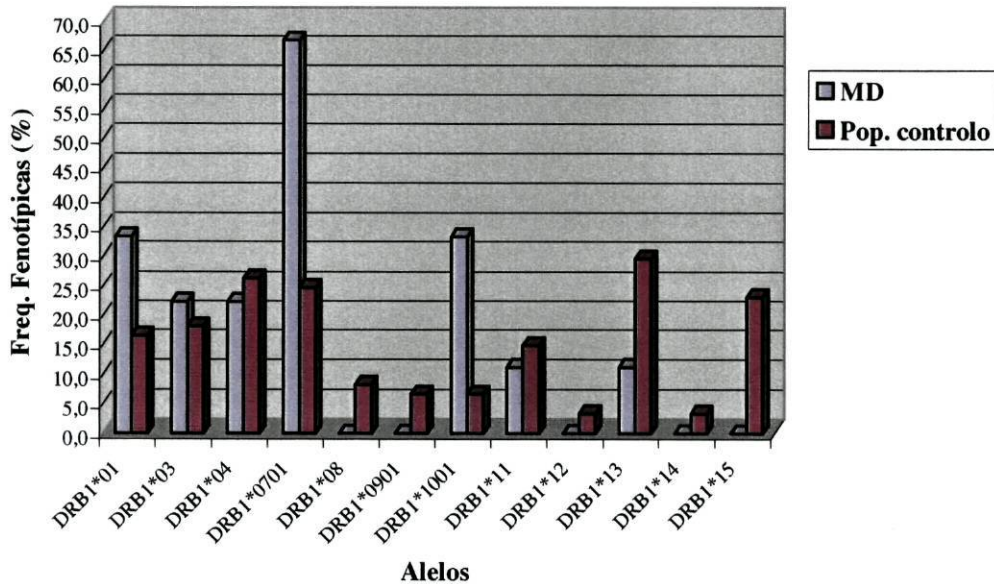


Gráfico IV-4: Representação gráfica das frequências fenotípicas para os vários alelos HLA-DRB1 entre o grupo de doentes com um tumor moderadamente diferenciado (MD) e a população controle.

Alelos mais significativos

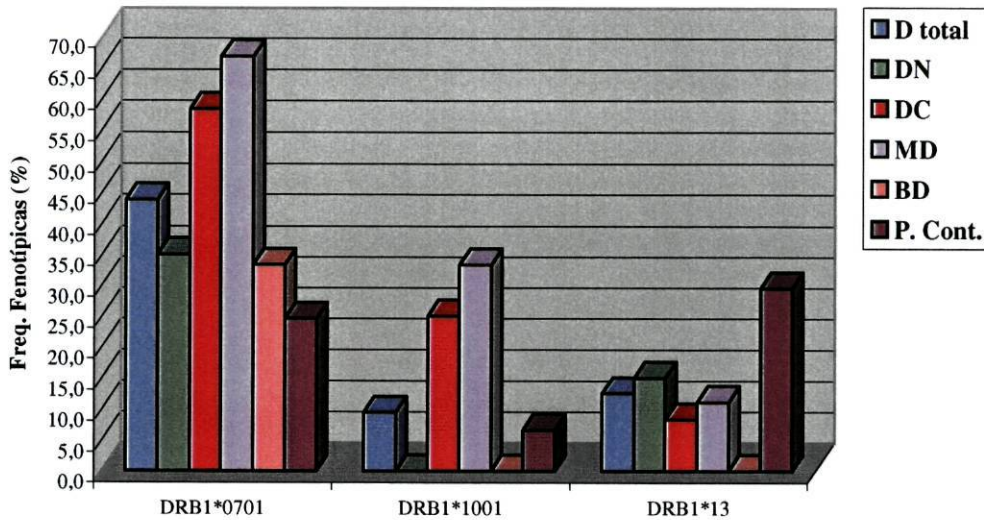


Gráfico IV-5: Representação gráfica das frequências fenotípicas para os alelos HLA-DRB1 que apresentaram diferenças mais significativas entre os vários grupos de doentes e a população controlo.

4.2. Estudo imunohistoquímico da expressão dos antígenos HLA classe I

Na tabela IV-2, são apresentados os resultados do estudo imunohistoquímico, em cortes histológicos de biópsia de carcinoma da próstata. Para a expressão da β 2-microglobulina (marcação com o anticorpo NCL-B2Mp) na área de carcinoma (células neoplásicas) pode-se verificar que em 50% dos casos não houve marcação e que em 30% se verifica apenas uma marcação fraca (gráf. IV-6). Estes resultados sugerem que em metade dos casos houve uma perda total de expressão da β 2-microglobulina nas células tumorais, resultados que são apoiados pelas observações de Algarra *et al.* ⁽⁴⁹⁾ num estudo que refere que a perda total de expressão dos antígenos HLA classe I ocorre entre 9% e 52% dos tumores em geral. No entanto, a percentagem de casos obtida neste trabalho é substancialmente maior que a observada por Algarra *et al.* para o cancro da próstata (50% vs. 34%). Se, de uma forma geral, se considerar qual a percentagem de casos, nos quais se verifica uma perda parcial ou total da expressão dos antígenos HLA, obtém-se uma percentagem de 80%, muito próxima dos 90% encontrados por Lu *et al.* ⁽⁶²⁾ para o cancro da próstata.

