

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ANÁLISE MOLECULAR DE POLIMORFISMOS E
EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR $\beta 1$ DE
TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO (TGF- $\beta 1$)
NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

**Paula Cristina Batista de Faria
Orientador: Luiz Ricardo Goulart**

SISBI/UFU



1000220656

**UBERLÂNDIA – MG
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

MDN
636.65-006.6
F224 a
TES/MEM

**ANÁLISE MOLECULAR DE POLIMORFISMOS E
EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR $\beta 1$ DE
TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO (TGF- $\beta 1$)
NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

**Aluna: Paula Cristina Batista de Faria
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia para obtenção do
Título de Mestre em Genética e Bioquímica
(Área Genética)

**UBERLÂNDIA - MG
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ANÁLISE MOLECULAR DE POLIMORFISMOS E
EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR $\beta 1$ DE
TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO (TGF- $\beta 1$) NO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

Paula Cristina Batista de Faria

COMISSÃO EXAMINADORA

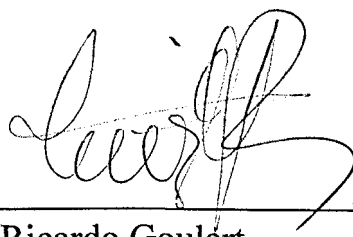
Examinadores: Dr. Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

Dr. Flávio Henrique da Silva

Data da Defesa: 19/04/2005

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas.



Dr. Luiz Ricardo Goulart

Uberlândia, 19 / 04 / 2005

Dedico essa conquista...

... aos meus pais, Londim e Neusa, dos quais me orgulho imensamente de ser filha; pelo amor incondicional que me impulsiona nos momentos mais difíceis, pelo incentivo, por me ensinarem a viver com dignidade e lutar pelos meus objetivos, pela dedicação e pela confiança... Meus exemplos de vida... Meus eternos Mestres!

... aos meus irmãos Dedé, Jú, Márcio e Delei, e aos meus afilhadinhos Rafa e Matheus, que dão um brilho todo especial a mais essa vitória; pelo carinho e pela torcida.

... ao meu namorado Cris, que foi muito mais que um companheiro... que confiou em mim, que me apoiou em todos os momentos, que me respeitou, que me ouviu, que vibrou comigo, que lutou comigo...que com muito amor me ajudou a chegar até aqui!

Agradecimentos

Primeiramente ao meu bom Deus, que com Sua infinita misericórdia me agraciou com mais essa vitória.

Ao meu orientador Luiz Ricardo Goulart, que mais uma vez confiou em mim e no meu trabalho, dando-me mais essa oportunidade de crescer como pessoa e profissional.

Ao Professor Zenon Silva pelo incentivo, pelo apoio e também pela amizade de sempre.

Aos meus amigos e familiares que sempre me acompanham e torcem pelo meu sucesso.

Às minhas companheiras de república que são a minha segunda família: Hidiovana, Cristiany, Preta e Márcia, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, até mesmo naqueles mais complicados, apoiando-me e ajudando-me a seguir em frente.

Aos meus colegas de laboratório, pela grande ajuda, tanto profissional quanto pessoal, que foi indispensável para a realização desse trabalho. As dificuldades, que não foram poucas, só foram contornadas devido ao apoio cada um de vocês. Um reagente emprestado, um horário cedido, uma palavra de incentivo nos piores momentos... serei eternamente grata a TODOS vocês: Juliana Franco, Paula Souza, Fausto, Guilherme, Fabiana, Andréia, Carlos, Rone, Ana Paula, Renata, Letícia, Luciana, Rafael, Thiago, Alexandra, Mércia.

Às minhas companheiras do Grupo CaP, por toda a contribuição e atenção dispensadas a mim e ao meu trabalho: Adriana, Thaíse, Isabela, Elisângela, Ana Paula, Carolina, Weruska. Em especial agradeço imensamente a duas pessoas que foram muito mais que colegas de grupo: Karla e Kaline. Jamais esquecerei da força que vocês me deram quando eu mais precisei. Saibam que eu me sinto uma pessoa muito privilegiada por tê-las como amigas. Qualquer palavra seria ínfima para expressar o quão grata sou a vocês...

Aos amigos dos outros laboratórios, cuja ajuda foi também indispensável.

A todos os funcionários do INGEB/UFU, que forneceram os meios necessários para que a realização desse trabalho fosse possível.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que eu concluísse mais essa etapa com sucesso.

Muito Obrigada!!!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
 INTRODUÇÃO GERAL	
RESUMO GERAL.....	2
1- A GLÂNDULA PROSTÁTICA.....	3
1.1 - Características da Glândula.....	3
1.2 - Mecanismos Gerais de Regulação da Próstata	5
1.3 - Anomalias Relacionadas à Próstata.....	5
1.4 - Aspectos Epidemiológicos do Câncer de Próstata.....	9
1.5 - Fatores de Risco.....	10
2 - A BIOLOGIA MOLECULAR NO ESTUDO DO CÂNCER.....	12
2.1 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	14
2.2 – <i>Amplification Refractory Mutation System</i> (PCR-ARMS).....	15
2.3 – Transcrição Reversa (RT).....	16
2.4 – RT PCR Semi-quantitativa.....	16
3 - FATORES β DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO.....	18
3.1 - Os Ligantes TGF- β s.....	18
3.2 - Os Receptores TGF- β s.....	19
3.3 - A sinalização Intracelular e as Proteínas Smads.....	21
3.4 - Aspectos Intranucleares da Sinalização.....	22
4 – TGF-β1 E O CÂNCER.....	23
4.1 – O duplo papel do TGF- β 1 na tumorigênese.....	24
REFERÊNCIAS GERAIS.....	27
 CAPÍTULO ÚNICO: ANÁLISE MOLECULAR DE POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR β1 DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO NO CÂNCER DE PRÓSTATA	
ABSTRACT.....	52
RESUMO.....	53

1 - INTRODUÇÃO.....	55
2- PACIENTES E MÉTODOS.....	56
2.1 - Obtenção e Estocagem do Material Biológico.....	57
2.2 - Extração de DNA.....	57
2.3 - Extração de RNA.....	58
2.4 - PCR-ARMS (<i>Amplification Refractory Mutation System</i>).....	58
2.5 - RT (Transcrição Reversa).....	59
2.6 - PCR Multiplex Semi-Quantitativa.....	60
2.7 - Análise por Densitometria Óptica.....	61
2.8 - Análises Estatísticas.....	62
3 - RESULTADOS.....	63
4 - DISCUSSÃO	69
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
<i>Anexo I</i> - Documento do Comitê de Ética em Pesquisa.....	82
<i>Anexo II</i> - Termo de Consentimento.....	83
<i>Anexo III</i> - Protocolo para Extração de DNA de Sangue Periférico.....	84
<i>Anexo IV</i> - Protocolo para Extração de RNA Total de Sangue Periférico.....	85
<i>Anexo V</i> - Estadiamento dos Adenocarcinomas da Próstata: Classificação de Whitmore-Jewett e TNM.....	87
<i>Anexo VI</i> – Sistema de Gradação Histológica de Gleason.....	88

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURAS

FIGURA 1 : Localização da glândula prostática.....	2
FIGURA 2 : Divisão anatômica da glândula prostática.....	3

CAPÍTULO

FIGURAS

FIGURA 1 : Genotipagem de 4 pacientes por PCR-ARMS.....	63
FIGURA 2 : Distribuição dos pacientes quanto aos valores da gradação histológica de Gleason em função dos respectivos genótipos para o Códon 10.....	64
FIGURA 3 : Teste de RT-PCR-multiplex para os genes β -2-microglobulina e <i>TGFB1</i>	65
FIGURA 4 : Otimização do número de ciclos da RT-PCR semi-quantitativa para o gene <i>TGFB1</i>	66
FIGURA 5 : RT-PCR multiplex semi-quantitativa pra o gene TGF- β 1 em amostras de sangue periférico.....	67
FIGURA 6 : Gráfico da abundância relativa para o gene TGF- β 1 nos grupos de pacientes com câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.....	68

TABELAS

TABELA 1 : Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na genotipagem por PCR-ARMS.....	57
TABELA 2 : Freqüências alélicas e genotípicas dos polimorfismos Leu10Pro e Arg25Pro, observadas nos grupos de pacientes com CaP e HPB.....	64
TABELA 3 : Probabilidade de associações obtidas pelo teste do χ^2	65

TABELA 4: Análise estatística descritiva dos parâmetros clínicos analisados e da concentração realtiva do RNAm do gene <i>TGFB1</i>	68
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIP	atrofia inflamatória da próstata
ALK	ativina semelhante à quinase
AR	receptor de andrógeno
ARMS	<i>Amplification Refractory Mutation System</i>
BMP	proteína morfogenética óssea
°C	graus Celcius
CaP	câncer de próstata
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DEPC	dietilpirocarbonato
DHT	diidrotestoterona
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
EGF	fator de crescimento epidermal
EMT	transdiferenciação epitelial/ mesenquimal
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
g	grama (s)
hGK1	calicreína glandular humana 1
HPB	hiperplasia prostática benigna
IOD	densidade óptica integrada
kDA	quilo Dalton
LOH	perda de heterozigozidade
M	molar
Mad	<i>Drosophila mother-against-dpp</i>
min	minuto (s)
ml	mililitro (s)
mg	miligrama (s)
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mM	milimolar
MMLV-RT	<i>Murine Maloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
NaCl	cloreto de sódio
NIP	neoplasia intraepitelial prostática
NK	<i>Natural Killers</i>

NLSs	sinais de localização nuclear
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
pmoles	picomoles
PSA	antígeno prostático específico
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RNAse	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
RT	transcrição reversa
RTU	ressecção transuretral
s	segundos
SARA	âncora Smad para ativação do receptor
SBEs	elementos específicos de ligação à Smad
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA polimerase)
TBE	tampão Tris/ Borato/ EDTA
TGF α	fator α de transformação do crescimento
TGF β	fator β de transformação do crescimento
TNM	<i>tumor-node-metastasis</i> (tumor-linfonodos-metástase)
U	unidades
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
μ g	micrograma (s)
μ l	microlitro (s)
μ m	micromolar (es)
UV	ultravioleta
USTR	ultra sonografia transretal

INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO GERAL

Nas últimas décadas, o câncer de próstata tem emergido como uma das doenças mais comuns entre os homens idosos. No Brasil e nos Estados Unidos é o segundo mais comumente diagnosticado após o câncer de pele não melanoma. Outrossim, é a segunda causa de morte em homens depois do câncer de pulmão. Dentre as citocinas que compõem a família dos Fatores β de Transformação do Crescimento (TGF- β s), o TGF- β 1 é mais freqüentemente superexpresso em células tumorais e desempenha um papel central na transformação e progressão tumoral, tanto quanto na repressão do tumor; sendo o foco principal da maioria dos estudos sobre o papel dos fatores de crescimento na tumorigênese. Vários estudos têm demonstrado que mutações somáticas no TGF- β 1 e em outros componentes da sua via de sinalização, também estão associadas ao desenvolvimento de tumores. No presente estudo foi avaliada a expressão gênica do TGF- β 1 em amostras de sangue periférico de pacientes com adenocarcinoma da próstata (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB), por meio da técnica de RT-PCR semi-quantitativa, correlacionando-a ao quadro clínico dos pacientes, estadiamento da doença e, também, à presença dos polimorfismos Leu10Pro (alelos T e C) e Arg25Pro (alelos G e C), presentes no éxon 1 do gene *TGFB1*. A técnica utilizada para a genotipagem dos pacientes foi a PCR-ARMS, mostrando-se bastante eficiente para tal. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos e os grupos de pacientes analisados, porém, a presença do alelo C no Códon 10 pode estar envolvida na progressão do câncer uma vez instalado, pois foi observada uma tendência entre os pacientes com CaP e portadores desse alelo em apresentar um escore de Gleason mais elevado. Encontramos também um maior nível de transcritos do gene *TGFB1* em pacientes com CaP, sugerindo que este pode ser um potencial biomarcador sérico para o câncer de próstata. Contudo, estudos subseqüentes se fazem necessários para uma melhor compreensão do papel dessa citocina no desenvolvimento e progressão dessa doença.

1 – A GLÂNDULA PROSTÁTICA

1.1 – Características da Glândula

A próstata, medindo cerca de 3 cm de comprimento, é a maior glândula acessória do sistema genital masculino. A parte glandular compreende, aproximadamente, dois terços da próstata; o outro terço é fibromuscular (MOORE; DALLEY, 2001). Está localizada imediatamente abaixo da bexiga urinária onde envolve a porção inicial da uretra (FIGURA 1) (SMITH, 1979; VAN DE GRAAFF, 2003).

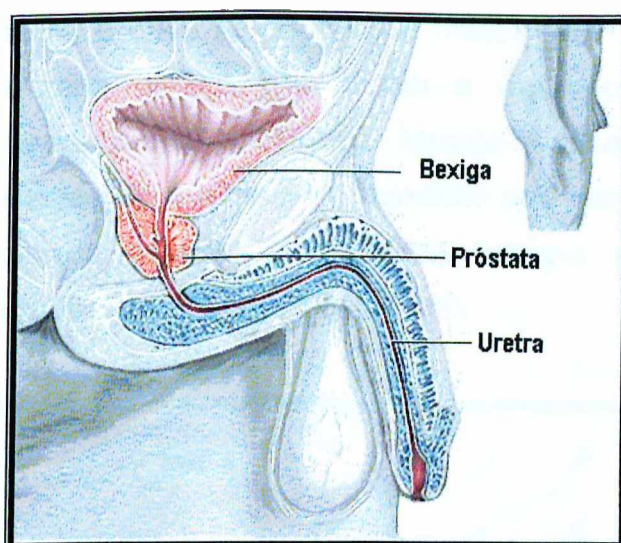


FIGURA 1: Localização da glândula prostática.

A próstata é composta por ácinos e um complexo sistema de ductos ramificados, cujos produtos de excreção são lançados dentro da uretra prostática (ROHR, BARTHSCH, 1980). Os ácinos e ductos prostáticos, exceto nos segmentos periuretrais imediatos, são revestidos por uma dupla população de células, representada por uma camada interna colunar secretora e uma camada externa formada por células basais (ALMEIDA, 2003).

A fina secreção prostática, leitosa, ajuda na mobilidade dos espermatozoides como agente de liquefação, e sua alcalinidade protege o esperma em sua passagem pelo meio ácido da vagina. A descarga prostática ocupa, aproximadamente, 20% do volume do sêmen (VAN DE GRAAFF, 2003).

Ramos viscerais das artérias retais média e inferior suprem a próstata com sangue. O retorno venoso forma o plexo venoso prostático, juntamente com o sangue que drena o pênis. O plexo prostático drena nas veias ilíacas internas. A próstata tem inervação simpática e parassimpática originária do plexo pélvico (VAN DE GRAAFF, 2003).

McNeal (1968, 1980, 1981, 1988) propôs uma organização anatômica da próstata, amplamente aceita nos dias atuais, dividindo-a em zonas que representam características morfológicas, funcionais e patológicas da glândula: o estroma fibromuscular anterior, que é constituído basicamente de musculatura lisa, correspondendo a 30% do volume total da próstata; a zona periférica, que é a maior das subdivisões anatômicas, contendo três quartos de todo o tecido glandular e onde se encontra a maioria dos casos de câncer de próstata (CaP); a zona central, que detém a maior parte das glândulas remanescentes; o tecido pré-prostático, que impede o refluxo do sêmen para a bexiga durante a ejaculação e a zona de transição que circunda a uretra e é o local de ocorrência da hiperplasia prostática benigna (HPB) (FIGURA 2) (COFFEY, 1992; WALSH; WORTHINGTON, 1998).

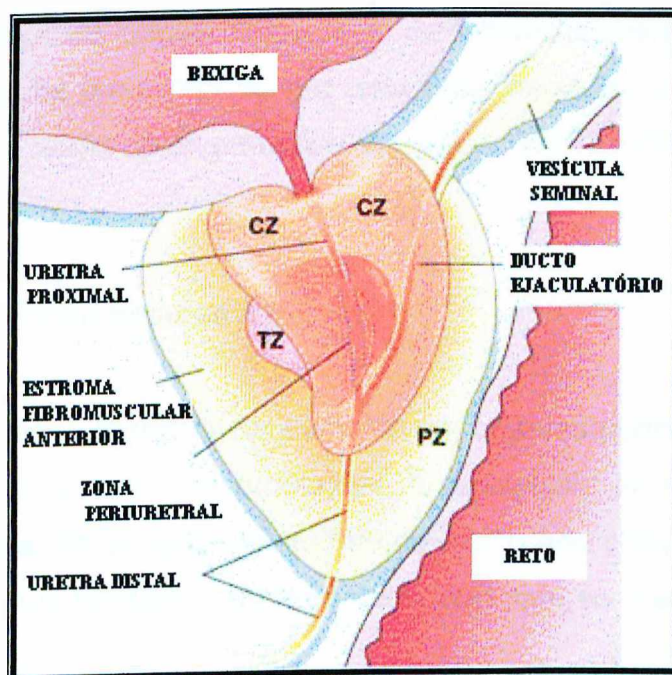


FIGURA 2: Divisão anatômica da glândula prostática, onde: CZ (zona central), PZ (zona periférica), TZ (zona de transição)

1.2 – Mecanismos Gerais de Regulação da Próstata

A próstata é regulada, principalmente, por hormônios sexuais chamados andrógenos, que provêm dos testículos, sendo a testosterona o mais importante deles. Após ser liberada pelos testículos, a testosterona circula pelo sangue, entra nas células prostáticas por difusão e é transformada, no citoplasma, em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5-alfa-redutase. A DHT se liga a seu receptor específico e é transportada ao núcleo celular, onde participa da transcrição de genes responsáveis pelo crescimento da glândula (COFFEY, 1992; WALSH; WORTHINGTON, 1998).

A homeostase da glândula prostática é mantida pelo balanço entre as ações dos fatores que estimulam e dos que restringem o crescimento, e a falta de controle entre esses mecanismos pode resultar em instabilidade genética com alterações nos processos que regulam o crescimento (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

Os fatores extrínsecos, como os hormônios esteróides, modulam a produção e ação de fatores intrínsecos, como os fatores de crescimento. Estes podem agir favorecendo ou inibindo a proliferação celular por efeitos parácrinos nos diferentes tipos de células adjacentes, de forma autócrina agindo no mesmo tipo celular onde foi produzido ou por uma ação intrácrina intracelular, atuando dentro da mesma célula de origem (WALSH, 1992; GRIFFITHS; MORTON, 1999).