Ainda para a expressão da $\beta 2m$, no tecido normal adjacente à lesão, verifica-se que em 42,9% do total de casos se regista uma intensidade de marcação fraca. Marcação mais intensa (++) é observada em 21,4% dos casos, e em 35,7% dos casos observa-se uma intensidade de marcação forte.

Relativamente à expressão da cadeia α da molécula HLA classe I (marcação com o anticorpo HC10) na área da lesão, verifica-se ausência de marcação em 85,7% dos casos, sendo de referir num único caso uma marcação de fraca intensidade (gráf. IV-7). Apesar do reduzido número de casos estudados (7 casos), devido à falta de material biológico dos doentes, os resultados obtidos (85,7%) são concordantes com os obtidos por Lu *et al.* (90%) para a percentagem de casos onde se verifica uma perda total ou parcial da expressão dos antígenos HLA classe I.

No tecido normal adjacente à lesão, verifica-se que em 54,5% dos casos não há marcação, o que não era de todo esperado, já que a cadeia α da molécula HLA classe I é constitutivamente expressa em todas as células normais nucleadas do organismo humano. Uma marcação de intensidade fraca é observada em 27,2% dos casos e apenas 18,2% registam uma marcação mais intensa (++) .

Tabela IV-2: Número de casos observados para os vários graus de intensidade da marcação com os anticorpos NCL-B2Mp ($\beta 2$ -microglobulina) e HC10 (cadeia α do HLA classe I), nas áreas de carcinoma e tecido normal adjacente observado em cortes histológicos de biópsia de carcinoma prostático.

		Marcação (intensidade)								Total de casos
		-		+		++		+++		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
NCL-B2Mp	C	5	50,0	3	30,0	1	10,0	1	10,0	10
	TN	0	0,0	6	42,9	3	21,4	5	35,7	14
HC10	C	6	85,7	1	14,3	0	0,0	0	0,0	7
	TN	6	54,5	3	27,2	2	18,2	0	0,0	11

- : ausência de marcação; graus de intensidade da marcação: + a +++

C = carcinoma

TN = tecido normal adjacente

N = número de casos

Nota: o número total de casos não corresponde necessariamente ao número total de doentes.

Marcação do NCL-B2Mp (β 2m)

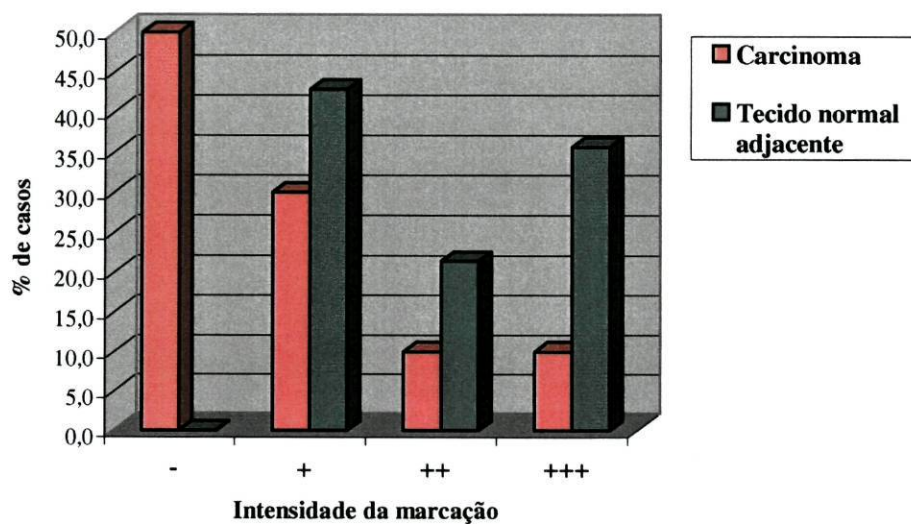


Gráfico IV-6: Representação gráfica da percentagem de casos para cada um dos graus de intensidade da marcação com o anticorpo para a β 2-microglobulina (NCL-B2Mp), no carcinoma e no tecido normal adjacente.

Marcação do HC10 (cadeia α)

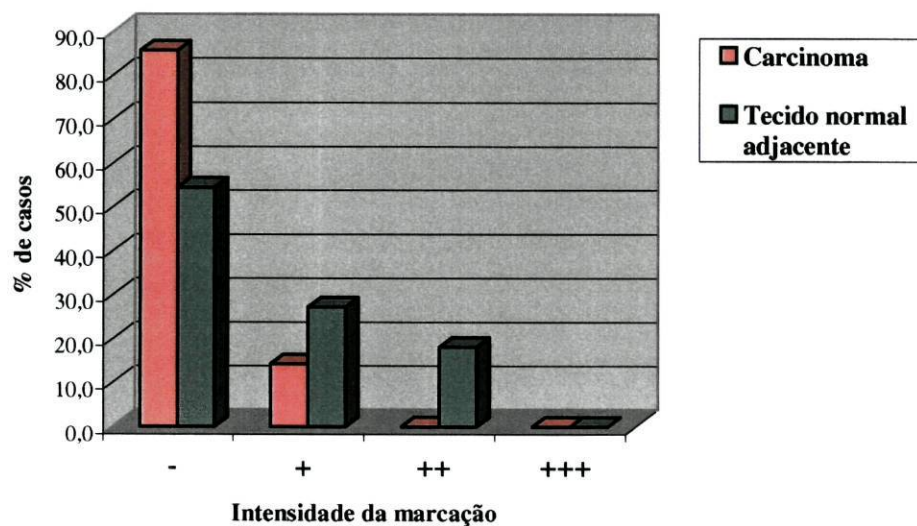


Gráfico IV-7: Representação gráfica da percentagem de casos para cada um dos graus de intensidade da marcação com o anticorpo para a cadeia α do HLA classe I (HC10), no carcinoma e no tecido normal adjacente.