1.3 – Anomalias Relacionadas à Próstata

Algumas doenças clinicamente importantes podem afetar a próstata nos homens adultos, como as prostatites, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata. Estas apresentam grande significado clínico, não só por suas conseqüências, mas também pela freqüência com que se manifestam (SRONGI; CURY, 1998).

As prostatites abrangem quatro categorias de doenças que afligem a próstata: tipo 1) Prostatite bacteriana aguda: quadros infecciosos de instalação abrupta causados por bactérias intestinais, identificadas no exame de urina, que

respondem eficientemente ao tratamento com antibióticos; tipo II) Prostatite bacteriana crônica: quadros infecciosos insidiosos e recorrentes, causados por bactérias intestinais que são isoladas no esperma, raramente na urina. As manifestações clínicas são menos dramáticas que nos casos agudos e respondem de forma completa ou parcial ao tratamento com antibióticos; tipo III) Prostatite abacteriana: quadros que se manifestam com dor ou com sintomas urinários, nos quais não são encontradas bactérias na urina ou no esperma; tipo IV) Prostatite assintomática: quadros de inflamação da próstata, sem manifestações clínicas, que são descobertos porque os níveis do antígeno prostático específico (PSA) elevam-se no sangue, na ausência do câncer (SROUGI, 2003).

O aumento prostático, conhecido como Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), é uma das principais doenças urológicas; atinge grande parcela dos homens, podendo acometer até 90% daqueles com idade superior a 80 anos (DAMIÃO; CARRERETE, 2003). Corresponde a um aumento do volume da próstata, resultante do crescimento das glândulas periuretrais e não de uma simples hipertrofia (aumento do número de células) (LAPIDES, 1979; WALSH; WORTHINGTON, 1998). O aumento da idade e a presença de testículos funcionantes representam os determinantes mais importantes para o desenvolvimento da HPB. Além disso, outros fatores como, por exemplo, raça, obesidade, tabagismo, cirrose hepática, atividade sexual e hereditariedade têm sido implicados com a doença (CURY; NARDOZZA-JUNIOR, 2003). Como consequência do crescimento prostático, ocorre um bloqueio do canal uretral, causando no paciente certos transtornos urinários, sob a forma de enfraquecimento progressivo do jato urinário, gotejamento de urina após cada micção e aumento do número de micções, principalmente durante a noite. Felizmente, a maioria dos homens com HPB apresentam manifestações discretas que são bem toleradas, entre 25% e 40% apresentam queixas persistentes que exigem algum tratamento e em apenas 10% torna-se necessária uma intervenção cirúrgica (SROUGI, 2003).

O câncer de próstata (CaP), como várias outras formas de câncer, é uma doença multi-focal e multi-casual, correspondendo a uma alteração no balanço entre a proliferação e a morte celular. Durante os estágios iniciais do surgimento

do câncer, as células respondem aos mesmos fatores regulatórios (hormônio-dependente), embora as taxas de proliferação celular sejam maiores do que as de morte celular. A disfunção no processo regulatório, associada a mutações genéticas, reflete graus de respostas anormais dos fatores de crescimento, gerando um processo que leva à formação de clones autônomos de células malignas, com crescimento promovido por via autócrina que passa a não responder ao controle androgênico (hormônio-independente) (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

Mais de 95% das neoplasias da próstata são representadas pelos adenocarcinomas e o restante compreende casos de sarcoma, carcinoma epidermóide e carcinoma de células transicionais. Os adenocarcinomas localizam-se na zona periférica da glândula prostática em cerca de 75% dos casos, na zona transicional em aproximadamente 25% dos pacientes e na zona central em menos de 5% dos casos (STAMEY; McNEAL, 1992; SROUGI, 1998; BOSTWICK, 1999; JARMULOWICZ, 1999).

Na zona de transição desenvolvem-se cânceres de maior potencial maligno do que aqueles que surgem na zona periférica (BOSTWICK, 1999). A organização anatômica da glândula inclui um tecido fibromuscular entre a zona central e a zona periférica, que de certo modo limita a expansão de carcinomas da zona de transição para os feixes neurovasculares e ductos ejaculatórios, as duas maiores rotas para a expansão extraglandular (BOSTWICK, 1999; JARMULOWICZ, 1999).

Tem sido sugerido que a atrofia inflamatória da próstata (AIP) e a neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de alto grau sejam precursores para muitos carcinomas prostáticos, por serem altamente freqüentes nas próstatas com adenocarcinoma e por apresentarem alterações genéticas em comum. Por essas e outras características, a NIP tem sido hipotetizada como uma doença precursora do CaP, entretanto, nenhuma evidência convincente tem mostrado ser a AIP um precursor para a NIP de alto grau e/ou carcinogênese (BOSTWICK, 1999; JARMULOWICZ, 1999; DE MARZO et al., 2001).

Os pacientes com câncer de próstata apresentam sintomas semelhantes aos da HPB (dificuldade de urinar, micção freqüente ou urgente, fluxo interrompido ou fraco, hesitação, gotejamento), além de sangue na urina ou

no sêmen, forte dor nas costas, na pelve, nos quadris ou nas coxas, ereções menos firmes ou impotência e, também, diminuição da quantidade de fluido seminal ejaculado (WALSH, 1992; SROUGI; CURY, 1998; WALSH; WORTHINGTON, 1998).

O antígeno prostático específico, uma glicoproteína de peso molecular de 34 KDa que pertence à família das calicreínas, é secretado no fluido prostático (COFFEEY, 1993) e elevações nos níveis séricos desse marcador são amplamente utilizadas para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com CaP (MIKOLAJCZYK et al., 2004). Todavia, o PSA, apesar de indicar alterações na próstata, possui baixo valor preditivo, vez que não é um marcador apenas para o câncer, podendo seus níveis apresentarem-se elevados em prostatites e HPB (DILLIOGLUGIL et al., 1997; CATALONA; SMITH, 1998; RIFFENBURGH; AMLING, 2003; MIKOLAJCZYK et al., 2004).

Além da dosagem do PSA, compõem ainda o rastreamento das anomalias prostáticas mais duas etapas: o exame físico da próstata (toque retal) e a ultra-sonografia transretal da próstata (USTR). A biópsia é recomendada para todo paciente com toque retal duvidoso, independentemente do valor do PSA, pois 25% dos homens com CaP apresentam níveis de PSA abaixo do suspeito (ARAGÃO, 2003).

A evolução dos pacientes com adenocarcinoma da próstata está intimamente relacionada com a extensão da neoplasia e, por isso, Whitmore, em 1956, introduziu um sistema de estadiamento com a finalidade de caracterizar a extensão do tumor. Esta classificação dividia os tumores em 4 grupos: A, B, C e D e foi, posteriormente, modificada por Jewett, com a introdução de subgrupos A₁ e A₂, B₁ e B₂, C₁ e C₂, D₁ e D₂. Mais recentemente, a União Internacional Contra o Câncer (UICC) propôs a utilização do Sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) em adenocarcinoma da próstata, de modo a padronizar a classificação dos pacientes com a doença e permitir estudos comparativos mais precisos (STAMEY; McNEAL, 1992, SROUGI, 1998).

O sistema de graduação histológico mais utilizado é o proposto por Gleason (1996), que valoriza, principalmente, o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático. Nesse sistema, os tumores são classificados em 5 graus, denominando-se grau 1 as lesões mais diferenciadas e grau 5 as

mais indiferenciadas. Como os adenocarcinomas da próstata apresentam mais de um padrão histológico, o diagnóstico final na escala de Gleason é dado pela soma dos graus do padrão primário (predominante) e do padrão secundário (segunda maior área representada) (STAMEY; McNEAL, 1992; ISAACS, 1997; SROUGI, 1998).

1.4 – Aspectos Epidemiológicos do Câncer de Próstata

Nas últimas décadas, o câncer de próstata tem emergido como uma das doenças mais comuns entre os homens idosos. No Brasil e nos Estados Unidos é o segundo mais comumente diagnosticado após o câncer de pele não melanoma (GRIFFITHS; MORTON, 1999; CHANG et al., 2001; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, INCA, 2004). Outrossim, é a segunda causa de morte em homens (COFFEY, 1993; ALBRIGHT; EELES, 1995; GIMBA; BARCINSKI, 2003) depois do câncer de pulmão (GRIFFITHS; MORTON, 1999; WEIR et al., 2003).

O sudeste do Brasil apresenta a maior incidência desse tipo de tumor, sendo que em Minas Gerais ele ocupa o segundo lugar em casos diagnosticados e o terceiro em número de óbitos (INCA, 2004).

A incidência do câncer de próstata aumenta com a idade, mais do que em diversos outros tipos de cânceres (COFFEY, 1993; ISAACS, 1997; CHAN et al., 1998; INCA 2004). Enquanto sua incidência para homens entre 45 e 49 anos de idade é de sete novos casos /100 mil homens /ano, para aqueles com mais de 80 anos, o número é de 1200/ 100 mil homens/ ano (BENDHACK; SOBREIRO, 2003).

O número de óbitos por CaP na Alemanha é de 9 mil /ano (para uma população de 80 milhões de habitantes). Este número aumentou 16% se comparado com a mortalidade pela mesma doença, em 1976. No Brasil, este número, atualmente, é de 8.200 /ano. Devido à não notificação compulsória em nosso país, este pode ser subestimado e o número real seria aproximadamente de 18 mil óbitos /ano. Impende ressaltar que apenas um terço dos homens com

CaP morre especificamente devido ao seu tumor (BENDHACK; SOBREIRO, 2003).

A incidência varia de acordo com a raça e localização geográfica. Os países escandinavos e o Canadá apresentam a maior incidência mundial do câncer de próstata, ao passo que nos países orientais a frequência é até 25 vezes menor (a incidência na China é de 0,8 / 100 mil e nos EUA é de 100 / 100 mil) (HERING, 2003).

Segundo as estatísticas americanas, a incidência em negros é maior que em brancos (proporção 2:1). De acordo com Thomas e colaboradores (2002 apud HERING, 2003, p. 423), quanto à incidência de CaP em homens mais jovens, os negros têm 60% mais que os homens brancos. Esse tipo de câncer manifesta-se também de forma mais agressiva em negros, cuja chance de morrer pelo mal é o dobro da observada em brancos (SROUGI, 1998).

1.5 – Fatores de Risco

O câncer de próstata é uma doença multifatorial, com componentes genéticos e ambientais envolvidos em sua etiologia (NWOSU et al., 2001). Dentre os fatores de risco mais amplamente associados ao CaP estão a idade, a etnia e a história familiar da doença (PIENTA; ESPER, 1993; ALLEN et al., 2004). No entanto, um grande progresso tem sido observado no que concerne às descobertas que relacionam fatores nutricionais e hormonais ao câncer de próstata (CHAN et al., 1998).

A idade é um forte fator de risco para o CaP. Sabe-se que homens americanos com idade entre 75-79 anos têm cerca de 130 vezes mais risco de desenvolver a doença do que os homens com idade entre 45-49 anos (CHAN et al., 1998). Numerosas alterações genéticas têm sido demonstradas em tecidos com câncer prostático, sugerindo que danos cumulativos no DNA com a idade, podem parcialmente explicar essa tendência (CHAN et al., 1998).

A raça também é um fator de risco bem estabelecido para a incidência e mortalidade desse tipo de câncer. Afro-americanos apresentam um

risco 60% maior de desenvolver o CaP e uma mortalidade duas vezes maior que a população caucasiana da mesma idade (MACHADO; CINTRA, 2003).

Países como o Japão e a China apresentam as menores taxas de incidência de câncer de próstata (GIOVANNUCCI, 1995). Já quando a incidência é estudada em populações de imigrantes que normalmente não apresentariam uma incidência significativa do problema, observa-se um aumento substancial no número de casos, favorecendo, talvez, o maior argumento a favor do papel das influências do ambiente na manifestação da doença (MACHADO; CINTRA, 2003).

Allen e colaboradores (2004) sugerem que a "ocidentalização", ou seja, a adoção do estilo de vida ocidental, principalmente no que se refere a uma dieta rica em gordura saturada proveniente da carne animal, pode ser um fator importante no desenvolvimento do câncer de próstata. Com efeito contrário, um trio de substâncias antioxidantes tem sido correlacionado à diminuição dos riscos: selênio, vitamina E e licopeno (MACHADO; CINTRA, 2003).

Homens que têm parentes em primeiro grau (pai, irmão ou filho) com câncer de próstata apresentam um risco de desenvolvê-lo três vezes maior. O risco ainda aumenta se a idade de aparecimento da doença for precoce e se o acometimento familiar for múltiplo (CARTER et al., 1992; MACHADO; CINTRA, 2003). A penetrância dos genes do câncer de próstata familiar não é conhecida, mas é possível que eles se relacionem em apenas 10% dos casos (MACHADO; CINTRA, 2003).

Estudos também têm relacionado questões sociais ao desenvolvimento do câncer de próstata. Steenland e colaboradores (2004) correlacionaram o nível educacional de parte da população de 21 estados norte-americanos à incidência e mortalidade do CaP e concluíram que um nível de escolaridade mais elevado está diretamente associado a uma incidência aumentada de tumores localizados, em parte devido ao maior uso do monitoramento feito por meio da dosagem do PSA. A mortalidade é duas vezes maior entre os indivíduos com menor nível de escolaridade.

2 - A BIOLOGIA MOLECULAR NO ESTUDO DO CÂNCER

O câncer é uma doença originada por aberrações genéticas que inativam genes supressores de tumor e ativam proto-oncogenes (PORKKA; VISAKORPI, 2004). Essas alterações desorganizam a homeostase tissular, ou por aumento desgovernado da divisão celular, ou pela diminuição da apoptose, causando o aparecimento dos tumores (GATTAS, 2003). A maioria das mutações é adquirida ao longo do desenvolvimento do tumor, sendo assim consideradas mecanismos da tumorigênese. Contudo, algumas podem ser herdadas, resultando em predisposição ao câncer (PORKKA; VISAKORPI, 2004).

Por muito tempo atribuiu-se a origem do tumor prostático como determinada apenas pela estimulação hormonal da testosterona, porém, atualmente se sabe que o desenvolvimento tumoral é também regido geneticamente, sendo em 10% dos casos por transmissão hereditária e os demais por alterações genéticas esporádicas (GATTÁS, 2003).

O aparecimento do CaP esporádico, como a maioria dos tumores sólidos, surge do acúmulo de alterações genéticas ocorridas ao longo da vida, que podem afetar a expressão de genes reguladores do equilíbrio celular dos tecidos, predispondo ao aparecimento de neoplasias (GATTÁS, 2003).

Muitos esforços têm sido destinados ao melhor entendimento dos complexos mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese e progressão do CaP (GIMBA; BARCINSKI, 2003). Os métodos que têm sido usados para caracterizar as aberrações genéticas encontradas nessa doença neoplásica incluem estudos familiares designados a mapear loci hereditários, estudos cromossomais para a identificação de anomalias que possam localizar oncogenes ou supressores de tumor e intensos estudos de expressão gênica (LI; NELSON, 2001; KARAN et al., 2003).

Esses estudos elucidam muitas vias de sinalização celulares que podem influenciar no processo da carcinogênese. O uso dos avanços biotecnológicos, como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR), o sequenciamento automatizado do DNA, os *microarrays* e diversas outras técnicas, permitem um estudo sistematizado e detalhado da biologia e patologia do CaP (GIMBA; BARCINSKI, 2003).

A busca extensiva por novos marcadores moleculares para o diagnóstico e monitoramento do câncer de próstata também se deve ao fato de que o uso do PSA, marcador sérico mais amplamente utilizado para tal, vem apresentando limitações (STAMEY et al., 2004; MIKOLAJCZYK et al., 2004), gerando, em muitos casos, resultados falsos negativos e falsos positivos (GIMBA; BARCINSKI, 2003). Como marcador pós-cirúrgico, no entanto, o uso do PSA é de grande importância, sendo seu nível sérico diretamente relacionado à progressão e/ou regressão do CaP, embora não possa prever o potencial metastático do tumor (GIMBA; BARCINSKI, 2003; STAMEY et al., 2004).

Vários polimorfismos têm sido identificados, alguns dos quais estão associados a um elevado risco para o CaP (PORKKA; VISAKORPI, 2004). A seguir serão apresentadas algumas das alterações genéticas já descritas e que comprovadamente exercem importantes papéis na carcinogênese prostática.

Diversas análises têm identificado prováveis genes de susceptibilidade ao câncer de próstata em determinados loci cromossômicos, tais como: 1p36 (*CABP*) (GIBBS et al., 1999), 1q24-q25 (*HPC1*) (SMITH et al., 1996), 1q42.4-q43 (*PCAP*) (BERTHON et al., 1998), 8p22-23 (XU et al., 2001), 16q23 (SUAREZ et al., 2000), 17p12-p13 (TAVTIGIAN et al., 2001), 19q13 (WITTE et al., 2000), 20q13 (*HPC20*) (BERRY et al., 2000) e Xq27 (XU et al., 1998).

Alterações genéticas, como as repetições polimórficas e as mutações no gene do receptor de andrógenos (*AR*) e também as variantes do gene *SRD5A2* que codifica para a enzima 5 α -redutase tipo 2, estão associadas ao desenvolvimento e progressão do CaP (TSUKAMOTO et al., 1998; ZACCHEO et al., 1998; MAKRIDAKIS et al., 1999; CASELLA et al., 2001).

O gene supressor de tumor *PTEN* está localizado na região 10q23, região onde freqüentemente são detectadas deleções em tecido prostáticos tumorais por análises citogenéticas e sítios de perda de heterozigosidade LOH (DE MARZO et al., 2003).

De acordo com a maioria dos estudos, mutações no gene *TP53* (supressor de tumor mais freqüentemente mutado nos cânceres humanos) são raras em tumores prostáticos iniciais e localizados, porém, nos carcinomas avançados (metastáticos e/ou hormônio refratários) as mutações nesse gene

aparecem em cerca de 20-40% dos casos (VISA KORPI et al., 1992; BOOKSTEIN et al., 1993, NAVONE et al., 1993).

Uma diminuição na expressão do gene da E-caderina (*CDH1*), que é uma proteína relacionada à adesão celular localizado na posição 16q22, tem sido detectada especialmente em carcinomas prostáticos pouco diferenciados (UMBAS et al., 1992).