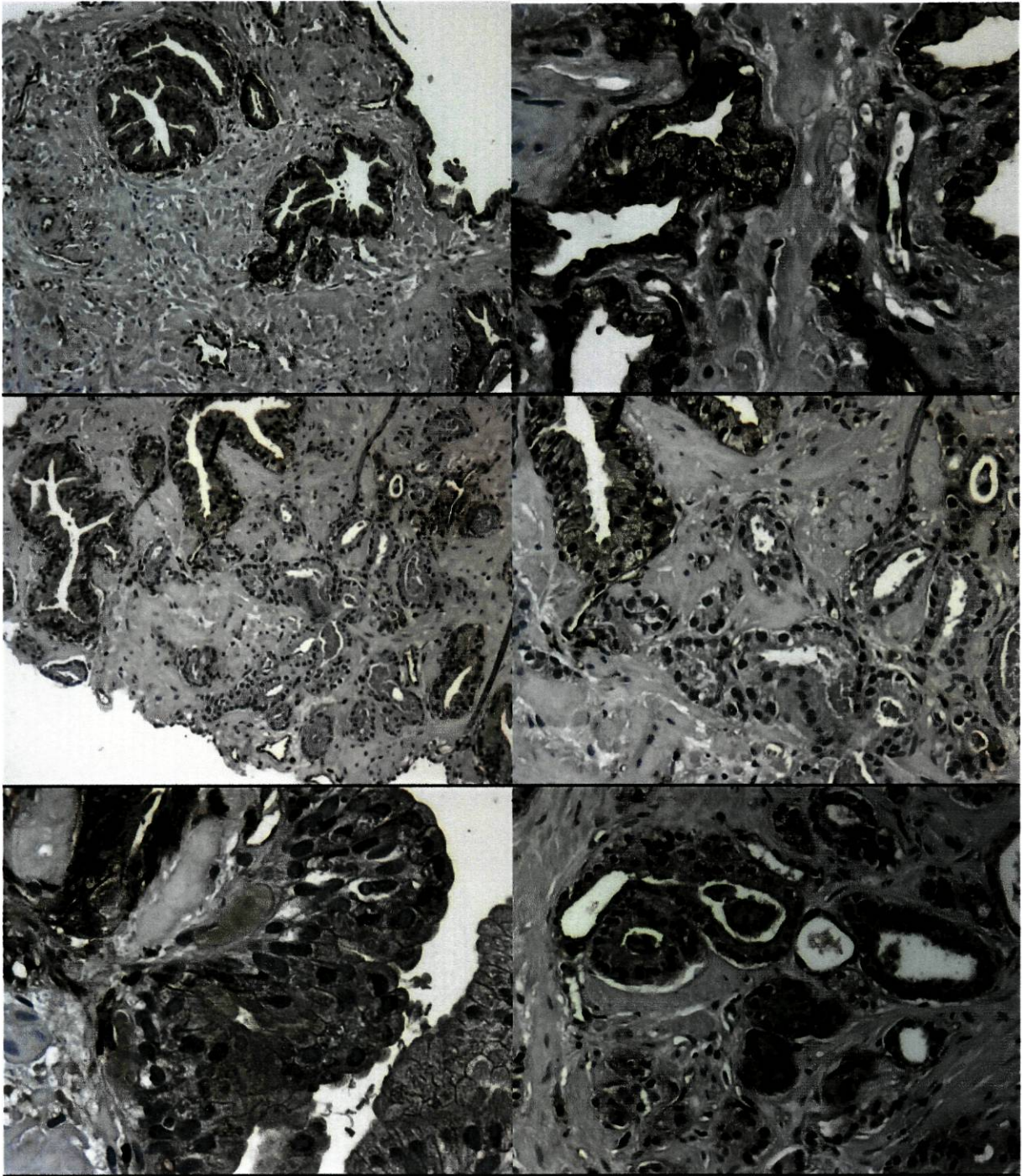


Figura IV-1. Exemplos de resultados obtidos no estudo imunohistoquímico para a expressão da cadeia leve (β 2-microglobulina) da molécula HLA classe I, utilizando o anticorpo NCL-B2Mp.