Estudos têm demonstrado uma expressão aumentada em diversos genes na neoplasia intraepitelial e no câncer de próstata comparado a tecidos normais e hiperplásicos, incluindo a colagenase tipo IV (enzima proteolítica que induz a fragmentação do estroma durante a invasão), da oncoproteína supressora da apoptose (*bcl-2*), do fator de crescimento epidermal (EGF), do fator α de transformação do crescimento (TGF- α) (BOSTWICK, 1999), do fator β 1 de transformação do crescimento (TGF- β 1) (STEINER et al., 1994; SHARIAT et al., 2004), do DD3 – RNA não codificante (BUSSEMAKERS et al. 1999) e da calicreína glandular humana (hGK-1) (SHINOHARA et al. 1994).

2.1 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (SAIKI et al., 1985; INNIS; MULLIS; FALOONA, 1987; GELFAND, 1990) e desde então revolucionou toda a genética.

A PCR é uma técnica poderosa que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) na presença da enzima DNA polimerase. Esta metodologia se baseia na hibridação e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que limitam a região alvo (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985).

Cada ciclo da PCR envolve 3 passos: desnaturação, hibridação e extensão. A fita dupla do DNA molde é inicialmente desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de hibridação, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e da seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização DNA – DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que “flanqueiam” a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada porção 3' terminal dos *primers*. Essa extensão envolve a adição de nucleotídeos, utilizando como molde a seqüência alvo, de modo que uma cópia desta seqüência seja produzida no processo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Vários ciclos repetidos permitem a amplificação do fragmento, cujo tamanho é limitado pelos *primers* (porção 5') (WHITE et al., 1989).

O passo decisivo para a expansão da técnica de PCR ocorreu quando Saiki e colaboradores (1988) isolaram uma DNA polimerase (Taq polimerase) da bactéria *Thermus aquaticus* que vive em fontes térmicas e polimerisa a 72°C, conseguindo manter a atividade por alguns minutos a 95°C (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985).

As condições iniciais para amplificação, tais como: concentrações de MgCl₂, Taq DNA polimerase e dos *primers*, além da temperatura de hibridação, devem ser definidas para cada par de *primers* a ser utilizado (PASSAGLIA; ZAHA, 1996).

2.2 – Amplification Refractory Mutation System (PCR-ARMS)

A PCR-ARMS é uma técnica inovadora, descrita por Newton e colaboradores em 1989, que permite a investigação de qualquer polimorfismo que seja uma mutação de ponto. O método consiste em duas reações de amplificação separadas e simultâneas, nas quais os *primers* ou iniciadores utilizados são alelo-específicos; sendo o nucleotídeo 3' terminal a única diferença entre eles.

O *primer* sintetizado para a forma “normal” do alelo é refratário à amplificação pela PCR no DNA molde contendo a mutação e, por sua vez, o *primer* sintetizado para o alelo “mutante” é refratário à PCR no DNA “normal” (NEWTON et al., 1989).

A PCR-ARMS tem sido utilizada com sucesso em vários trabalhos (USICHENKO et al., 1998; PERREY et al., 1999; ARKURIGHT et al., 2000; GEWALTIG et al., 2002; MONTANARO; ARCIOLA, 2002; WETTON et al., 2002), mostrando ser uma técnica simples, rápida, sensível e, principalmente, segura.

2.3 – Transcrição Reversa (RT)

Denomina-se transcrição reversa o processo pelo qual ocorre a síntese de moléculas de DNA complementar (cDNA), pela enzima transcriptase reversa, a partir de fitas simples de RNA. A primeira descrição dessa técnica ocorreu em 1987 (VERES et al., 1987), com a utilização da enzima dos retrovírus, a transcriptase reversa, para catalisar a síntese do cDNA.

Atualmente, é uma das técnicas mais utilizadas para a investigação da expressão gênica nos laboratórios de Biologia Molecular. A razão para tal é que outras técnicas para estudos de expressão, como o *northern blot*, ensaios de proteção com a enzima nuclease S1 ou hibridização *in situ* não apresentam a mesma sensibilidade da RT-PCR, que permite detectar a atividade de genes específicos em amostras pequenas de tecido ou em até uma única célula (REGITANO; COUTINHO, 2001).

2.4 – RT PCR Semi-quantitativa

O uso seqüencial da transcrição reversa e da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) tem permitido avanços nas pesquisas em biologia molecular, por apresentar uma alta sensibilidade e ser uma técnica rápida para o

estudo da expressão gênica (FAVRE et al., 1997; SANTAGATI et al., 1997; CHEN et al., 1999; PERNAS-ALONSO et al., 1999; SEAH; ROOK, 1999; DUMOULIN et al., 2000).

A RT-PCR semi-quantitativa, desenvolvida por Chelly e colaboradores (1988), é uma metodologia rápida e eficaz para estimar quantidades relativas da expressão gênica em populações de RNAs mensageiros, utilizando-se um gene constitutivo como controle interno da reação para normalizar os níveis de expressão do gene de interesse e, outrossim, para monitorar a extensão da degradação nas amostras de RNA, caracterizando a qualidade do mesmo (FAVRE et al., 1997; SANTAGATI et al., 1997; CHEN et al., 1999; PERNAS-ALONSO et al., 1999; SEAH; ROOK, 1999; DUMOULIN et al., 2000; REGITANO, COUTINHO, 2001).

A metodologia da PCR semi-quantitativa requer que sejam determinados previamente as condições de PCR (concentração de cDNA e número de ciclos) que garantem que os dados a serem obtidos estejam dentro da fase exponencial de amplificação de cada gene, pois ao atingir o platô, a eficiência da PCR diminui e as concentrações relativas dos produtos controle e de interesse começam a se igualar (FAVRE et al., 1997; SANTAGATI et al., 1997; CHEN et al., 1999; PERNAS-ALONSO et al., 1999; SEAH; ROOK, 1999; DUMOULIN et al., 2000; REGITANO, COUTINHO, 2001).

Genes constitutivos como a β_2 microglobulina, as actinas e o gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) têm sido utilizados como controles internos para prover resultados semi-quantitativos (SIEBERT; LARRICK, 1992; IGAZ et al., 1998).

A técnica de RT-PCR tem mostrado ser uma metodologia sensível para detecção de doença residual mínima em diversos tipos de células (GHOSSEIN et al., 1995).

3 – FATORES β DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO (TGF- β s)

3.1 – Os ligantes TGF- β s

Os Fatores β de Transformação do Crescimento (TGF- β s) compõem uma grande família de citocinas estruturalmente semelhantes, a qual também inclui as ativinas e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (MASSAGUE, 1998). Os membros da superfamília TGF- β regulam uma enorme quantidade de funções celulares, incluindo o controle da proliferação, diferenciação, migração, respostas imunes, angiogênese e apoptose em muitos tipos diferentes de células (THOMPSON et al., 1992; ROBERTS; SPORN, 1993; TRUONG et al., 1993).

Praticamente todas as células do organismo produzem tanto os TGF- β s quanto seus receptores cognatos (MASSAGUE, 1998). Existem três isoformas de TGF- β s: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (DERYNCK et al., 2001). Cada isoforma é codificada por um gene distinto e é expressa de maneira tecido-específica. As seqüências de aminoácidos das três isoformas têm cerca de 70 a 80% de identidade. O TGF- β 1 é expresso em células do tecido endotelial, hematopoiético e conectivo; o TGF- β 2 em células epiteliais e neuronais e o TGF- β 3 primariamente em células mesenquimais (MASSAGUE, 1998).

Os Fatores β de Transformação do Crescimento desempenham um importante papel na regulação do ciclo celular e têm a capacidade de interrompê-lo na fase G1 (MOSES et al., 1990), inibindo, conseqüentemente, o crescimento de vários tipos de epitélio (BLOBE et al., 2000; WIKSTROM et al., 2001). Porém, a ação completa dos TGF- β s é evidentemente complexa e depende de outros fatores, como o ambiente hormonal, a função dos receptores (PIEK et al., 1997) e suas interações com outros fatores de crescimento, tais como: EGF, FGF, PDGF e TGF α (MORTON; BARRACK, 1995; STORY et al., 1996; PEEHL; SELLERS, 1998;).

Numerosos estudos têm demonstrado que TGF- β s podem ser detectados em amostras de uma grande variedade de tipos tumorais. Em geral, tecidos tumorais parecem expressar maiores níveis de TGF- β que os correspondentes tecidos normais. A associação dos TGF- β s com o câncer é mais

forte nos estágios mais avançados da progressão tumoral, e a superexpressão tem um impacto negativo no prognóstico (REISS, 1999). A secreção aumentada de TGF- β enfraquece o sistema imune e pode exacerbar o fenótipo maligno das células tumorais, contribuindo para a invasão do tumor e metástase (PASCHE, 2001).

Na próstata humana, todas as 3 isoformas TGF- β s foram identificadas e estão implicadas em doenças prostáticas relacionadas à idade, como o câncer de próstata e a hiperplasia benigna (UNTERGASSER et al., 2003). A atuação regulatória autócrina e parácrina exercida pelos TGF- β s desempenha importante papel no crescimento e desenvolvimento prostático (BARRACK, 1997; LEE et al., 1999; WIKSTROM et al., 2000). As células tumorais freqüentemente perdem seus receptores TGF- β e adquirem resistência aos efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos da citocina (WIKSTROM et al., 2000). Na próstata normal, TGF- β 1 e β 3 são produzidos principalmente no compartimento de células basais (DJONOV et al., 1997; CARDILLO et al., 2000) e é sabido que eles induzem a diferenciação, inibem a proliferação celular epitelial (SUTKOWSKI et al., 1992; ROBSON et al., 1999) e promovem a apoptose de células degeneradas do lúmen (DANIELPOUR, 1999). Além disso, as células epiteliais secretam TGF- β 1 e β 2 em suas maiores concentrações no fluido seminal, fornecendo, assim, potentes fatores imunossupressivos para o sistema reprodutor feminino e protegendo o esperma contra imunorrespostas do organismo feminino (NOCERA; CHU, 1995).

3.2 – Os receptores TGF- β s

Cada molécula TGF- β é sintetizada como parte de uma grande molécula precursora, consistindo de uma região pró-peptídica (peptídeo sinal), além do TGF- β . Após a sua síntese, a maior parte é estocada na matriz extracelular como um complexo de alto peso molecular formado pelo TGF- β , o pró-peptídeo e uma proteína chamada Proteína Latente de Ligação ao TGF- β (LTBP). Existem quatro diferentes LTBPs, cada uma codificada por um gene distinto e expressas de forma tecido específica (SINHA et al., 1998). Esse

complexo latente é incapaz de ligar-se aos receptores TGF- β (MIYAZONO et al., 1988). O TGF- β latente precisa ser ativado para liberar a proteína TGF- β bioativa, a qual se liga aos receptores e desencadeia a resposta (SCHULTZ-CHERRY et al., 1995; CRAWFORD et al., 1998).

A ativação do TGF- β latente é quase sempre mediada pela Trombospondina 1, uma glicoproteína secretada pela maioria das células e incorporada dentro da matriz extracelular (SCHULTZ-CHERRY et al., 1995; CRAWFORD et al., 1998). Todavia, outros mecanismos podem regular essa ativação sob diferentes contextos fisiológicos, incluindo os efeitos da Plasmina (HELDIN et al., 1997) e das Metaloproteases MMP-9 e MMP-2 (YU; STAMENKOVIC, 2000), as quais são freqüentemente expressas em células malignas, especialmente em sítios de invasão tumoral (STAMENKOVIC, 2000; STETLER-STEVENSON; YU, 2001) e também da Integrina alfa V beta 6, a qual é expressa na superfície das células epiteliais em resposta à inflamação (MUNGER et al., 1999).

Os sinais intracelulares de todos os membros da superfamília de proteínas TGF- β s são transmitidos por um único mecanismo que envolve pares ligante-específicos de receptores transmembrana serina-treonina quinase, chamados Receptores TGF- β tipo I e tipo II (T β R-I e T β R-II respectivamente) (MASSAGUE; WEIS-GARCIA, 1996; DERYNCK; FENG, 1997; HELDIN et al., 1997; DERYNCK et al., 2001; SHARIAT et al. 2004).

Esses receptores contêm um domínio de ligação ao ligante extracelular, o domínio transmembrana e um domínio citoplasmático serina-treonina quinase. Embora apenas um tipo de receptor I para os TGF β s (T β R-II) esteja presente nos mamíferos, existem três receptores tipo I, chamados Receptores ativinas semelhantes à quinase (ALK1, ALK2 e ALK5 ou T β R-I) (OH et al., 2000; DERYNCK et al., 2001).

O ligante livre se liga primariamente ao T β R-II, constitutivamente ativo (SHARIAT et al., 2004). Uma vez ligado ao receptor tipo II, T β R-I é recrutado para dentro em um complexo ternário, tipicamente em uma configuração heterotetramérica com duas moléculas T β R-II e duas T β R-I (HART et al., 2002). A formação desse complexo ternário permite que a quinase T β R-II fosforile resíduos específicos de serina localizados dentro do domínio GS (altamente conservado)

do T β R-I (SAITOH et al., 1996; MIYAZONO et al., 2003). Essa ativação do receptor quinase T β R-I é o primeiro passo necessário na transdução do sinal.

Assim, a molécula T β R-I é o transmissor primário do sinal antiproliferativo dos TGF- β s (MASSAGUE, 1996). Além do mais, dois resíduos específicos de aminoácidos (serina na posição 172 e treonina na posição 176) dentro do domínio transmembrana do T β R-I são particularmente importantes, pois uma mutação em qualquer um desses aminoácidos elimina o efeito do TGF- β no controle do ciclo celular (SAITOH et al., 1996).

3.3 – A Sinalização Intracelular e as Proteínas Smads

Os eventos pós-receptores na via de sinalização do TGF- β são primariamente mediados e regulados por homólogos da proteína *Drosophila mother-against-dpp* (*Mad*), chamadas Smads (DERYNCK; ZHANG, 1996; MACIAS-SILVA et al., 1996; HAYASHI et al., 1997; DERYNCK et al., 1998).

As proteínas Smads formam uma família de fatores de transcrição encontradas em vertebrados, insetos e nemátodos (HELDIN et al., 1997). Elas têm uma demonstrada habilidade de propagar sinais do complexo receptor ativado para o núcleo (MASSAGUE, 1998).

As proteínas Smads podem ser classificadas em três subtipos: R-Smads (reguladas pelo receptor), Co-Smads (comuns) e I-Smads (inibitórias). Dos oito tipos de diferentes proteínas Smad encontradas em mamíferos, a Smad 2 e a Smad 3 atuam como R-Smads na via de sinalização do TGF- β e a Smad 6 e Smad 7 como I-Smads, sendo a Smad4 a única Co-Smad (DERYNCK et al., 2001; MIYAZONO et al., 2003). As regiões N e C-terminais dessas proteínas são muito conservadas e são chamadas domínios MH1 e MH2, respectivamente (MIYAZONO et al., 2003).

As R-Smads estão ancoradas à membrana plasmática por várias moléculas (MIYAZONO et al., 2003), mas, principalmente, pela Âncora Smad para Ativação do Receptor (SARA) (TSUKAZAKI et al., 1998). A SARA, ligada preferencialmente pelo domínio MH2 à membrana plasmática, forma um dímero nas células e ancora duas moléculas Smads (uma Smad 2 e uma Smad 3) (QIN

et al., 2002); evento importante para uma eficiente ativação das R-Smads pelos complexos heterotetraméricos formados pelos receptores T β R-II e T β R-I (MIYAZONO et al., 2003).

A quinase T β R-I ativada fosforila os dois últimos resíduos de serina no motivo Ser-Ser-X-Ser C-terminal das R-Smads (KRETZSCHMAR et al., 1997; MIYAZONO et al., 2003). Uma vez ativadas, as Smads 2 e 3 se ligam ao mediador comum Smad 4, formando complexos heterotriméricos compostos por 2 moléculas R-Smads e 1 Co-Smad (QIN et al., 2001; DERYNCK et al., 2001), que em seguida translocam-se para o núcleo celular e atuam como ativadores transcricionais TGF- β – induzidos de determinados genes (MACIAS-SILVA et al., 1996; ZHANG et al., 1997). A formação do complexo entre as Smads 2,3 e 4 é necessária para uma transdução eficiente do sinal TGF- β (NAKAO et al., 1997a).

Em contraste, a I-Smad 7 pode interagir com o T β R-I ativado, impedindo competitivamente a associação, fosforilação e ativação das R-Smads (HAYASHI et al., 1997; NAKAO et al., 1997b, DERYNCK et al., 2001; HANYU et al., 2001). Sua expressão é induzida sob estimulação do TGF- β (NAKAO et al., 1997b), o que caracteriza um controle por *feedback* negativo (DERYNCK et al., 2001). Sendo assim, as Smads são consideradas primariamente como ativadoras da transcrição (DERYNCK et al., 1998; PIEK et al., 1999; ITOH et al., 2000; MASSAGUE, 2000; MASSAGUE et al., 2000), contudo, elas também estão envolvidas na repressão da transcrição mediada pelo TGF- β (ZHANG et al., 1998; HAYES, 2001).

3.4 – Aspectos Intranucleares da Sinalização

Os sinais de localização nuclear (NLSs) no domínio MH1 das R-Smads desempenham um papel central na translocação das Smads para dentro do núcleo (WATANABE et al., 2000; KURISAKI et al., 2001; XIAO et al., 2001)

No núcleo, o complexo R-Smad/Co-Smad interage com vários fatores de transcrição, co-ativadores e co-repressores transcricionais, resultando na transdução de uma grande variedade de sinais intracelulares (MIYAZONO et

al., 2000). O complexo se liga ao DNA em seqüências específicas, os elementos de ligação à Smad (SBEs) (ZAWEL et al., 1998), embora com afinidade relativamente baixa. Assim, as Smads e outros fatores de transcrição regulam cooperativamente a transcrição de genes alvos através da ligação a seus promotores (MIYAZONO et al., 2003).