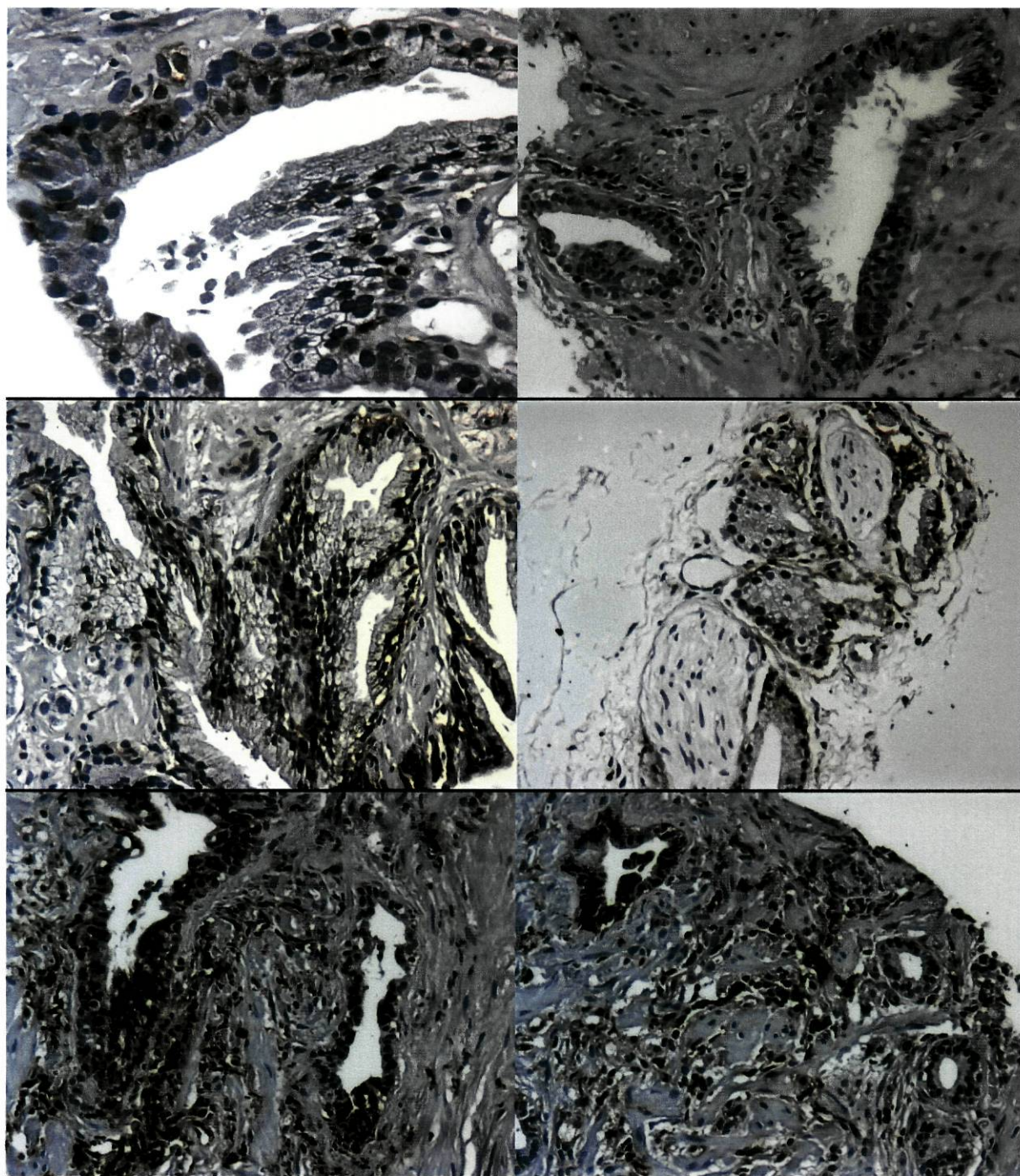


Figura IV-2. Exemplos de resultados obtidos no estudo imunohistoquímico para a expressão da cadeia pesada (cadeia α) da molécula HLA classe I, utilizando o anticorpo HC10.

V - CONCLUSÕES

Na população de doentes estudada, foi possível verificar uma associação entre os doentes com carcinoma da próstata e os alelos HLA-DRB1*0701 e HLA-DRB1*1001, nomeadamente no grupo de doentes com um tumor moderadamente diferenciado. O facto do aumento da frequência destes alelos ser mais significativo nos doentes com carcinoma que apresentam um grau de diferenciação menor, pode significar que a presença destes dois alelos está associada a uma susceptibilidade à progressão da doença, e portanto indicar uma susceptibilidade ao desenvolvimento de um tumor. Os alelos HLA-DRB1*0701 e HLA-DRB1*1001 poderão assim ser considerados alelos de risco ou de susceptibilidade à doença.

Por outro lado, foi encontrada uma associação "negativa" do alelo HLA-DRB1*13 com a doença. Este alelo encontra-se diminuído na população de doentes, quando comparada com a população controlo, diminuição essa que, no entanto, não chega a ser significativa. O cálculo da Fracção Preventiva permitiu chegar a um valor de 7,19, o que significa que quem possuir este alelo poderá estar 7 vezes mais protegido contra a doença, do que um indivíduo em que no seu fenótipo este alelo esteja ausente.

Relativamente ao estudo da expressão dos antigénios HLA classe I no tecido prostático dos doentes, concluiu-se que esta expressão está diminuída ou até mesmo ausente nos tecidos onde existe lesão. Isto verifica-se, quer para a cadeia leve da molécula HLA classe I ($\beta 2m$) identificada pelo anticorpo NCL-B2Mp, quer para a cadeia pesada (cadeia α) identificada pelo anticorpo HC10, embora no primeiro caso os resultados tenham sido mais consistentes, tanto no tecido lesionado como no tecido normal adjacente.