Uma ampla variedade de atividades biológicas do TGF- β pode resultar da habilidade das proteínas Smads de interagir com vários fatores de transcrição (MIYAZONO et al., 2000; MIYAZAWA et al., 2002). Mais de 30 fatores transcripcionais diferentes, incluindo FAST1 (DERYNCK et al., 1998), C-Jun (ZHANG et al., 1998; LIBERATI, 1999; QUING et al., 2000), TFE3 (HUA et al., 1998, 1999), Sp1 (MIYAZONO et al., 2003), receptor de vitamina D3 (YANAGISAWA, 1999), glicocorticóides (SONG et al., 1999) e receptor de andrógenos (KANG, 2001; HAYES, 2001) têm sido relatados como cooperadores das proteínas Smads. Por seleção desses fatores de transcrição como par, as Smads podem desencadear efeitos biológicos específicos nas células alvo (MIYAZONO et al., 2003).

4 - TGF- β 1 e o Câncer

Das três isoformas TGF- β s, o TGF- β 1 é mais freqüentemente superexpresso em células tumorais (DERYNCK et al., 1987; EWART et al., 2004) e desempenha um papel central na transformação e progressão tumoral, tanto quanto na repressão do tumor (DERYNCK et al., 1987; JASANI et al., 1990; KIM et al., 1990; JAKOWLEY et al., 1995; ITO et al., 1991; MOORADIAN et al., 1992; NORGAARD et al., 1994); sendo o foco principal da maioria dos estudos sobre o papel dos fatores de crescimento na tumorigênese (DERYNCK et al., 2001).

Numerosos estudos têm demonstrado que o TGF- β 1 pode ser detectado em amostras de tecido de uma grande variedade de tumores (REISS, 1999). Níveis plasmáticos elevados do TGF- β 1 também têm sido observados em pacientes com carcinoma hepatocelular (SHIRAI et al., 1992), carcinoma prostático (IVANOVIC et al., 1995; PERRY et al., 1997; WOLFF et al., 1999;

SHARIAT et al., 2004), câncer de mama (KONG et al., 1995) e aterosclerose (GRAINGER et al., 1995).

Segundo Merz (1994), Steiner (1994), Cardillo (2000) e colaboradores, os níveis de RNAm do TGF- β 1 são significativamente maiores em amostras de adenocarcinoma da próstata do que em casos de neoplasia intraepitelial prostática ou hiperplasia benigna. Num ensaio imunohistoquímico, Eklov et al. (1993) demonstraram que o TGF- β 1 está presente tanto no estroma quanto no epitélio, em casos de tumores invasivos da próstata. Blanchère e colaboradores (2002), em diferentes linhagens celulares prostáticas, detectaram que as linhagens tumorais andrógeno-independentes, PC3 e DU145, expressam níveis de RNAm quatro vezes maiores do que as células pré-neoplásticas PNT2; enquanto que a expressão na linhagem andrógeno-dependente LNCaP foi indetectável.

4.1 – O duplo papel do TGF- β 1 na tumorigênese

O TGF- β 1 pode desempenhar dois diferentes e opostos papéis no processo de progressão maligna (REISS, 1999; KANG et al., 2001). Durante os estágios iniciais da carcinogênese, o TGF- β 1 inibe o crescimento do epitélio normal e de células endoteliais (MASSAGUE, 1990); media uma potente indução transcricional dos dois principais inibidores do ciclo celular, P15^{INK4B} e P21^{CIP1} (ATTISANO et al., 1994; HANNON; BEACH, 1994; DATTO et al., 1995; LI et al., 1995), e pode ainda mediar as ações de agentes quimiopreventivos como retinóides (REISS, 1999). Dadas estas habilidades primárias do TGF- β 1, a ativação desta citocina no microambiente tumoral pode representar um outro mecanismo usado no contra-ataque à expansão clonal de células estimuladas mitogenicamente, além da indução das mesmas à senescência ou apoptose. Sendo assim, estas células devem superar os efeitos inibitórios do TGF- β 1 na proliferação celular para progredir na malignidade. Neste contexto, o TGF- β 1 pode legitimamente ser visto como um supressor de tumor (SPORN et al., 1989; MARKOWITZ; ROBERTS, 1996; ALEXNADROW; MOSES, 1997; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Porém, em certo ponto durante o desenvolvimento e progressão de tumores malignos, as células tumorais tornam-se refratárias ao crescimento TGF- β dependente, sendo fontes primárias do TGF- β 1 bioativo (REISS, 1999). Em muitos casos, essa resistência aos efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos da citocina é consequência da perda ou inativação por mutações de genes que codificam intermediários da sua via de sinalização (MOUSTAKAS et al., 2002). Esses incluem tanto os receptores tipos I e II, quanto às proteínas Smads. O exato estágio do desenvolvimento ou progressão tumoral, no qual os clones TGF- β -resistentes vêm a dominar a população de células tumorais em diferentes tipos de neoplasias, permanece sem definição (REISS, 1999).

Vários mecanismos diferentes têm sido propostos para explicar como a presença do TGF- β 1 ativado favorece seletivamente a expansão clonal de populações de células malignas. TGF- β 1 derivado de células tumorais pode facilitar a invasão e metástase, induzir a angiogênese ou mediar a fuga do monitoramento feito pelo sistema imunológico (REISS, 1999).

A metástase tumoral depende de vários fatores, incluindo a habilidade das células de invadir o estroma e migrar para os vasos sanguíneos e linfáticos (DERYNCK et al., 2001). O TGF- β 1 está envolvido na transdiferenciação epitelial/mesenquimal (EMT), a qual é caracterizada por múltiplas alterações celulares, incluindo extensivas mudanças na expressão de moléculas de adesão celular e por uma troca de um citoesqueleto essencialmente queratinoso, por um composto predominantemente de vimentina (DERYNCK et al., 2001). Essa capacidade de células epiteliais ou carcinogênicas de passar pela EMT está correlacionada com as mudanças celulares que facilitam a invasão e metástase *in vivo* (UNTERGASSER et al., 2003).

A microvascularização do tumor também é essencial para seu crescimento e invasão, já que os vasos fornecem nutrientes e oxigênio às células tumorais, permitindo sua disseminação no sistema sanguíneo, o que leva à metástase. O TGF- β 1 atua como um potente indutor da angiogênese em vários ensaios (ROBERTS et al., 1986; MADRI et al., 1988; YANG; MOSES, 1990; GAJDUSEK et al., 1993; CHOI; BALLERMANN, 1995), e modelos com ratos defeituosos em componentes da sua via de sinalização demonstram a importância do TGF- β 1 no desenvolvimento vascular normal (DERYNCK et al.,

2001). Os mecanismos de estimulação da angiogênese pelo TGF- β 1 supostamente combinam efeitos diretos e indiretos. O TGF- β 1 induz a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual atua diretamente nas células endoteliais estimulando sua proliferação e migração (PERTOVAARA et al., 1994) e induzindo também a formação de capilares sanguíneos (MADRÍ et al., 1988; CHOI; BALLERMANN, 1995). Já a estimulação indireta da angiogênese, pode acontecer através da potente atividade quimioatrativa do TGF- β 1 por monócitos, os quais liberam citocinas angiogênicas (ROBERTS et al., 1986; YANG; MOSES, 1990; ASHCROFT, 1999).

Várias observações demonstram que a expressão do TGF- β 1 por células tumorais também promove a tumorigenicidade por repressão local das funções imunes (DERYNCK et al., 2001). O TGF- β 1 pode inibir a proliferação e diferenciação funcional de linfócitos T citotóxicos, células *natural killers* (NK), neutrófilos, macrófagos e células B (ASHCROFT, 1999; LETTERIO; ROBERTS, 1998; FORTUNEL et al.; 2000).

Considerando as complexas atuações do TGF- β 1 na supressão e progressão tumoral, as quais são contexto e estágio-dependentes, a busca por qualquer estratégia para explorar esse conhecimento com fins terapêuticos será feita com dificuldades (DERYNCK et al., 2001). Entretanto, a elucidação progressiva de sua cascata de sinalização com o passar dos anos provê evidências cada vez maiores de que esta citocina é um modulador chave do processo de carcinogênese, o que faz com que ela seja um alvo terapêutico potencial com muitas implicações, tanto na prevenção, quanto no tratamento do câncer (REISS, 1999; PASCHE, 2001).

REFERÊNCIAS GERAIS

- ALBRIGHT, L. C.; EELES, R. Progress in prostate cancer. **Nature Genetics**. v. 9, p. 336-338. 1995.
- ALEXANDROW, M. G.; MOSES, H. L. Kips of to Myc: implications for TGF beta signaling. **J. Cell. Biochem**. v. 66, p. 427-432. 1997.
- ALLEN, N. E.; SAUVAGET, C.; RODDAM, A. W.; APPLEBY, P.; NAGANO, J.; SUZUKI, G.; KEY, T. J.; KOYAMA, K. A prospective study of diet and prostate cancer in Japanese men. **Cancer Causes and Control**. v. 15, p. 911-920. 2004.
- ALMEIDA, J. C. O estudo histopatológico da biópsia prostática. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia**. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 133, p. 447-449.
- ARAGÃO, A. J. O exame físico na avaliação do câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia**. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 130, p. 437-438.
- ARKWRIGHT, P. D.; LAURIE, S.; SUPER, M.; PRAVICA, V.; SCHWARZ, M. J.; WEBB, A. K.; HUTCHINSON, V. TGF- β 1 genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. **Thorax**. v. 55, p. 459-462. 2000.
- ASHCROFT, G. S. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . **Microbes Infect**. v. 1, p. 1275-1282. 1999.
- ATTISANO, L.; WRANA, J. L.; LOPEZ-CASILLAS, F.; MASSAGUE, J. TGF-beta receptors and actions. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1222, p. 71-80. 1994.
- BARRACK, E. R. TGF beta in prostate cancer: a growth factor inhibitor that can enhance tumorigenicity. **Prostate**. v. 31, p. 61-70. 1997.
- BENDHACK, M. L.; SOBREIRO, B. Repercussão socioeconômica da câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia**. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 124, p. 421-422.
- BERRY, R.; SCHROEDER, J. J.; FRENCH, A. J.; McDONNELL, S. K.; PETERSON, B. J.; CUNNINGHAM, J. M.; THIBODEAU, S. N.; SCHAID, D. J. Evidence for a prostate cancer-susceptibility locus on chromosome 20. **Am. J. Hum. Genet**. v. 67, p. 82-91. 2000.

- BERTHON, P.; VALERI, A.; COHEN-AKENINE, A.; DRELON, E.; PAISS, T.; WOHR, G.; LATIL, A.; MILLASSEAU, P.; MELLAH, I.; COHEN, N.; BLANCHE, H.; BELLANE-CHANTELOT, C.; DEMENAI, F.; TEILLAC, P.; LE DUC, A.; DE PETRICONI, R.; HAUTMANN, R.; CHUMAKOV, I.; BACHNER, L.; MAITLAND, N. J.; LIDEREAU, R.; VOGEL, W.; FOURNIER, G.; MANGIN, P.; CUSSENOT, O. Predisposin gene for a early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. **Am J. Hum. Genet.** v. 62, p. 1416-1424. 1998.
- BLANCHÈRE, M.; SAUNIER, E.; MESTAYER, C.; BROSHUIS, M.; MOWSZOWICZ, I. Alterations of expression and regulation of transforming growth factor β in human cancer prostate cell lines. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.** v. 82, p. 297-304. 2002.
- BLOBE, G. C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. **N. Engl. J. Med.** v. 342, p. 1350-1358. 2000.
- BOOKSTEIN, R.; MacGROGAN, D.; HILSENBECK, S. G.; SHARKEI, F.; ALLRED, D. C. p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. **Cancer Res.** v. 53, p. 3369-3373. 1993.
- BOSTWICK, D. G. Prostatic intraepithelial neoplasia. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. **Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment.** London: Martin Dunitz, 1999. cap. 3, p. 35-50.
- BUSSEMAKERS, M. J.; BOKHOVEN, A.; VAN VERHAEGH, G. W.; SMITH, F. P.; KARRTHAUS, H. F.; SCHALKEN, J. A.; DEBRUYNE, F. M.; RU, N.; ISAACS, W. B. A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. **Cancer Research.** v. 59, p. 5975-5979. 1999.
- CARDILLO, M. R.; PETRANGELI, E.; SALVATORY, L.; RAVENNA, L.; DI SILVERIO, F. Transforming growth factor beta 1 and androgens receptors in prostate neoplasia. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** v. 22, p. 403-410. 2000.
- CARTER, B. S.; BEATY, T. H.; STEINBERG, G. D.; CHILDS, B.; WALSH, P.C. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. **Proc. Natl. Acad. Science.** v. 89, p. 3367-3371. 1992.

- CASELLA, R.; MADURO, M. R.; LIPSHULTZ, L. I.; LAMB, D. J. Significance of the polyglutamine tract polymorphism in the androgen receptor. **Urology**. v. 58, p. 651-656. 2001.
- CATALONA, W. J.; SMITH, D. S. Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical retropubic prostatectomy for prostate cancer intermediate-term results. **The Journal of Urology**. v. 160, p. 2428-2434. 1998.
- CHAN, J. M.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E. L. What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. **Seminars in Cancer Biology**. v. 8, p. 263-273. 1998.
- CHANG, G. T. G.; STEENBEEK, M.; SCHIPPERS, E.; BLOK, L. J.; VAN WEERDEN, W. M.; VAN ALEWIJK, D. C. J. G.; EUSSEN, B. H. J.; VAN STEENBRUGGE, G. J.; BRINKMANN, A. O. A novel gene on human chromosome 2p24 is differentially expressed between androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. **European Journal of Cancer**. v. 37, p. 2129-2134. 2001.
- CHELLY, J.; KAPLAN, J. C.; MAIRE, P.; GAUTRO, S.; KAHN, A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and nonmuscle tissues. **Nature**. v. 333, p. 858-860. 1988.
- CHEN, L.; SEGAL, D. M.; MASH, D. C. Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction: an approach for the measurement of target gene expression in human brain. **Brain Research Protocols**. v. 4, p. 132-139. 1999.
- CHOI, M. E.; BALLERMANN, B. J. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-receptors. **J. Biol. Chem**. v. 270, p. 21144-21150. 1995.
- COFFEY, D. S. The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. **Campbell's Urology**. vol.1. 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. cap. 6, p. 221-251.
- COFFEY, D. S. Prostate cancer: an overview of an increasing dilemma. **Cancer (Suppl.)**. v. 71, p.880-886. 1993.

- CRAWFORD, S. E.; STELLMACH, V.; MURPHYULLRICH, J. E.; RIBEIRO, S. F.; LAWLER, J.; HYNES, R. O.; BOIVIN, G. P.; BOUCK, N. Thombospondin-1 is a major activator of TGF-beta-1 in vivo. **Cell**. v. 93, p. 1159-1170. 1998.
- CURY, J.; NARDOZZA-JUNIOR, A. Epidemiologia e história natural. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia**. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 75, p. 265-269.
- DAMIÃO, R.; CARRERETE, F. B. Por que a próstata cresce? In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia**. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 74, p. 261-263.
- DANIELPOUR, D. Trasdiferentiation of NRP-152 rat prostatic basal epithelial cells toward a luminal phenotype: regulation by glucocorticoid, insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta. **J. Cell Sci**. v. 112, p. 169-179. 1999.
- DATTO, M. B.; YU, Y.; WANG, X. F. J. Functional analisys of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/CIP1/p21 promoter. **Biol. Chem**. v. 270, p. 28623-28628. 1995.
- DE MARZO, A. M.; PUTZI, M. J.; NELSON, W. G. New concepts in the pathology of prostatic epithelial carcinogenesis. **Urology**. v. 57(Suppl. A4), p. 103-114. 2001.
- DE MARZO, A. M.; NELSON, W. G.; ISAACS, W. B.; EPSTEIN, J. I. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. **The Lancet**. v. 361, p. 955-964. 2003.
- DERYNCK, R.; GOEDDEL, D. V.; ULLRICH, A.; GUTTERMAN, J. U.; WILLIAMS, R. D.; BRINGMAN, T. S.; BERGER, W. H. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors and and the epidermal growth factor receptor by human tumors. **Cancer Res**. v. 47, p. 707-712. 1987.
- DERYNCK, R.; ZHANG, Y.; FENG, X. H. Smads transcriptional activators of TGF- β response. **Cell**. v. 95, p. 737-740. 1998.
- DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nature Genetics**. v. 29, p. 117-129. 2001.
- DERYNCK, R.; FENG, X. H. TGF--b receptor signaling. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1333, p. 105-150. 1997.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y. Intracellular signaling : The Mad way to do it. **Curr. Biol.** v. 6, p. 1226-1229. 1996.

DILLIOGLUGIL O.; LEIBMAN, B. D.; KATTAN, M. W.; SEALE-HAWKINS, C.; WHEELER, T. M.; SCARDINO, P. T. Hazard rates for progression after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. **Urology.** v. 50, p. 93-99. 1997.

DJONOV, V.; BALL, R. K.; GRAF, S.; MOTTAZ, A. E.; ARNOLD, A. M.; FLANDERS, K.; STUDER, U. E.; MERZ, V. W. Transforming growth factor-beta 3 is expressed in non-dividing basal epithelial cells in normal human prostate and benign prostate hyperplasia, and is no longer detectable in prostate carcinoma. **Prostate.** v. 31, p. 103-109. 1997.

DUMOULIN, F. L.; NISCHALKE, H. D.; LEIFELD, L.; BUSSCHE, A.; von dem, ROCKSTRH, J. K.; SAUERBRUCH, T.; SPENGLER, U. Semi-quantification of human C-C chemokine mRNAs with reverse transcription / real-time PCR using multi-specific standards. **Journal of Immunological Methods.** v. 241, p. 109-119. 2000.

EKLOV, S.; FUNA, K.; NORDGREN, H.; OLOFSSON, A.; KANAZAKI, T.; MIYAZONO, K.; NILSSON, S. Lack of the latent transforming growth factor beta binding protein in malignant but not benign prostatic tissue. **Cancer Res.** v. 53, p. 3193-3197. 1993.

EWART-TOLAND, A.; CHAN, J. M.; YUAN, J.; BALMAIN, A.; MA, J. A gain function TGFB1 polymorphism may be associated with late stage prostate cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.** v. 13, p. 759-764. 2004.

FAVRE, N.; BORDMANN, G.; RUDIN, W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. **Journal of Immunological Methods.** v. 204, p. 57-66. 1997.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

- FORTUNEL, N. O.; HATZFELD, A.; HATZFELD, J. A. Transforming growth factor- β : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. **Blood**. v. 96, p. 2022-2036. 2000.
- GAJDUSEK, C. M.; LUO, Z.; MAYBERG, M. R. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor 1: synergistic mediators of angiogenesis in vitro. **J. Cell. Physiol.** v. 157, p. 133-144 . 1993.
- GATTÁS, N. Genética e câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia**. São Paulo: Segmento, 2003. cap. 128, p. 433-434.
- GEWALTIG, J.; MANGASSER-STEPHAN, K.; GARTUNG, C.; BIESTERFELD, S.; GRESSNER, A. M. Association of polymorphisms of the transforming growth factor- β 1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. **Clinica Chimica Acta**. v. 316, p. 83-94. 2002.
- GHOSSEIN, R. A.; SCHER, H. I.; GERALD, W. L.; KELLY, W. K.; CURLEY, T.; AMSTERDAM. A.; ZHANG, Z. F.; ROSAI, J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic carcinoma: clinical implications. **Journal of Clinical Oncology**. v. 13, p. 1195-1200. 1995.
- GIBBS, M.; STANFORD, J. L.; MCINDOE, R. A.; JARVIK, G. P.; KOLB, S.; GOODE, E. L.; CHAKRABARTI, L.; SCHUSTER, E. F.; BUCKLEY, V. A.; MILLER, E. L.; BRANDZEL, S.; LI, S.; HOOD, L.; OSTRANDER, E. A. Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. **Am. J. Hum. Genet.** v. 64, p.776-787. 1999.
- GIMBA, E. R. P.; BARCINSKI, M. A. Molecular aspects of prostate câncer: implications for future directions. **International Braz. J. Urol.** v. 29, p. 401-411. 2003.
- GIOVANNUCCI, E. Epidemiologic characteristics of prostate cancer. **Cancer**. v. 75, p. 1766-1777. 1995.
- GRAINGER, D. J.; KEMP, P. R.; METCALFE, J. C.; LIU, A. C.; LAWN, R. M.; WILLIAMS, N. R.; GRACE, A. A.; SCHOFIELD, P. M.; CHAUHAN, A. The serum

concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. **Na. Med.** v. 1, p. 74-79. 1995.

GRIFFITHS, K.; MORTON, M. S. Aspects of the cell biology of prostate cancer. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. **Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment.** London: Martin Dunitz, 1999. cap. 4, p. 51-74.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell.** v. 100, p. 57-70. 2000.

HANNON, G. J.; BEACH, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature.** v. 371, p. 257-261. 1994.

HANYU, A.; ISHIDOU, Y.; EBISAWA, T.; SHIMANUKI, T.; IMAMURA, T.; MIYAZONO, K. The N-domain of Smad 7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. **J. Cell Biol.** v. 155, p. 1017-1028. 2001.

HART, P. J.; DEEP, S.; TAYLOR, A. B.; SHU, Z.; HINCK, C. S.; HINCK, A. P. Crystal structure of the human T β R2 ectodomain-TGF- β 3 complex. **Nat. Struct. Biol.** v. 9, p. 203-208. 2002.

HAYASHI, H.; ABDOLLAH, S.; QIU, Y.; CAI, J.; XU, Y. Y.; GRINNELL, B. W.; RICHARDSON, M. A.; TOPPER, J. N.; GIMBRONE JR, M. A.; WRANA, J. L.; FALB, D. The MAD-related protein Smad 7 associates with TGF-beta receptors and functions as an antagonist of TGF-beta signaling. **Cell.** v. 89, p. 1165-1173. 1997.

HAYES, S. A. Smad3 represses androgen receptor-mediated transcription. **Cancer Res.** v. 61, p. 2112-2118. 2001.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature.** v. 390, p. 465-471. 1997.

HERING, F. L. Epidemiologia e história natural. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia.** São Paulo: Segmento, 2003. cap. 125, p. 423-424.

- HUA, X., LIU, X., ANSARI, D. O.; LODISH, H. F. Synergistic cooperation of TFE3 and Smad proteins in TGF β -induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. **Genes Dev.** v. 12, p. 3084-3095. 1998.
- HUA, X.; MILLER, Z. A.; WU, G.; SHI, Y.; LODISH, H. F. Specificity in transforming growth factor β -induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor E3, and Smad proteins. **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 96, p. 13130-13135. 1999.
- IGAZ, P.; FEJÉR, G.; SZALAI, C.; TÓTH, S.; FALUS, A. Development of competitive mRNA PCR for the quantification of Interleukin-6-responsive *junB* oncogene expression. **BioTechniques.** v. 24, p. 854-860. 1998.
- INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SKINSHY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications.** San Diego: Academic Press, 1990. cap. 1, p. 3-12.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de Próstata.** Disponível em: <<http://www.inca.org.br/câncer/tipos/próstata>>. Acesso em: 13 dez. 2004.
- ISAACS, J. T. Molecular markers for prostate cancer metastasis: developing diagnostic methods for predicting the aggressiveness of prostate cancer. **American Journal of Pathology.** v.150, p. 1511-1521. 1997.
- ITO, N.; KAWATA, S.; TAMURA, S.; TAKAISHI, K.; SHIRAI, Y.; KISO, S.; YABUUCHI, I.; MATSUDA, Y.; NISHIOKA, M.; TARUI, S. Elevated levels of transforming growth factor β messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.** v. 51, p. 4080-4083. 1991.
- ITOH, S.; ITOH, F.; GOUMANS, M. J.; TEN DIJKE, P. Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. **Eur. J. Biochem.** v. 267, p. 6954-6967. 2000.
- IVANOVIC, V.; MELMAN, A.; DAVIS-JOSEPH, B.; VALCIC, M.; GELIEBTER, J. Elevated plasma levels of TGF β 1 in patients with invasive prostate cancer. **Nature Med.** v. 1, p. 282-283. 1995.

- JAKOWLEY, S.; MATHIAS, A.; CHUNG, P.; MOODY, T. W.; Expression of transforming growth factor- β ligand and receptor messenger RNAs in lung cancer cell lines. *Cell Growth Differ.* v. 6, p. 465-476. 1995.
- JARMULOWICZ, M. R. The role of pathology in biopsy, diagnosis and management of prostate cancer. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. **Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment.** London: Martin Dunitz, 1999. cap.
- JASANI, B.; WYLLIE, F. S.; WRIGHT, P. A.; LEMOINE, N. R.; WILLIAMS, E. D.; WYNFORD-THOMAS, D. Immunocytochemically detectable TGF- β associated with malignancy in thyreoid epithelial neoplasia. *Growth Factors.* v. 2, p. 149-155. 1990.
- KANG, H. Y. From transforming growth factor- signaling to androgen action: identification of Smad3 as an androgen receptor coregulator in prostate cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* v. 98, p. 3018-3023. 2001.
- KANG, H. Y.; LIN, H. K.; HU, Y. C.; YEH, S.; HUANG, K.E.; CHANG, C. From transforming growth factor- β signaling to androgen action: identification of Smad 3 as an androgen receptor regulator in prostate cancer cells. *PNAS.* v. 98, p. 3018-3023. 2001.
- KARAN, D.; LIN, M. F.; JOHNSSON, S. L.; BATRA, S. K. Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. *Int. J. Cancer.* v. 103, p. 285-293. 2003.
- KIM, S. J.; KEHRL, J. H.; BURTHON, J. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for increased production of TGF β 1 in adult T cell leukemia. *J. Exp. Med.* v. 172, p. 121. 1990.
- KONG, F. M.; ANSCHER, M. S.; ABBOT, B. D.; IGLEHART, J. D.; JIRTLE, R. L. Elevated plasma transforming growth factor β 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann. Surg.* v. 222, p. 155-162. 1995.

KRETZSCHMAR, M.; LIU, F.; HATA, A.; DOODY, J.; MASSAGUE, J. The TGF-beta family mediator Smad 1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. **Genes Dev.** v. 15, p. 984-995. 1997.

KURISAKI, A.; KOSE, S.; YONEDA, Y.; HELDIN, C. H.; MOUSTAKAS, A. A transforming growth factor- β induces nuclear import of Smad 3 in an importin- β 1 and Ran-dependent manner. **Mol. Biol. Cell.** v. 12, p. 1079-1091. 2001.

LAPIDES, J. **Urologia.** Rio de Janeiro: Intramericana, 1979. 376 p.

LEE, C.; SINTICH, S. M.; MATHEWS, E. P.; SHAH, A. H.; KUNDU, S. D.; PERRY, K. T.; CHO, J. S.; ILIO, K. Y.; CRONAUER, M. V.; JANULIS, L.; SENSIBAR, J. A. Transforming growth factor-beta in benign and malignant prostate. **Prostate.** v. 39, p. 285-290. 1999.

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF- β . **Annu. Rev. Immunol.** v. 16, p. 137-161. 1998.

LI, J. M.; NICHOLS, M. A.; CHANDRASEKHARAN, S.; XIONG, Y.; WANG, X. F. J. transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site. **Biol. Chem.** v. 270, p. 26750-26753. 1995.

LI, P. E.; NELSON, P. S. Prostate cancer genomics. **Curr. Urol. Rep.** v. 2, p. 70-78. 2001.

LIBERATI, N. T. Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 96, p. 4844-4849. 1999.

MACHADO, M. T.; CINTRA, C. C. Prevenção do câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia.** São Paulo: Segmento, 2003. cap. 126, p. 425-427.

MACIAS-SILVA, M.; ABDOLLAH, S.; HOODLESS, P. A.; PIRONE, R.; ATTISANO, L.; WRANA, J. L. MADR2 is a substrate of the TGF- β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. **Cell.** v. 87, p. 1215-1224. 1996.

- MADRI, J. A.; PRATT, B. M.; TUCKER, A. M. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor- depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. **J. Cell Biol.** v. 106, p. 1375-1384. 1988.
- MAKRIDAKIS, N. M.; ROSS, R. K.; PIKI, M. C.; CROCITTO, L. E.; KOLONEY, L. N.; PEARCE, C. L.; HENDERSON, B.E.; REICHARDT, J. K. U. Association of mis-sense substitution in SDR5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispan men in Los Angeles. **The Lancet.** v. 345, p. 975-978. 1999.
- MARKOWITZ, S. D.; ROBERTS, A. B. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 7, p. 93-102. 1996.
- MASSAGUE, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu. Rev. Cell Biol.** v. 6, p. 597-641. 1990
- MASSAGUE, J. TGF- β signaling receptors transducers and MAD proteins. **Cell.** v. 85, p. 947-950. 1996.
- MASSAGUE, J. TGF-beta signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.** v. 67, p. 753-791. 1998.
- MASSAGUE, J. How cells read TGF- signals. **Nature Rev. Mol. Cell. Biol.** v. 1, p. 169-178. 2000.
- MASSAGUE, J.; BLAIN, S. W.; LO, R. S. TGF- signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. **Cell.** v. 103, p. 295-309. 2000.
- MASSAGUE, J.; WEIS-GARCIA, F. Serine/Threonine kinase receptors mediators of transforming growth factor beta family signals. **Cancer Surv.** v. 27, p. 41-64. 1996.
- McNEAL, J. E. Regional morphology and pathology of the prostate. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 49, p. 347. 1968.
- McNEAL, J. E. Anatomy of the prostate: An historical survey of divergent views. **Prostate.** v. 1, p. 3. 1980.
- McNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. **Prostate.** v. 1, p. 35. 1981.
- McNEAL, J. E. Normal histology of the prostate . **Am. J. Surg. Pathol.** v. 12, p. 619. 1988.

- MERZ, V. W.; ARNOLD, A. M.; STUDER, U. E. Differential expression of transforming growth factor-beta 1 and beta 3 as well as c-fos mRNA in normal human prostate benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. **World J. Urol.** v. 12, p. 96-98. 1994.
- MIKOLAJCZYK, S. D.; SONG, Y.; WONG, J. R.; MATSON, R. S.; RITTENHOUSE, H. G. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? **Clinical Biochemistry.** v. 37, p. 519-528. 2004.
- MIYAZAWA, K.; SHINOZAKI, M.; HARA, T.; FURUYA, T.; MIYAZONO, K. Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signaling. **Genes Cells.** v. 7, p. 1191-1204. 2002.
- MIYAZONO, K.; HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; HELDIN, C. H. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor- β from human platelets, a high molecular weight complex containing precursor sequences. **J. Biol. Chem.** v. 263, p. 6407-6415. 1988.
- MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P.; HELDIN, C. H. TGF- β signaling by Smad protein. **Adv. Immunol.** v. 75, p. 115-157. 2000.
- MIYAZONO, K.; SUZUKI, H.; IAMAMURA, T. Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. **Cancer Sci.** v. 94, p. 230-234. 2003.
- MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Detection of the G \rightarrow T polymorphism at the Sp1 binding site of the collagen type $\alpha 1$ gene by a novel Arms-PCR method. **Genetic Testing.** v. 6, p. 53-57. 2002.
- MOORADIAN, D. L.; McCARTHY, J. B.; KOMANDURI, K. V.; FURCHT, L. T. Effects of transforming growth factor $\beta 1$ on human pulmonary adenocarcinoma cell adhesion, motility and invasion in vitro. **J. Natl. Cancer. Inst.** v. 84, p. 239-254. 1992.
- MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. Pelve e Peíneo. In:_____. **Anatomia orientada para a clínica.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 3, p. 294-376.

- MORTON, D. M.; BARRACK, E.R. Modulation of transforming growth factor β effects on prostate cancer cell proliferation by growth factors and extracellular matrix. **Cancer Research**. v. 55, p. 2596-2602. 1995.
- MOSES, H. L.; YANG, E. Y.; PIETENPOL, J. A. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights. **Cell**. v. 63, p.245-247. 1990.
- MOUSTAKAS, A.; PARDALI, K.; GAAL, A.; HELDIN, C. H. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of the cell growth and differentiation. **Immunology Letters**. v. 82, p. 85-91. 2002.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase chain reaction. **Methods Enzimology**. v. 55, p. 335-350. 1987.
- MUNGER, J. S.; HUANG, X. Z.; KAWAKATSU, H.; GRIFFITHS, M. D.; DALTON, S. L.; WU, J. F.; KAMINSKI, N.; GARAT, C.; MATTHAY, M. A.; IFKIN, D. B.; SHEPPARD, D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: A mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. **Cell**. v. 96, p. 319-328. 1999.
- NAKAO, A.; IAMAMURA, T.; SOUCHELNYTSKYI, S.; KAWABATA, M.; ISHISAKI, A.; OEDA, E.; TAMAKI, K.; HANAI, J.; HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF- β receptor-mediated signaling through Smad 2, Smad 3 and Smad 4. **The EMBO Journal**. v. 16, p. 5353-5362. 1997a.
- NAKAO, A.; AFRAKHTE, M.; MOREN, A.; NAKAYAMA, T.; CHRISTIAN, J. L.; HEUCHEL, R.; ITOH, S.; KAWABATA, N.; HELDIN, N. E.; HELDIN, C. H.; TENDIJK, P. Identification of Smad 7, a TGF-beta inducible antagonist of TGF-beta signaling. **Nature**. v. 389, p. 631-635. 1997b.
- NAVONNE, N. M.; TRONCOSO, P.; PISTERS, L. L.; GOODROW, T. L.; PALMER, J. L.; NICHOLS, W. W.; VON ESCHENBACH, A. C.; CONTI, C. J. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 85, p. 1657-1669. 1993.
- NEWTON, C. R.; GRAHAM, A.; HEPTINSTALL, S. J.; POWELL, S. J.; SUMMERS, C.; KALSHEKER, N.; SMITH, J. C.; MARKHAM, A. F. Analysis of any

point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research**. v. 17, p. 2503-2516. 1989.

NOCERA, M.; CHU, T. M. Characterization of latent transforming growth factor-beta from human seminal plasma. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 33, p. 282-291. 1995.

NORGAARD, P.; DAMSTRUP, L.; RYGAARD, K.; SPANG-THOMSEN, M. Growth suppression by transforming growth factor β 1 of human small cell lung cancer cell lines is associated with expression of type II receptor. **Br. J. Cancer**. v. 12, p. 802-808. 1994.

NWOSU, V.; CARPTEN, J.; TRENT, J. M.; SHERIDAN, R. Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. **Human Molecular Genetics**. v. 10, p. 2313-2318. 2001.

OH, S. P.; SEKI, T.; GOSS, K. A.; IMAMURA, T.; YI, Y.; DONAHOE, P. K.; LI, L.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P.; KIM, S.; LI, E. Activin receptor like-kinase 1 modulates transforming growth factor- β 1 signaling in the regulation of angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97, p. 2626-2631. 2000.

PASCHE, B. Role of transforming growth factor beta in cancer. **Journal of Cellular Physiology**. v. 186, p. 153-168. 2001.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de DNA Recombinante. In: SCHRANK, A.; FERREIRA, H. B.; SCHRANK, I.; RODRIGUES, J. J. S.; REGNER, L.P.; PASSAGLIA, L. M. P.; ROSSETTI, M. L. R.; RAUPP, R. M.; SILVA, S. C.; GAIESKY, V. L. V.; ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto alegre: Mercado Aberto, 1996. cap. 15, p. 307-331.

PEEHL, D. M.; SELLERS, R.G. Basics FGF, EGF, and PDGF modify TGF- β -induction of smooth muscle cell phenotype in human prostatic stromal cells. **Prostate**. v. 35, p. 125-134. 1998.

PERNAS-ALONSO, R.; MORELLI, F.; PORZIO, U.; di PERRONE-CAPANO, C. Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. **Brain Research Protocols**. v. 4, p. 395-406. 1999.

PERREY, C.; TURNER, S. J.; PRAVICA, V.; HOWELL, W. M.; HUTCHINSON, I. V. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF- α , TNF- β and TGF- β 1 gene polymorphisms. **Transplant Immunology**. v. 7, p. 127-128. 1999.

PERRY, K.; ANTHONY, C. T.; CASE, T.; STEINER M. S. Transforming growth factor beta as a clinical biomarker for prostate cancer. **Urology**. v. 49, p. 151-155. 1997.

PERTOVAARA, L.; KAIPAINEN, A.; MUSTONEN, T.; ORPANA, A.; FERRARA, N.; SAKSELA, O.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- in fibroblastic and epithelial cells. **J. Biol. Chem.** v.269, p. 6271-6274. 1994.

PIEK, E.; FRANZEN, P.; HELDIN, C. H.; TEN DIJKE, P. Characterization of a 60-kDa cell surface-associated transforming growth factor-beta binding protein that can interfere with transforming growth factor-beta receptor binding. **Journal of Cell Physiology**. v. 173, p. 447-459. 1997.