Este estudo demonstrou que, para o cancro da próstata, assim como sucede em muitos outros tumores, a expressão dos antigénios HLA da classe I à superfície das células neoplásicas, se encontra bastante diminuída ou até mesmo ausente.

A diminuição ou ausência de expressão destas moléculas poderá ser um mecanismo de escape das células tumorais à vigilância efectuada pelas células do sistema imune. O esclarecimento deste mecanismo poderá ser um veículo para o desenvolvimento de uma imunoterapia específica dirigida, mediada pelas células do sistema imune. Além disso, o conhecimento do fenótipo HLA exibido pelo tumor, poderá representar um critério

importante na selecção dos doentes, para a elaboração de um protocolo imunoterapêutico efectivo.

O estudo da expressão destes antigénios, utilizando outros anticorpos específicos de *locus* ou de alelos, poderão permitir a identificação de outros fenótipos HLA frequentemente encontrados noutros tumores, além do Fenótipo I (perda total de antigénios HLA) encontrado neste trabalho.

Além disso, seria também importante efectuar a tipagem genética de indivíduos com carcinoma da próstata, para os restantes *loci* da classe II (HLA-DP e -DQ) e para os *loci* da classe I (HLA-A, -B e -C), para poder identificar outros possíveis alelos de susceptibilidade.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Von Eschenbach AC (1999). The challenge of prostate cancer. *CA Cancer J Clin* **49**: 262-263.
- 2 Jensen OM, Esteve J, Moller H *et al.* (1990). Cancer in the European Community and its member states. *Eur J Cancer* **26**: 1167-1256.
- 3 Black RJ, Bray F, Ferlay J *et al.* (1997). Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* **33**: 1075-1107.
- 4 Pienta KJ. Etiology, Epidemiology, and Prevention of Carcinoma of the Prostate *In* Walsh, Retik, Vaughan, Wein (1998). Campbell's Urology, Seventh Edition-Volume 3. W. B. Saunders Company, Philadelphia: 2489-2496.
- 5 Borre M, Nerstrom B, Overgaard J (1997). The natural history of prostate carcinoma based on Danish population treated with no intent to cure. *Cancer* **80**: 917-928.
- 6 Amado J (1994). Registo Oncológico de Vila Nova de Gaia, 1981-1991. Porto.
- 7 DeVita Jr. VT, Hellman S, Rosenberg SA (1997). Cancer: Principles & Practice of Oncology, Fifth Edition - Volume 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- 8 Harper ME, Glynne-Jones E, Goddard L *et al.* (1998). Expression of androgen receptor and growth factors in premalignant lesions of the prostate. *J Pathol* **186**: 169-177.
- 9 Cotran, Kumar, Robbins (1994). Robbins Pathologic Basis of Disease, 5th Edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- 10 Melekos MD (1996). Prognostic factors in prostate cancer. *The Cancer Journal* **9**(4). Disponível em:
<http://www.infobiogen.fr/agora/journals/cancer/articles/9-4/mele>
- 11 Epstein JI. Pathology of Adenocarcinoma of the Prostate *In* Walsh, Retik, Vaughan, Wein (1998). Campbell's Urology, Seventh Edition-Volume 3. W. B. Saunders Company, Philadelphia: 2497-2505.
- 12 Orozco RE, O'Dowd G, Miller C *et al.* (1998). Observations on pathology trends in 62.537 prostatic biopsies obtained from urology private practices in the United States. *Urology* **51**: 186-195.

- 13 Burton J, Oakley N, Anderson JB (2000). Recent advances in the histopathology and molecular biology of prostate cancer. *Br J Urol* **85**: 87-94.
- 14 Gleason D, Mellinger G (and the Veterans Administration Cooperative Urological Research Group) (1974). Prediction of prognosis for prostate adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* **111**: 58-64.
- 15 Bostwick DG, Eble JN (1997). *Urologic Surgical Pathology*, 1st Edition. Mosby, St. Louis.
- 16 Carter HB, Partin AW. Diagnosis and Staging of Prostate Cancer *In* Walsh, Retik, Vaughan, Wein (1998). *Campbell's Urology, Seventh Edition-Volume 3*. W. B. Saunders Company, Philadelphia: 2519-2537.
- 17 Smith MR (2000). Determinação do PSA para rastreio do carcinoma da próstata: haverá algum benefício? *IM Medicina Interna* **1**(4): 38-41.
- 18 Brawer MK (1999). Prostate-specific antigen: current status. *CA Cancer J Clin* **49**: 264-281.
- 19 DeAntoni EP, Crawford ED (1996). Prostate cancer awareness week: education, service and research in a community setting. *Cancer* **75**(7): 1874.
- 20 Carter HB, Pearson JD (1999). Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer: formulation of guidelines. *Urology* **54**: 780-786.
- 21 Veltri RW, Miller MC (1999). Free/Total PSA ratio improves differentiation of benign and malignant disease of the prostate: critical analysis of two different test populations. *Urology* **53**: 736-745.
- 22 Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ *et al.* (2000). A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Research* **60**: 756-759.
- 23 Vashi AR, Wojno KJ, Henricks W *et al.* (1997). Determination of the "reflex range" and appropriate cutpoints for percent free prostate-specific antigen in 413 men referred for prostatic evaluation using the AxSYM system. *Urology* **49**: 19-27.
- 24 Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM *et al.* (1998). Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic diseases. *JAMA* **279**(19): 1542-1547.
- 25 Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW (1999). Prostate specific antigen: a decade of discovery - What we have learned and where we are going. *J Urol* **162**(2): 293-306.

- 26 Sobin DH, Witteking CH (1997). Classification of malignant tumours, 5th Edition. Wiley-Liss, New York.
- 27 Abbas K, Lichtman AH, Pober S (1997). Cellular and molecular immunology, Third Edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- 28 Martins da Silva B, Porto MT (1996). Expressão HLA nos tumores. *Revista da Sociedade Portuguesa de Imunologia* 3: 5-10.
- 29 Moss DJ, Khanna R (1999). Major histocompatibility complex: from genes to function. *Immunol Today* 20(4): 165-167.
- 30 Disponível em:
<http://www-immuno.path.cam.ac.uk/~immuno/mhc/mhc.html>
- 31 Marsh S, Parham P, Barber L (2000). The HLA – Facts Book. Academic Press, New York.
- 32 IMGT/HLA-Database.
Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>
- 33 Disponível em:
<http://www.crysl.bbk.ac.uk/ppp97/assignments/projects/coadwell/006.html>
- 34 Sokoloff MH, Tso CL, Kaboo R *et al.* (1996). In vitro modulation of tumor progression-associated properties of hormone refractory prostate carcinoma cell lines by cytokines. *Cancer* 77(9): 1862-1872.
- 35 Borst J, Cope A (1999). Turning the immune system on. *Immunol Today* 20(4): 156-158.
- 36 DeSandro A, Nagarajan UM, Boss JM (1999). The bare lymphocyte syndrome: molecular clues to the transcriptional regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Am J Hum Genet* 65: 279-286.
- 37 Seliger B, Schreiber K, Delp K *et al.* (2001). Downregulation of the constitutive tapasin expression in human tumor cells of distinct origin and its transcriptional upregulation by cytokines. *Tissue Antigens* 57: 39-45.
- 38 Raghavan, M (1999). Immunodeficiency due to defective antigen processing: the molecular basis for type 1 bare lymphocyte syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 103(5): 595-596.

- 39 Yang Y (2000). Major histocompatibility complex class I antigen processing and presentation. *Mod Asp Immunobiol* **1**(2): 70-72.
- 40 Reits EA, Griekspoor AC, Neefjes J (2000). How does TAP pump peptides? Insights from DNA repair and traffic ATPases. *Immunol Today* **21**(12): 598-600.
- 41 Seiter S, Marincola FM (2000). The multiple ways to tumor tolerance. *Mod Asp Immunobiol* **1**(3): 121-124.
- 42 Alimonti J, Zhang QJ, Gabathuler R *et al.* (2000). TAP expression provides a general method for improving the recognition of malignant cells in vivo. *Nature Biotechnology* **18**: 515-520.
- 43 Disponível em:
<http://www.ultranet.com/~jkimball/BiologyPages/A/AntigenPresentation.html>
- 44 Disponível em:
<http://www.med.sc.edu:85/bowers/MHCInew>
- 45 Klein J, Sato A (2000). The HLA system – Second of two parts. *Advances in Immunology* **343**(11): 782-786.
- 46 Chattopadhyay U (1999). Tumour immunotherapy: developments and strategies. *Immunol Today* **20**(11): 480-482.
- 47 Finke J, Ferrone S, Frey A *et al.* (1999). Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumours. *Immunol Today* **20**(4): 158-160.
- 48 Ferrone S, Finerty JF, Jaffee EM *et al.* (2000). How much longer will tumour cells fool the immune system? *Immunol Today* **21**(2): 70-72.
- 49 Algarra I, Cabrera T, Garrido F (2000). The HLA crossroad in tumour immunology. *Human Immunology* **61**: 65-73.
- 50 Ruiz-Cabello F, Garrido F (1998). HLA and cancer: from research to clinical impact. *Immunol Today* **19**(12): 539-542.
- 51 Garrido F, Cabrera T, Concha A *et al.* (1993). Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* **14**(10): 491-499.
- 52 Garrido F, Cabrera T, López-Nevot MA *et al.* (1995). HLA class I antigens in human tumours. *Adv Cancer Res* **67**: 155-195.

- 53 Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T *et al.* (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* **18**(2): 89-95.
- 54 Cabrera T, Collado A, Fernandez MA *et al.* (1998) High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* **52**: 114.
- 55 Natali PG, Nicotra MR, Bigotti (1989). Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6719-6723.
- 56 Blades RA, Keating RJ, McWilliam LJ *et al.* (1995). Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy. *Urology* **46**: 681-687.
- 57 O'Connell J (2000). The Fas counterattack: a new perspective on immune evasion by cancers. *Mod Asp Immunobiol* **1**(2): 60-62.
- 58 Seliger B, Harders C, Lohmann S (1998). Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts. *Eur J Immunol* **28**: 122-133.
- 59 Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ *et al.* (2000). Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* **55**: 401-411.
- 60 Wells AD, Malkovsky M (2000). Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol Today* **21**(3): 129-132.
- 61 Cabrera T, Salinero J, Fernandez MA *et al.* (2000). High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Human Immunology* **61**: 499-506.
- 62 Lu QL, Abel P, Mitchell S *et al.* (2000). Decreased HLA-A expression in prostate cancer is associated with normal allele dosage in the majority of cases. *J Pathol* **190**: 169-176.
- 63 Ploegh HL (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**: 248-253.
- 64 Maudsley DJ, Pound JD (1991). Modulation of MHC antigen expression by viruses and oncogenes. *Immunol Today* **12**(12): 429-431.
- 65 Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* **21**(9): 455-464.