PIEK, E.; HELDIN, C. H.; TEN DIJKE, P. Specificity, diversity, and regulation in TGF- superfamily signaling. **FASEB J.** v. 13, p. 2105-2124. 1999.

PIENTA, K. J.; ESPER, P. S. Risk factors for prostate cancer. **Ann. Intern. Med.** v. 118, p. 793-803. 1993.

PORKKA, K. P.; VISAKORPI, T. Molecular mechanisms of prostate cancer. **European Urology**. p. 1-9, 2004.

QIN, B. Y.; CHACKO, B. M.; LAM, S. S.; DE CAESTECKER, M. P.; CORREIA, J. J.; LIN, K. Structural basis of Smad 1 activation by receptor kinase phosphorylation. **Mol. Cell**. v. 6, p. 1303-1312. 2001.

QIN, B. Y.; LAM, S. S.; CORREIA, J. J.; LIN, K. Smad3 allostery links TGF- β receptor kinase activation to transcriptional control. **Genes Dev.** v. 16, p. 1950-1963. 2002.

QING, J., ZHANG, Y.; DERYNCK, R. Structural and functional characterization of the transforming growth factor--induced Smad3/c-Jun transcriptional cooperativity. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 38802-38812. 2000.

- REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. 1ª ed. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2001. 215 p.
- REISS, M. TGF- β and cancer. **Microbes and Infection**. v. 1, p. 1327-1347. 1999.
- RIFFENBURG, R.; AMLING, C. L. Use of early PSA velocity to predict eventual abnormal PSA values in man at risk for prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**. v. 6, p. 39-44. 2003.
- ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B.; ASSOIAN, R. K.; SMITH, J. M.; ROCHE, N. S.; WAKEFIELD, L. M.; HEINE, U. I.; LIOTTA, L. A.; FALANGA, V.; KEHRL, J. H. Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 83, p. 4167-4171. 1986.
- ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). **Growth factors**. v. 8, p. 1-9. 1993.
- ROBSON, C. N.; GNANAPRAGASAM, V.; BYRNE, R. L.; COLLINS, A. T.; NEAL, D. E. Transforming growth factor beta-1 up-regulates p15, p21, and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. **J. Endocrinol.** v. 160, p. 257-266. 1999.
- ROHR, H. P.; BARTSCH, G. Human benign prostatic hyperplasia: a stromal disease? New perspectives by quantitative morphology. **Urology**. v. 16, p. 625-633. 1980.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. v. 230, p.1350-1354. 1985.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. v. 230, p. 487-491. 1988.
- SAITOH, M.; NISHITOH, M.; AMAGASA, T.; MIYAZONO, K.; TAKAGI, M.; ICHIJO, H. Identification of important regions in the cytoplasmic juxtamenbrane

domain of type I receptor that separated signaling pathways of transforming growth factor- β . **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 2769-2775. 1996.

SANTAGATI, S.; GARNIER, M.; CARLO, P.; VIOLANI, E.; PICATTI, G. B.; MAGGI, A. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using polymerase chain reaction (PCR)-based methods. **Brain Research Protocols.** v. 1, p. 217-223. 1997.

SCHULTZ-CHERRY, S.; CHEN, H.; MOSHER, D. F.; MISENHEIMER, T. M.; KRUTZSCH, H. C.; ROBERTS, D. D.; MURPHY-ULRICH, J. E. Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 7304-7310. 1995.

SEAH, G. T.; ROOK, G. A. W. A sensitive, non-radioactive quantitative method for measuring IL-4 and IL-4 δ 2 mRNA in unstimulated cells from multiple clinical samples, using nested RT-PCR. **Journal of Immunological Methods.** v. 228, p. 139-149. 1999.

SHARIAT, S. F.; MENESSES-DIAZ, A.; KIM, I. Y.; MURAMOTO, M.; WHEELER, T. M.; SLAWIN, K. M. Tissue expression of transforming growth factor β 1 and its receptors: correlation with pathologic features and biochemical progression in patients undergoing radical prostatectomy. **Urology.** v. 63, p. 1191-1197. 2004.

SHINOHARA, Y.; YAMAMOTO, K.; KOGURE, K.; ICHIHARA, J.; TERADA, H. Steady state transcript levels of the type II hexokinase and type 1 glucose transporter in human tumor cell lines. **Cancer Letters.** v. 82, p. 27-32. 1994.

SHIRAI, Y.; KAWATA, S.; ITO, N.; TAMURA, S.; TAKAISHI, K.; KISO, S.; TSUSHIMA, H.; MATSUZAWA, Y. Elevated levels of plasma transforming growth factor β 1 in patients with hepatocellular carcinoma. **Jpn. J. Cancer Res.** v. 83, p. 676-679. 1992.

SIEBERT, P. D.; LARRICK, J. W. Competitive PCR. **Nature.** v. 359, p. 557-558. 1992.

SINHA, S.; NEVETT, C.; SHUTTLEWORTH, C. A.; KIELTY, C. M. Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins. **Matrix Biol.** v. 17, p. 529-545. 1998.

- SMITH, D. R. **Urologia Geral**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. 505 p.
- SMITH, J. R.; FREIJE, D.; CARPTEN, J. D.; GRONBERG, H.; XU, J.; ISAACS, S. D. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome wide search. **Science**. v. 274, p. 1371-1374. 1996.
- SONG, C. Z.; TIAN, X.; GELEHRTER, T. D. Glucocorticoid receptor inhibits transforming growth factor- signaling by directly targeting the transcriptional activation function of Smad3. **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 96, p. 11776-11781. 1999.
- SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B.; WAKEFIELD, L. M.; GLICK, A. B.; DANIELPOUR, D. transforming growth factor-beta and suppression of carcinogenesis. **Princess Takamatsu Symp.** v. 20, p. 259-266. 1989.
- SROUGI, M. Câncer da Próstata. In: SCHOR, N.; SROUGI, M. **Nefrologia, Urologia, Clínica**. São Paulo: Sarvier, 1998. cap. 40, p. 225-240.
- SROUGI, M. **Próstata: isso é com você**. São Paulo: Publifolha, 2003. 125 p.
- SROUGI, M.; CURY, J. Hiperplasia Benigna da Próstata. In: SCHOR, N.; SROUGI, M. **Nefrologia, Urologia, Clínica**. São Paulo: Sarvier, 1998, cap. 6, p. 501-506.
- STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin. Cancer Biol.** v. 10, p. 415-433. 2000.
- STAMEY, T. A.; CALDWEL, M.; McNEAL, J. E.; NOLLEY, R.; HEMENEZ, M.; DOWNS, J. The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? **The Journal of Urology**. v. 172, p. 1297-1301. 2004.
- STAMEY, T. A.; McNEAL, J. E. Adenocarcinoma of the prostate. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. **Campbell's Urology**. vol. 2. 6ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. cap. 29, p. 1159-1221.
- STEENLAND, K.; RODRIGUEZ, C.; MONDUL, A.; CALLE, E. E.; THUN, M. Prostate cancer incidence and survival and relation to education (United States). **Cancer Causes and Control**. v. 15, p. 939-945. 2004.

- STEINER, M. S.; ZHOU, Z. Z.; TONB, D. C.; BARRACK, E. R. Expression of transforming growth factor- β 1 in prostate cancer. **Endocrinology**. v. 135, p. 2240-2247. 1994.
- STETLER-STEVENSON, W. G.; YU, A. E. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. **Semin. Cancer Biol.** v. 11, p. 143-153. 2001.
- STORY, M. T.; HOPP, K. A.; MEIER, D. A. Regulation of basic fibroblast growth factor expression by transforming growth factor beta in cultured human prostate stromal cells. **Prostate**. v. 28, p. 219-226. 1996.
- SUAREZ, B. K.; LIN, J.; BURMESTER, J. K.; BROMAN, K. W.; WEBER, J. L.; BANERJEE, T. K.; GODDARD, K. A.; WITTE, J. S.; ELSTON, R. C.; CATALONA, W. J.. A genome screen of multiplex sibships with prostate cancer. **Am. J. Hum. Genet.** v. 66, p. 933-944. 2000.
- SUTKOWSKI, D. M.; FONG, C. J.; SENSIBAR, J. A.; RADEMAKER, A. W., SHERWOOD, E. R.; KOSLOWSKI, J. M.; LEE, C. Interaction of epidermal growth factor and transforming growth factor beta in human prostatic epithelial cells in culture. **Prostate**. v. 21, p. 133-143. 1992.
- TAVTIGIAN, S. V.; SIMARD, J.; TENG, D. H.; ABTIN, V.; BAUMGARD. M.; BECK, A.; CAMP, N. J.; CARILLO, A. R.; CHEN, Y.; DAYANANTH, P.; DESROCHERS. M.; DUMONT, M.; FARNHAM, J. M.; FRANK, D.; FRYE, C.; GHAFFARI, S.; GUPTA, J. S.; HU, R.; ILIEV, D.; JANECKI, T.; KORT, E. N.; LAITY, K. E.; LEAVITT, A.; LEBLANC, G.; MCARTHUR-MORRISON, J.; PEDERSON, A.; PENN, B.; PETERSON, K. T.; REID, J. E.; RICHARDS, S.; SCHROEDER, M.; SMITH, R.; SNYDER, S. C.; SWEDLUND, B.; SWENSEN, J.; THOMAS, A.; TRANCHANT, M.; WOODLAND, A. M.; LABRIE, F.; SKOLNICK, M. H.; NEUHAUSEN, S.; ROMMENS, J.; CANNON-ALBRIGHT, L. A. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. **Nat. Genet.** v. 67, p. 172-180. 2001.
- THOMPSON, T. C.; TRUONG, L. D.; TIMME, T. L.; KADMON, D.; MCCUNE, B. K.; FLANDERS, K. C.; SCARDINO, P. T.; PARK, S. H. Transforming growth factor beta 1 as a biomarker for prostate cancer. **J. Cell Biochem. Suppl.** v. 16, p. 54-61. 1992.

- TRUONG, L. D.; KADMON, D.; MCCUNE, B. K.; FLANDERS, K. C.; SCARDINO, P. T.; THOMPSON, T. C. Association of transforming growth factor-beta 1 with prostate cancer: an immunohistochemical study. **Hum. Pathol.** v. 24, p. 4-9. 1993.
- TSUKAMOTO, S.; AKAZA, H.; ONOZAWA, M.; SHIRAI, T.; IDEYAMA, Y. A five-alpha reductase inhibitor or an antiandrogen prevents the progression of microscopic prostate carcinoma to macroscopic carcinoma in rats. **Cancer.** v. 82, p. 531-537. 1998.
- TSUKAZAKI, T.; CHIANG, T. A.; DAVISON, A. S.; ATTISANO, L.; WRANA, J. L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smads 2 to TGF beta receptor. **Cell.** v. 11, p. 779-791. 1998.
- UMBAS, R.; SCHALKEN, J. A.; AALDERS, T. W.; CARTER, B. S.; KARTHAUS, H. F.; SCHAAFSMA, H. E. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. **Cancer Res.** v. 52, p. 5104-5109. 1992.
- UNTERGASSER, G.; GANDER, R.; RUMPOLD, H.; HEINRICH, E.; PLAS, E.; BERGER, P. TGF- β cytokines increase senescence-associated beta-galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation process, but not cellular senescence. **Experimental Gerontology.** v. 38, p. 1179-1188. 2003.
- USICHENKO, T.; LATTERMANN, A.; MULLER-ECKHARDT, G. Serology versus ARMS-PCR in prospective HLA-class I typing for bone marrow transplantation. **Ann. Hematol.** v. 77, p. 97-100. 1998.
- VAN DE GRAAFF, K. M. Sistema genital masculino. In:_____. **Anatomia humana.** 6^a ed. São Paulo: Manole, 2003. cap. 20, p. 697-723.
- VERES, G.; GIBBS, R. A.; SCHERER, S. E.; CASKEY, C. T. The molecular basis of the sparse for mouse mutation. **Science.** v. 237, p. 415-417. 1987.
- VISAKORPI, T.; KALLIONIEMI, O. P.; HEIKKINEN, A.; KOIVULA, T.; ISOLA, J. Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 84, p. 883-887. 1992.

- WALSH, P. C. Benign Prostatic Hyperplasia. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. **Campbell's Urology**. vol. 1. 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. cap. 25, p. 1007-1027.
- WALSH, P. C.; WORTHINGTON, J. F. **Doenças da Próstata: um guia para os homens e para as mulheres que os amam**. São Paulo: Martins Fontes, 1998. 240p.
- WATANABE, M.; MASUYAMA, N.; FUKUDA, M.; NISHIDA, E. Regulation of intracellular dynamics of Smad 4 by its leucine-rich nuclear export signals. **EMBO Rep.** v. 1, p. 176-182. 2000.
- WEIR, H. K.; THUN, M. J.; HANKEY, B. F.; RIES, L. A.; HOWE, H. L.; WINGO, P. A.; JEMAL, A.; WARD, E.; ANDERSON, R. N.; EDWARDS, B. K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. **J. Natl. Can. Inst.** v. 95, p. 1276-1299. 2003.
- WETTON, J. H.; TSANG, C. S. F.; RONEY, C. A.; SPRIGGS, A. C. An extremely sensitive species-specific ARMS PCR test for the presence of tiger bone DNA. **Forensic Science International**. v. 126, p. 137-144. 2002.
- WHITE, T. J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction. **Technical Focus**. v. 5, p. 185-188. 1989.
- WIKSTROM, P.; BERGH, A.; DAMBER, J. E. Transforming growth factor-beta 1 and prostate cancer. **Scand. J. Urol. Nephrol.** v. 34, p. 85-94. 2000.
- WIKSTROM, P.; DAMBER, J.; BERGH, A. Role of transforming growth factor beta-1 in prostate cancer. **Microsc. Res. Tech.** v. 52, p. 411-419. 2001.
- WITTE, J. S.; GODDARD, K. A.; CONTI, D. V.; ELSTON, R. C.; LIN, J.; SUAREZ, B. K.; BROMAN, K. W.; BURMESTER, J. K.; WEBER, J. L.; CATALONA, W. J. Genomewide scan for prostate cancer-agressiveness loci. **Am. J. Hum. Genet.** v. 67, p. 92-99. 2000.
- WOLFF, J. M.; FANDEL, T. H.; BORCHERS, H.; JAKSE, G. Serum concentrations of transforming growth factor-beta 1 in patients with benign and malignant prostatic diseases. **Anticancer Res.** v. 19, p. 2657-2659. 1999.

- XIAO, Z.; WATSON, N.; RODRIGUEZ, Z.; LODISH, H. F. Nucleocytoplasmatic shuttling of Smad 1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signal. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 39404-39410. 2001.
- XU, J.; MEYERS, D.; FREIJE, D.; ISAACS, S.; WILEY, K.; NUSSKERN, D.; EWING, C.; WILKENS, E.; BUJNOVSZKY, P.; BOVA, G. S.; WALSH, P.; ISAACS, W.; SCHLEUTKER, J.; MATIKAINEN, M.; TAMMELA, T.; VISAKORPI, T.; KALLIONIEMI, O. P.; BERRY, R.; SCHAID, D.; FRENCH, A.; McDONNELL, S.; SCHROEDER, J.; BLUTE, M.; THIBODEAU, S.; TRENT, J. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. **Nature Genetics.** v. 20, p. 175-179. 1998.
- XU, J.; ZHENG, S. L.; HAWKINS, G. A.; FAITH, D. A.; KELLY, B.; ISAACS, S. D.; WILEY, K. E.; CHANG, B.; EWING, C. M.; BUJNOVSZKY, P.; CARPTEN, J. D.; BLEECKER, E. R.; WALSH, P. C.; TRENT, J. M.; MEYERS, D. A.; ISAACS, W. B. Linkage and association study of prostate cancer susceptibility: evidence for linkage at 8p22-23. **Am. J. Hum. Genet.** v. 69, p. 341-350. 2001.
- YANAGISAWA, J. Convergence of transforming growth factor- and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. **Science.** v. 283, p. 1317-1321. 1999.
- YANG, E.Y.; MOSES, H. L. Transforming growth factor 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. **J. Cell Biol.** v. 111, p. 731-741. 1990.
- YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes Dev.** v. 14, p. 163-176. 2000.
- ZACCHEO, T.; GIUDICI, D.; DI SALLE, E. Effect of early treatment of prostate cancer with 5 alpha-reductase inhibitor turosteride in Dunning R3327 prostatic carcinoma in rats. **Prostate.** v. 35, p. 237-242. 1998.
- ZAWEL, L.; DAI, J. L.; BUCKHAULTS, P.; ZHOU, S.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; KERN, S. E. Human Smad 3 and Smad 4 are sequence-specific transcription activators. **Mol. Cell.** v. 1, p. 611-617. 1998.

ZHANG, Y.; MUSCI, T.; DERYNCK, R. The tumor suppressor Smad4/DPC4 as a central mediator of Smad function. **Curr. Biol.** v. 7, p. 270-276. 1997.

ZHANG, Y.; FENG, X. H.; DERYNCK, R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF--induced transcription. **Nature.** v. 394, p. 909-913. 1998.

CAPÍTULO ÚNICO
ANÁLISE MOLECULAR DE POLIMORFISMOS
E EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR $\beta 1$ DE
TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO
(TGF- $\beta 1$) NO CÂNCER DE PRÓSTATA

ABSTRACT

The transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) is a multifunctional cytokine with several regulatory activities in a great number of tumor cells, affecting growth, differentiation, and function. Recently, it has been demonstrated that the TGF- β 1 may have a role as stimulator or inhibitor in different processes, depending on the level of cell differentiation. Alterations on gene expression, secretion, and regulation may lead to a favorable environment for tumor development. We have evaluated in this investigation the influence of the *TGFB1* polymorphisms, Leu10Pro (T and C alleles) and Arg25Pro (G and C alleles), on prostate cancer (PCa) predisposition, its relationship to mRNA levels and their implications in the disease development. For both polymorphisms detection, the PCR-ARMS was done on DNA samples from peripheral blood of 157 patients, 67 PCa and 90 BPH (benign prostatic hyperplasia). Multiplex semi-quantitative RT-PCR was performed on mRNA samples obtained from patients' leukocytes to evaluate gene expression relative levels in both groups, using as reference gene an internal control (β -2-microglobulin). Chi-square and logistic regression analyses were performed for both polymorphisms and RNA levels on all clinical parameters (histological classification, gleason score, TNM disease staging, PSA serum levels). CaP patients, with gleason score higher than 7, presented a higher frequency of the allele C (codon 10). This result suggests that this specific polymorphism may be implicated in the disease progression. However, no association was determined between polymorphisms and disease classification (patients groups). Patients with *TGFB1* transcripts serum levels equal or higher than 70% of that observed for the control gene presented a 3.35 times greater probability of having PCa ($CI_{95\%}$: 1.26-8.92). No association was detected among polymorphisms and mRNA levels. In this study, we have demonstrated that the polymorphism of the *TGFB1* codon 10 may be associated to disease progression. Additionally, we have also shown that higher mRNA levels are detected in peripheral blood cells of CaP patients, suggesting that tumor cells may be disseminated in circulation; therefore, a quantitative analysis may be required to understand its relationship to cancer development.