- 66 Cromme FV, Airey J, Heemels MT *et al.* (1994). Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* **179**: 335-340.
- 67 Jimenez P, Cantón J, Concha A *et al.* (2000). Microsatellite instability analysis in tumors with different mechanisms for total loss of HLA expression. *Cancer Immunol Immunother* **48**: 684-690.
- 68 Ramal LM, Feenstra M, van der Zwan AW *et al.* (2000). Criteria to define HLA haplotype loss in human solid tumors. *Tissue Antigens* **55**: 443-448.
- 69 Long EO (1998). Signal sequences stop killer cells. *Nature* **391**: 740-743.
- 70 Bauer S, Groh V, Wu J *et al.* (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**: 727-729.
- 71 Hodge KK, McNeal SE, Ferris MK *et al.* (1989 b). Random systematic versus directed ultrasound-guided transrectal core biopsies of the prostate. *J Urol* **142**: 71-74.
- 72 Brawer MK, Chetner MP. Ultrasonography of the prostate and biopsy *In* Walsh, Retik, Vaughan, Wein (1998). *Campbell's Urology, Seventh Edition-Volume 3*. W. B. Saunders Company, Philadelphia: 2506-2518.
- 73 Miller AA, Dykes DD, Polesky HF (1998). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* **16**(3): 1215.
- 74 Olerup O, Zetterquist H (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinic practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* **39**: 225-235.
- 75 Bunce M, O'Neill C, Barnardo M *et al.* (1995). Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* **46**: 355-367.
- 76 Sidransky D (1997). Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* **278**: 1054-1058.
- 77 Pinheiro F (2000). *Biologia forense e criminalística. Curso de pós-graduação em ciências médico-legais*. Instituto de Medicina Legal do Porto.
- 78 Olerup O, Zetter-Quist H (1993). DR "low-resolution" PCR-SSP typing - a correction and an update. *Tissue Antigens* **40**: 55-56.

- 79 Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **28**: 577.
- 80 Naish SJ, Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH (1989). *Immunochemical Staining Methods*. DAKO Corporation. Carpinteria, California.
- 81 Carson FL (1990). *Histotechnology – A Self-instructional Text*. ASCP Press – American Society of Clinical Pathologists. Chicago.
- 82 Yagci F, Sarica K (2000). Evaluation of human leukocyte antigen expression in patients with prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol* **34**(6): 352-354.
- 83 Azuma H, Sada M, Tsuji T *et al.* (1999). Relationship between HLA-DR antigen and HLA-DRB1 alleles and prostate cancer in Japanese men. *Int Urol Nephrol* **31**(3): 343-349.

VII - ANEXOS

Código (nº registo)	Idade	Níveis séricos de PSA (PSA total) (ng/ml)	Razão PSA livre/PSA total (%)	Nº registo da A.P.	DRB1*
PR01-00.333	72	22,1	-	H00/7184	03, 11 ; DRB3+
PR02-00.334	78	14,5	18,1	H00/7173	0701, x ; DRB4+
PR03-00.335	73	8,9	12,6	H00/7169	0103, 0701 ; DRB4+
PR04-00.352	53	12,7	7,7	H01/1926	04, 11 ; DRB3+, DRB4+
PR05-00.353	64	8,0	11,0	H00/7567	03, 15 ; DRB3+, DRB5+
PR07-00.354	55	5,2	-	H00/7565	0701, 1001 ; DRB4+
PR08-00.374	77	8,5	10,7	H00/7783	01, 04 ; DRB4+
PR09-00.375	66	14,4	-	H01/2377	0701, 11 ; DRB3+, DRB4+
PR10-00.376	68	7,6	21,1	H00/7781	0701, 1001 ; DRB4+
PR11-00.377	72	13,5	15,3	H00/7779	0701, 11 ; DRB3+, DRB4+
PR12-00.501	68	11,2	-	H00/8207	03, x ; DRB3+
PR13-00.502	68	11,1	14,7	H00/8208	04, x ; DRB4+
PR14-00.425	63	15,3	19,3	H00/8409	0701, 13 ; DRB3+, DRB4+
PR15-00.426	58	3,1	-	H00/8415	0901, 11 ; DRB3+, DRB4+
PR16-01.017	64	6,2	13,9	H01/0241	01,13 ; DRB3+
PR17-01.101	78	14,8	8,5	H01/0243	03, 04 ; DRB3+, DRB4+
PR18-01.103	72	8,9	7,4	H01/0245	04, 15 ; DRB4+, DRB5+
PR19-01.182	57	13,7	3,8	H01/1355	01, 0701 ; DRB4+
PR20-01.146	52	5,6	9,0	H01/1350	0701,13 ; DRB3+, DRB4+
PR21-01.181	64	11,3	12,3	H01/1359	01, 0701 ; DRB4+
PR22-01.186	71	16,1	26,7	H01/1348	01, 03 ; DRB3+
PR23-01.174	64	4,6	8,5	H01/1923	11, 12 ; DRB3+
PR24-01.177	85	5,2	16,2	H01/1915	01, 04 ; DRB4+
PR25-01.206	67	10,2	13,0	H01/2150	01, 13 ; DRB3+
PR26-01.207	54	4,8	14,8	H01/2371	04, x ; DRB4+
PR27-01.203	81	13,3	19,0	H01/2373	04, 14 ; DRB3+, DRB4+
PR28-01.234	60	6,0	23,2	H01/2814	15, x ; DRB5+
PR29-01.231	70	6,5	11,0	H01/2807	01, 03 ; DRB3+
PR30-01.235	73	41,7	-	H01/2819	01, 0701 ; DRB4+
PR31-01.233	62	26,6	-	H01/2810	0701,11 ; DRB3+, DRB4+
PR32-01.232	70	25,2	15,0	H01/3017	03, 0701 ; DRB3+, DRB4+
PR33-01.240	57	12,9	14,3	H01/3186	0701,1001 ; DRB4+

Tabela VII-1. Lista de doentes estudados, com os dados da idade, níveis de PSA e resultados da tipagem genética do *locus* HLA-DRB1.

	Código (nº registo)	Nº registo da A.P.	Imunohistoquímica			
			b2-mic		HC10	
			Área benigna	Área carcinoma	Área benigna	Área carcinoma
Normais	PR02-00.334	H00/7173	+ (~100%)	NE	+ (~10%)	NE
	PR04-00.352	H01/1926 #	NE	NE	NE	NE
	PR05-00.353	H00/7567	+++ (~100%)	NE	-	NE
	PR09-00.375	H01/2377	-	NE	-	NE
	PR11-00.377	H00/7779	+++ (~100%)	NE	++ (~40%)	NE
	PR12-00.501	H00/8207 #	NE	NE	NE	NE
	PR13-00.502	H00/8208	+ (~100%)	NE	-	NE
	PR15-00.426	H00/8415	+++ (~100%)	NE	-	NE
	PR16-01.017	H01/0241	+ (~100%)	NE	+ (~5%)	NE
	PR19-01.182	H01/1355	+ (~100%)	NE	++ (<5%)	NE
	PR20-01.146	H01/1350	+ (~20%)	NE	-	NE
	PR22-01.186	H01/1348	++ (~100%)	NE	+ (<5%)	NE
	PR23-01.174	H01/1923 #	NE	NE	NE	NE
	PR25-01.206	H01/2150 #	NE	NE	NE	NE
	PR26-01.207	H01/2371 #	NE	NE	NE	NE
	PR27-01.203	H01/2373 #	NE	NE	NE	NE
	PR28-01.234	H01/2814	+ (~50%)	NE	++ (<5%)	NE
	PR29-01.231	H01/2807	+ (~50%)	NE	-	NE
	PR31-01.233	H01/2810	NE	NE	-	NE
	PR32-01.232	H01/3017	+ (~80%)	NE	+ (<5%)	NE
Bem-Diferenciados (Gleason 2-4)	PR03-00.335	H00/7169	+++ (~100%)	NE	++ (~80%)	NE
	PR18-01.103	H01/0245 #	NE	NE	NE	NE
	PR24-01.177	H01/1915 #	NE	NE	NE	NE
Moderadamente Diferenciados (Gleason 4-7)	PR01-00.333	H00/7184	+++ (~100%)	+++ (~100%)	+ (~10%)	+ (~40%)
	PR07-00.354	H00/7565 D	+++ (~100%)	-	NE	NE
		H00/7565 E	+++ (~100%)	NE	-	NE
	PR08-00.374	H00/7783 D	+ (~100%)	NE	++ (~40%)	NE
		H00/7783 E	+ (~10%)	+ (~50%)	NE	NE
	PR10-00.376	H00/7781	++ (~50%)	+ (~10%)	-	-
	PR14-00.425	H00/8409 D	++ (~100%)	-	+ (<20%)	-
		H00/8409 E	+ (~100%)	NE	+ (<5%)	NE
	PR17-01.101	H01/0243 *	NE	++ (<10%)	NE	NE
	PR21-01.181	H01/1359 D *	++ (~100%)	NE	NE	NE
		H01/1359 E *	+++ (~100%)	-	NE	NE
	PR30-01.235	H01/2819 D	+ (~100%)	-	-	-
		H01/2819 E	+ (~100%)	-	-	-
PR33-01.240	H01/3186 D	NE	+ (~40%)	-	-	
	H01/3186 E	+ (~50%)	NE	-	-	

Tabela VII-2: Lista de doentes por grupos de diferenciação histológica do tumor, com os resultados da imunohistoquímica, para os anticorpos NCL-B2Mp e HC10.

(NE = não efectuado, por falta de material; - = ausência de marcação; graus de intensidade da marcação: + a +++)

Entre parêntesis está a percentagem de células marcadas, determinada empiricamente.