KEY-WORDS: prostate cancer, TGF- β 1, gene expression, polymorphisms.

RESUMO

O Fator $\beta 1$ de Transformação do Crescimento (TGF- $\beta 1$) é uma citocina multifuncional que possui várias atividades regulatórias em uma grande variedade de células, podendo afetar o crescimento, diferenciação e função destas. Recentes pesquisas têm demonstrado que o TGF- $\beta 1$ pode atuar como agente estimulatório ou inibitório desses processos, dependendo do grau de diferenciação das células. Alterações na sua expressão, secreção ou regulação podem levar a um ambiente favorável para o desenvolvimento do tumor. Nesse trabalho, buscou-se avaliar a influência dos polimorfismos do gene *TGFB1*, Leu10Pro (alelos T e C) e Arg25Pro (alelos G e C), na predisposição e progressão do câncer de próstata (CaP) e sua relação com os níveis de RNAm. Para a detecção dos polimorfismos, foi realizada a PCR-ARMS em amostras de sangue periférico de 157 pacientes, sendo 67 CaP e 90 HPB (hiperplasia prostática benigna). A RT-PCR semi-quantitativa multiplex foi utilizada para a análise da expressão gênica relativa em leucócitos de ambos os grupos, usando o gene β -2-microglobulina como controle interno. Análises de Qui-quadrado e regressão logística foram realizadas para ambos polimorfismos e níveis de RNAm em relação aos parâmetros clínicos (classificação histológica, Gleason, TNM e níveis séricos de PSA). Pacientes com CaP, com um escore de Gleason superior a 7, apresentaram uma maior frequência do alelo C (códon 10). Esse resultado sugere que esse polimorfismo específico pode estar implicado com a progressão da doença. No entanto, não foi observada associação entre os polimorfismos e os grupos de pacientes. Pacientes com níveis séricos de transcritos *TGFB1* iguais ou maiores que 70% daquela observada para o gene controle, apresentaram uma probabilidade 3.35 vezes maior de desenvolver o CaP ($CI_{95\%}$: 1.26-8.92). Não foi observada associação entre os polimorfismos e os níveis de RNAm. No presente estudo, demonstramos que o polimorfismo do códon 10 do gene *TGFB1* pode estar associado à progressão do câncer. Além disso, também demonstramos que altos níveis de RNAm foram detectados no sangue periférico de pacientes com CaP, sugerindo que as células tumorais podem estar disseminadas na circulação,

contudo, uma análise quantitativa deve ser realizada para entender a sua relação com o desenvolvimento do câncer.

PALAVRAS-CHAVE: câncer de próstata, TGF- β 1, expressão gênica, polimorfismos.

1- INTRODUÇÃO

Vários genes têm sido associados à ocorrência e progressão do câncer esporádico de próstata. A razão para tanta atenção direcionada à elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no processo da carcinogênese prostática deve-se ao fato de que eles podem prover meios mais rápidos e eficazes para o diagnóstico, monitoramento e tratamento dessa doença (PORKKA; VISAKORPI, 2004), que é, atualmente, o tumor sólido não-cutâneo mais comumente diagnosticado entre os homens idosos (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

Estudos têm sido realizados na tentativa de associar polimorfismos nesses genes e a ocorrência do câncer de próstata, bem como sua progressão. O estudo de expressão gênica, em diferentes amostras, também podem fornecer importantes informações, quantitativas e qualitativas, sobre o desenvolvimento e estadiamento da doença (OLIVEIRA-JR, 2003).

O Fator $\beta 1$ de Transformação do Crescimento (TGF- $\beta 1$), um polipeptídeo dimérico de 25 KDa (DERYNCK et al., 1985), é um potente e multifuncional modulador da proliferação e diferenciação celular e, também, da produção e degradação da matrix extracelular (MASSAGUE, 1990; SPORN; ROBERTS, 1990).

O gene que codifica para o TGF- $\beta 1$ está localizado no braço longo cromossomo 19, na posição 13 (19q13), contendo em sua seqüência 7 éxons separados por 6 longos íntrons (FUJII et al., 1986; DERYNCK et al., 1987).

É sabido que o TGF- $\beta 1$ exerce efeitos positivos e negativos nos diferentes estágios da progressão maligna. Nas fases iniciais, o TBGF- $\beta 1$ funciona como um potente supressor de tumor (REISS, 1999). Contudo, em um certo ponto durante o desenvolvimento tumoral, ele pode estimular a angiogênese (IRUELA-ARISPE; SAGE, 1993) e suprimir o sistema imune (RUSCETTI et al., 1993), favorecendo, assim, o potencial invasivo e metastático das células cancerosas (WELCH et al., 1990).

Uma aumentada expressão dessa citocina tem sido detectada tanto em amostras de tecido quanto no plasma de pacientes em estágios avançados de diferentes tipos de tumores sólidos, tais como mama (WALKER; DEARING, 1992;

DALAL et al., 1993; IVANOVIC et al., 2003), colo (ROBSON et al., 1996; TSUSHIMA et al., 1996), próstata (IVANOVIC et al., 1995, 1998; SHARIAT et al., 2004) e bexiga (EDER et al., 1996).

Vários estudos têm demonstrado que mutações somáticas no TGF- β 1 e em outros componentes da sua via de sinalização, também estão associadas ao desenvolvimento de tumores (BARTSCH et al., 1999; KLEEFF et al., 1999; MARKOWITZ, 2000; LI et al., 2004).

Dentre os polimorfismos encontrados no gene que codifica para o TGF- β 1 (*TGFB1*), duas mutações de ponto, nos códons 10 e 25, localizados dentro da seqüência do peptídeo sinal (CAMBIEN et al., 1996), têm sido relacionadas a variações nos níveis séricos da proteína (ARKWRIGHT et al., 2000; DUNNING et al., 2003; EWART-TOLAND et al., 2004). O primeiro (Leu10Pro) é uma transição de timina pra citosina e o seguinte (Arg25Pro), de guanina pra citosina. Em ambos os casos, o aminoácido resultante da mutação é uma prolina.

No presente estudo, objetivou-se avaliar a expressão gênica do TGF- β 1 em amostras de sangue periférico de pacientes com adenocarcinoma da próstata e hiperplasia prostática benigna, por meio da técnica de RT-PCR semi-quantitativa, correlacionando-a ao quadro clínico dos pacientes, estadiamento da doença e, também, à presença dos polimorfismos Leu10Pro e Arg25Pro.

2 – PACIENTES E MÉTODOS

2.1 – Obtenção e Estocagem do Material Biológico

As amostras de sangue periférico dos pacientes com HPB e CaP foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia, mediante autorização dos pacientes, os quais assinaram Termo de Consentimento (*Anexo I*). O procedimento de coleta foi realizado dentro da rotina do setor cirúrgico, sem causar desconforto adicional aos pacientes.

As amostras foram coletadas em tubo tipo *vacutainer*TM contendo K₂EDTA 7,2 mg. Após a coleta, o material foi levado para o Laboratório de Genética Molecular, INGEB/UFU, e armazenado à 4°C para posterior processamento.

Foram analisadas 157 amostras de sangue periférico, sendo 67 e 90 provenientes de pacientes com CaP e HPB, respectivamente. A média de idade dos pacientes foi de 68 anos \pm 8,7 (\pm Desvio Padrão). Para a análise de expressão gênica, foram selecionados ao acaso 92 amostras representativas da população, sendo 33 de pacientes com CaP e 59 com HPB.

Todas as técnicas de manipulação do material biológico seguiram normas do Código de Ética Médica, sendo que o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFU (*Anexo I*). Os pacientes foram identificados por seus números de prontuários.

2.2 – Extração de DNA

O DNA de sangue periférico foi extraído seguindo-se os procedimentos descritos no protocolo anexo, otimizado no Laboratório de Genética Molecular da UFU (*Anexo III*).

Três microlitros do DNA genômico foram analisados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 0,8 %, tampão TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X, corado com 0,5 μ g/ml de brometo de etídio e visualizado por luz

ultravioleta (sistema de videodocumentação – VDS *Image Master* - Pharmacia Biosciences). Após avaliação, o ácido desoxirribonucleico foi armazenado a -20°C.

2.3 – Extração de RNA

O RNA total foi extraído segundo procedimentos descritos por Chomczynski and Sacchi (1987) com algumas modificações (*anexo IV*).

O padrão do RNA foi verificado em gel de agarose 1,5% por 1 hora a 100 volts em tampão TBE (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0) 0,5X, corado com 0,5 mg/ml de brometo de etídio e, em seguida, visualizado no sistema de videodocumentação *Image System* - VDS (Pharmacia Biosciences). A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro Ultrospech 1000 de luz ultravioleta (Pharmacia Biosciences) a um comprimento de onda de 260 nm. A qualidade do RNA extraído foi também verificada por meio da relação entre as leituras espectrofotométricas 260/280 nm. Em seguida, o material foi armazenado a -80°C.

2.4 – PCR-ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*)

As concentrações dos reagentes nas reações de amplificação para ambos os polimorfismos estudados, Leu10Pro e Arg25Pro, foram semelhantes. As reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.), em um volume final de 25 µl, contendo: 200 µM de dNTPs ; 5 pmoles de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase; 1X do tampão da Taq (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3) e 200 ng de DNA. O volume final foi completado com água ultrapura. Para cada códon foram realizadas duas reações de PCR por amostra analisada, uma para cada alelo polimórfico. O *primer* reverso foi comum a todas as reações, e os *primers* diretos, alelo-específicos (GEWALTIG et al., 2002). O gene *DD3* (que codifica para um RNA não traduzido) foi co-amplificado

em todas as reações como controle interno positivo, utilizando-se *primers* desenhados com o auxílio do *software* Primer Designer, versão 2.0 e do *software* Oligo Tech, versão 1.0. Foram realizadas também reações controles, com água no lugar do DNA, para a verificação de possíveis contaminações exógenas. As seqüências de todos os *primers* utilizados estão descritas na TABELA 1.

As condições da ciclagem térmica foram as seguintes: uma desnaturação inicial de 95°C por 10 min; 3 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), hibridação (62°C ou 63°C por 1 min) e extensão (72°C por 1 min); 35 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), hibridação (62°C ou 63°C por 40 s) e extensão (72°C por 50 s); seguidos por uma extensão final de 72°C por 10 min. A temperatura de hibridação foi diferente para cada um dos polimorfismos, utilizou-se 62°C e 63°C para os códons 25 e 10, respectivamente.

TABELA 1: Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na genotipagem por PCR-ARMS.

Primers	Seqüência 5'→3'	Fragmento
TGF reverso	TGC TGT TGT ACA GGG CGA GCA	
TGFdireto alelo Leu10	TCC GGG CTG CGG CTG CTG CT	241 pb
TGFdireto alelo Pro10	TCC GGG CTG CGG CTG CTG CC	241 pb
TGFdireto alelo Arg25	ACT GGT GCT GAC GCC TGG CCG	197 pb
TGFdireto alelo Pro25	ACT GGT GCT GAC GCC TGG CCC	197 pb
DD3 direto	TTG CAT TAG GTC TCA GCT GG	
DD3 reverso	GGC ATT CAG GTT AGT GGT GG	631 pb

2.5 – RT (Transcrição Reversa)

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 2 µg de RNA total, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Pharmacia), 1X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Pharmacia), 126 pmoles de 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de

oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. O volume final de cada reação foi completado para 20 µl com água tratada com DEPC. A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) a 37°C por 1 hora e aquecida a 95°C por 5 minutos para desnaturação do híbrido RNA-cDNA e também para inativação da enzima MMLV-RT. Reações controle foram realizadas para verificação de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA foi estocado a -20°C para posterior amplificação.

2.6 – PCR Multiplex Semi-quantitativa

O produto da transcrição reversa (cDNA) foi co-amplificado, em duplicata para cada amostra, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando-se dois diferentes pares de *primers*, um desenhado para hibridar com o gene *TGFB1* e o outro com o gene constitutivo que codifica para a β-2-microglobulina (*B2M*), que foi utilizado como controle interno da reação para caracterizar a qualidade do RNA e normalizar os níveis de expressão do gene alvo.

Os *primers* para o gene *TGFB1* foram desenhados utilizando-se o *software* Primer Designer, versão 2.0 e do *software* Oligo Tech, versão 1.0. As seqüências são as seguintes: direto: 5'-CCA ACT ATT GCT TCA GCT CC-3' e reverso: 5'-GGT TAT GCT GGT TGT ACA GG-3'. O *primer* direto inclui a junção entre os éxons 5 e 6, permitindo, assim, a amplificação seletiva de RNAs mensageiros. Os *primers* para o gene *B2M*, anteriormente descritos por Bussemakers et al. (1999), contêm as seguintes seqüências: direto: 5'-ACG AGA GAA TGG AAA GTC AAA-3', reverso: 5'-TGT TGA TGT TGG ATA AGA GAA-3'.

Em fases de otimização, a PCR foi realizada para cada gene separadamente com o intuito de se verificar o nível de competição entre os pares de *primers*.

Para a realização das análises semi-quantitativas, foi também necessária a determinação do número ideal de ciclos de PCR para que a co-amplificação estivesse na fase exponencial e não na fase de platô. Para isso foram feitas reações de PCR com 27, 29, 31, 33, 35 e 37 ciclos, em um paciente

com CaP e um com HPB escolhidos ao acaso. O ciclo térmico constituiu-se de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min, seguida de ciclos a 94°C por 40 s, 59°C por 40 s e 72°C por 50 s. Os tubos foram gradativamente retirados a cada ciclo de interesse e, terminado o último ciclo, todos os tubos foram recolocados no termociclador para uma extensão final a 72°C por 5 min.

Para cada reação de PCR, 4 µl de cada cDNA, sintetizados na transcrição reversa, foram utilizados como molde em um volume final de 25 µl contendo 200 µM de dNTPs; 10 pmoles de cada *primer* TGF-β1 e 5 pmoles de *primers* β-2-microglobulina; 2,0 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e 1X do tampão da Taq (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3). O volume final foi completado com água ultrapura.

Para cada 10 µl do produto amplificado foram adicionados 2 µl *loading dye* (12,5 mg de azul de xileno cianol; 4,0 g de sacarose e 5,0 ml de água) e, em seguida, foram analisados, por eletroforese, em gel de agarose 1,5% por 1 hora a 100 volts em tampão TBE 0,5X (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados com 0,5 mg/ml de brometo de etídio e, posteriormente, visualizados e fotografados pelo sistema de vídeo documentação *Image Master - VDS* (Pharmacia Biosciences).

2.7 – Análise por Densitometria Óptica

Os produtos de amplificação obtidos a partir das amostras de adenocarcinoma e de HPB, tanto para o gene *TGFB1* como para o gene *B2M*, foram analisados e quantificados quanto às suas densidades óticas no programa *Image Master VDS Software*, versão 2.0 e as leituras foram submetidas à razão de RNAm TGF-β1 / RNAm β-2-microglobulina para se obter a abundância relativa do gene *TGFB1* nas amostras analisadas.

2.8 – Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo *software* Statistica versão 5.5A (STATISTICA, 1999). A análise do qui-quadrado foi realizada para os polimorfismos do *TGFB1*, Leu10Pro e Arg25Pro, para determinar se estas variações gênicas predisõem os indivíduos ao desenvolvimento de câncer de próstata e se, também, estão associados à progressão do mesmo, por meio da análise conjunta com os parâmetros clínicos: PSA, idade do paciente, estadiamento anátomo-patológico dos adenocarcinomas (Whitmore-Jewett e TNM *Tumor-Node-Metastasis*) e escore de Gleason. A regressão logística foi aplicada para os níveis relativos de mRNA do *TGFB1* no sangue periférico para determinar se este gene é capaz de discriminar pacientes com câncer de próstata e hiperplasia benigna. O odds ratio da concentração relativa de mRNA no sangue periférico foi calculado para determinar a chance de um indivíduo desenvolver o CaP. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3 – RESULTADOS

Tanto o DNA quanto o RNA extraídos das amostras foram de boa qualidade, não apresentando contaminação.

Não foi necessário tratar o RNA com a enzima DNase, uma vez que os *primers* foram desenhados para hibridar em junções entre éxons, evitando, assim, a amplificação a partir de possível DNA contaminante.

Na FIGURA 1 estão os padrões de genotipagem obtidos pela técnica de PCR-ARMS para os dois polimorfismos, com todos os genótipos encontrados na população analisada. O gene *DD3* foi co-amplificado em todas as amostras, demonstrando a alta qualidade do DNA, o sucesso das reações e a calibração de cada amostra.

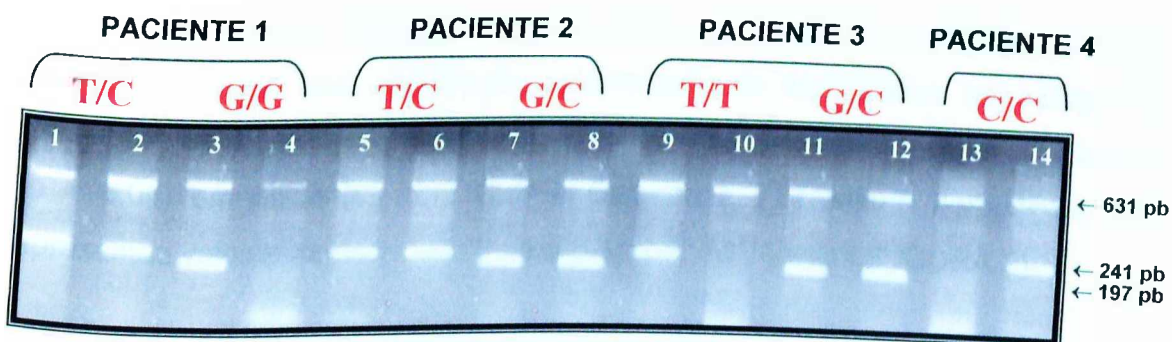


FIGURA 1: Genotipagem de 4 pacientes por PCR-ARMS. Colunas 1, 5, 9 e 13 representam as reações específicas para o alelo Leu10, e colunas 2, 6, 10 e 14 para o alelo Pro10. As colunas 3, 7 e 11 representam reações para o alelo Arg25, e as colunas 4, 8 e 12 para o alelo Pro25.

A análise dos polimorfismos do gene *TGFB1* mostrou que as frequências genotípicas não diferiram significativamente entre os grupos de pacientes analisados, com os valores de *p* iguais a 0,31 e 0,28 para os códons 10 e 25, respectivamente (TABELA 2).

TABELA 2: Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos Leu10Pro e Arg25Pro, observadas nos grupos de pacientes com CaP e HPB.

POLIMORFISMOS		GRUPOS DE PACIENTES	
CODON 10	CÓDON 25	CaP (n=67)	HPB (n=90)
Alelos		Frequências Alélicas	
T	-	82 (61,1%)	104 (57,8%)
C	-	52 (38,8%)	76 (42,2%)
-	G	130 (97,0%)	171 (95,0%)
-	C	4 (3,0%)	9 (5,0%)
Genótipos		Frequências Genóticas	
T/T	-	20 (29,8%)	22 (24,4%)
T/C	-	42 (62,7%)	60 (66,7%)
C/C	-	5 (7,5%)	8 (8,9%)
-	G/G	63 (94,1%)	81 (90,0%)
-	G/C	4 (5,9%)	9 (10,0%)
-	C/C	0 (0%)	0 (0%)

Quando analisado o quadro clínico dos pacientes, o polimorfismo do códon 10 mostra uma associação estatisticamente significativa em relação à gradação histológica de Gleason; onde, existe uma prevalência maior do alelo C ($p = 0,04$) em pacientes com CaP e Gleason ≥ 7 . Nenhum homocigoto CC apresentou valores menores que 7 para o escore de Gleason (FIGURA 2).

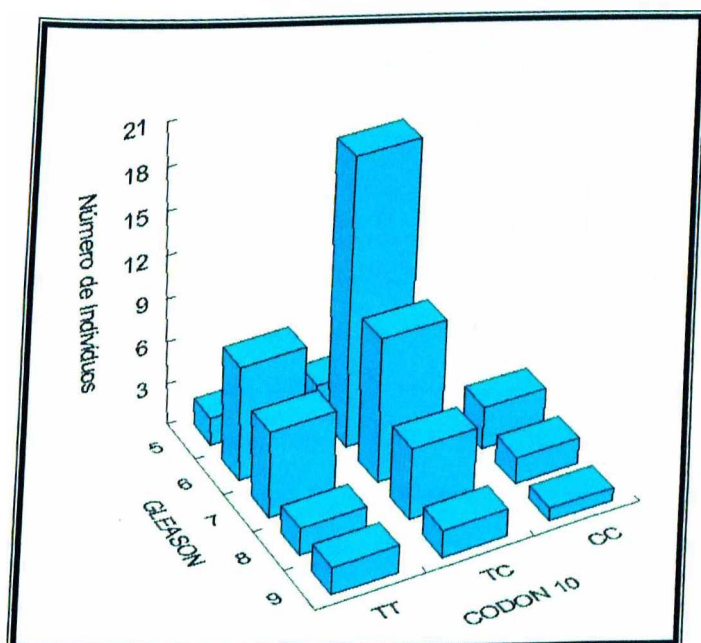


FIGURA 2: Distribuição dos pacientes quanto aos valores da gradação histológica de Gleason em função dos respectivos genótipos para o Códon 10.

Em relação aos outros parâmetros analisados, inclusive a expressão gênica do gene *TGFB1*, nenhum dos códon apresentou associações estatisticamente significativas, como mostra a TABELA 3.

TABELA 3: Probabilidade de associações obtidas pelo teste do χ^2 .

POLIMORFISMOS	VARIÁVEIS			
	[RNA]	Gleason	TNM	PSA
Códon 10	0,53	0,04*	0,95	0,55
Códon 25	0,61	0,75	0,13	0,17

* Estatisticamente significativo.

A PCR realizada para o gene constitutivo *B2M* e para o gene alvo *TGFB1*, separada e conjuntamente, mostrou não haver competição direta prejudicial entre os dois fragmentos, podendo a PCR semi-quantitativa multiplex ser realizada com eficiência, sem riscos de interpretações errôneas. Dois pacientes foram escolhidos aleatoriamente para o teste. (FIGURA 3).

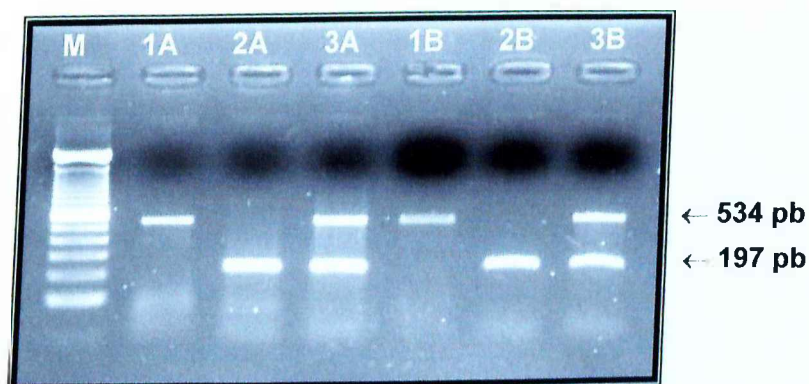


FIGURA 3: Teste de RT-PCR-multiplex para os genes *B2M* e *TGFB1*. Onde: M - marcador de 100 pb; A e B - pacientes; 1 - fragmento amplificado para o controle interno *B2M*; 2 - fragmento amplificado para o gene alvo *TGFB1*; 3 - Co-amplificação de ambos os genes.

O número de ciclos de PCR foi experimentalmente determinado para a análise semi-quantitativa, como mostrado na FIGURA 4a. 33 ciclos foram escolhidos para a realização das reações, pois como mostra o gráfico (FIGURA 4b, ambas amplificações encontram-se na fase exponencial).

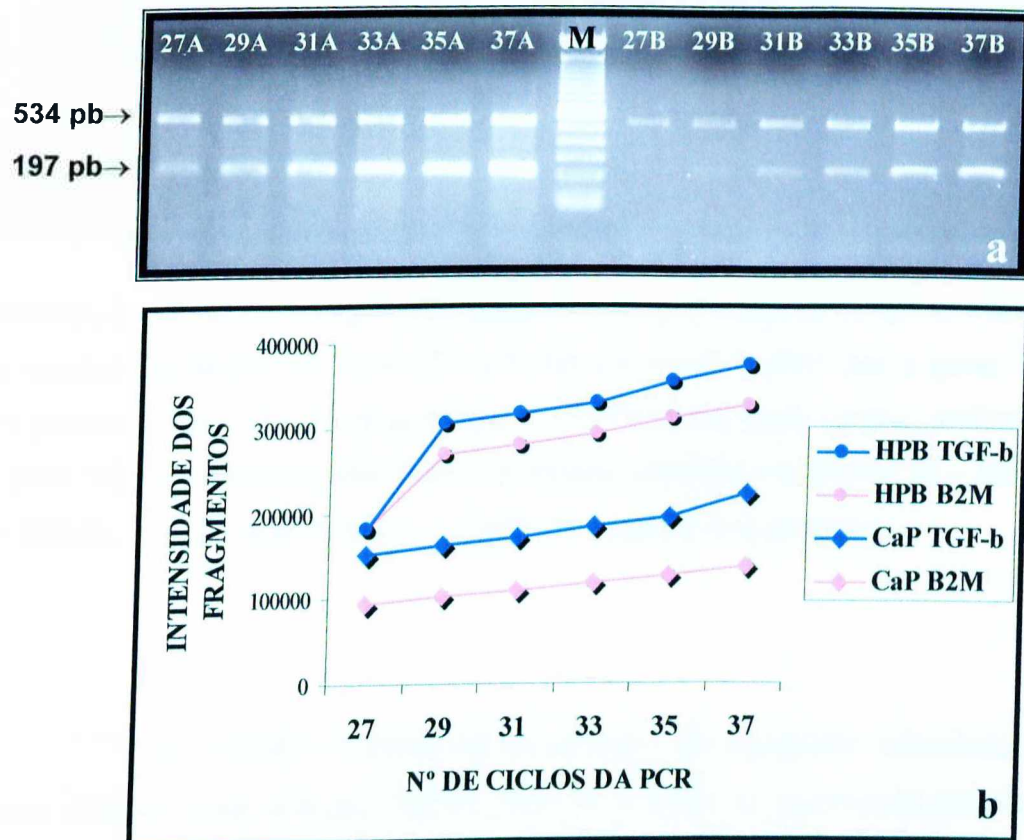


FIGURA 4: Otimização do número de ciclos da RT-PCR semi-quantitativa para o gene *TGFβ1*. a) Reações variando de 27 a 37 ciclos, realizadas para dois pacientes, A e B, com CaP e HPB, respectivamente; M) Marcador de 100 pb; b) Gráfico com as intensidades dos fragmentos amplificados e visualizados no gel acima, *versus* o número de ciclos da PCR.

As FIGURAS 5A e 5B mostram, respectivamente, a RT-PCR multiplex semi-quantitativa do gene *TGFβ1* em sangue periférico de pacientes com CaP e HPB.

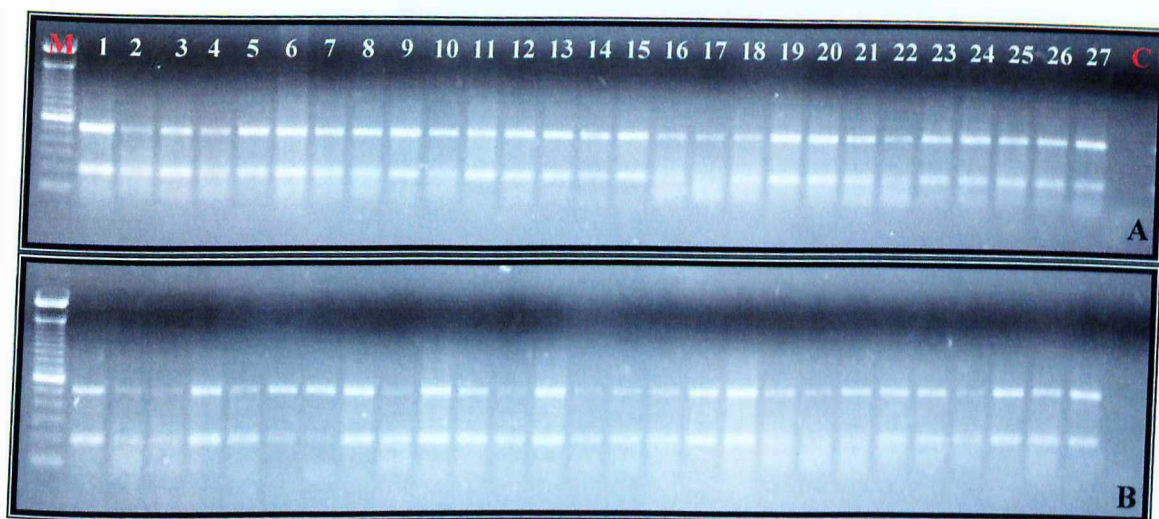
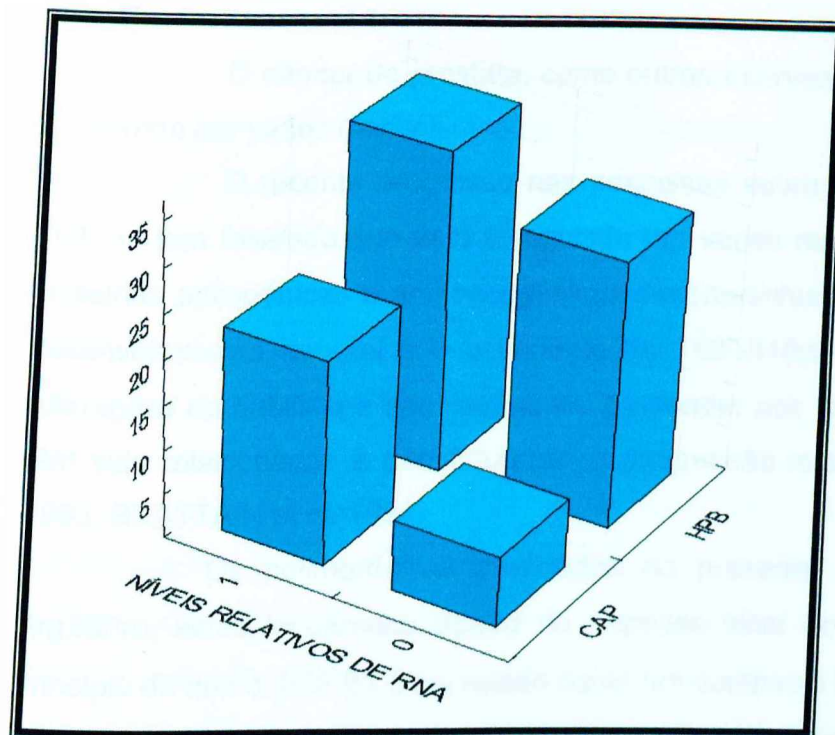


FIGURA 5: RT-PCR multiplex semi-quantitativa pra o gene *TGFB1* em amostras de sangue periférico. A) RT-PCR multiplex semi-quantitativa pra o gene *TGFB1* em pacientes com câncer de próstata. B) RT-PCR multiplex semi-quantitativa pra o gene *TGFB1* em pacientes com hiperplasia prostática benigna. M – Marcador de 100 pb. 1 a 27 – Pacientes. C – Controle negativo das reações.

Na FIGURA 6 estão as freqüências de expressão utilizando-se os dados obtidos pela relação RNAm TGF- β 1 / RNA m β -2-microglobulina. Se considerado um valor de corte para abundância relativa do RNAm do gene *TGFB1* igual a 0,7, observa-se uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,029$) entre os pacientes com CaP e HPB. Mesmo havendo um maior acúmulo de pacientes com os níveis relativos de RNA $\geq 0,7$ em ambos os grupos, a diferença entre os pacientes com câncer de próstata foi maior.

Foi observado um risco aumentado em 3,35 vezes ao desenvolvimento do câncer de próstata quando os níveis séricos de RNAm do gene *TGFB1* excedem 0,7 (OR = 3,35; IC_{95%} = 1,26 – 8,92).

As médias obtidas para a abundância relativa do gene *TGFB1*, idade, PSA e Gleason nos dois grupos de pacientes analisados são mostradas na TABELA 4.

**LEGENDA**

0 - < 0,7

1 - ≥ 0,7

FIGURA 6: Gráfico da abundância relativa para o gene *TGFB1* nos grupos de pacientes com câncer de próstata (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB).

TABELA 4: Análise estatística descritiva dos parâmetros clínicos (idade) e laboratoriais (níveis séricos de PSA, escore histológico de Gleason e níveis relativos de RNAm do gene *TGFB1*) analisados para pacientes com câncer de próstata e hiperplasia benigna.

PARÂMETROS	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESV. PAD.
CaP					
[RNA]	33	1,027	0,37	1,93	0,437
IDADE	67	67,772	50	87	8,637
PSA	41	3,505	0,002	62,3	10,275
GLEASON	63	6,698	4	9	1,101
HPB					
[RNA]	59	0,873	0	1,95	0,466
IDADE	90	67,522	47	87	8,953
PSA	32	8,772	0,35	25,3	6,278
GLEASON	-	-	-	-	-

4 – DISCUSSÃO

O câncer de próstata, como outros tumores, é um evento complexo e causado por vários mecanismos.

O recente progresso nas pesquisas sobre a via de sinalização do TGF- β 1 tem revelado que esta é regulada por vários mecanismos, e que várias proteínas oncogênicas e anti-oncogênicas desempenham importantes papéis no desenvolvimento tumoral sob o controle do TGF- β 1 (MIYAZONO et al., 2003). Alterações na habilidade das células em responder aos estímulos dessa citocina têm sido relacionadas à transformação e progressão malignas (FYNAN; REISS 1993; BRATTAIN et al. 1994).

Os polimorfismos analisados no presente trabalho, Leu10Pro e Arg25Pro, estão localizados dentro do peptídeo sinal do TGF- β 1. Partindo do princípio de que o TGF- β 1 é secretado como um complexo latente e necessita ser ativado para ser capaz de se ligar aos seus receptores desencadear seu sinal, a presença de seqüências alteradas dentro do peptídeo direcionador da proteína bioativa poderia ser a responsável pelo comportamento refratário à sinalização do TGF- β 1 característico das células tumorais nos estágios mais avançados da progressão maligna.

A substituição de aminoácidos com polaridades distintas, observada no polimorfismo Leu10Pro (leucina→prolina), afeta drasticamente a conformação tridimensional da proteína, rompendo a estrutura em alfa-hélice característica da região e, conseqüentemente, fazendo com que ela perca a sua habilidade em direcionar o TGF- β 1 ativo intracelularmente (RANDALL; HARDY, 1989). Esse fato estaria impedindo uma transdução eficaz dos sinais anti-proliferativos e pró-apoptóticos do TGF- β 1 favorecendo, assim, a expansão clonal das células tumorais TGF- β 1-refratárias.

Nenhum dos genótipos encontrados na população analisada foi útil para diferenciar os pacientes com adenocarcinoma da próstata e hiperplasia prostática benigna. Contudo, foi observada uma tendência entre os pacientes portadores do alelo C, no códon 10, em apresentar um escore de Gleason maior

ou igual a 7, sendo que nenhum homocigoto para alelo em questão apresentou valores inferiores a este.

Esses dados sugerem que a presença do alelo C no códon 10 do gene *TGFB1* pode não ser um fator predisponente para o desenvolvimento do câncer de próstata, porém, possivelmente, está envolvida nos eventos relacionados à progressão da doença uma vez instalada, confirmando os achados sobre as mudanças conformacionais na molécula do TGF- β 1 condicionadas pelo polimorfismo no códon 10 (RANDALL; HARDY, 1989), impedindo uma transdução eficaz dos sinais anti-proliferativos e pró-apoptóticos e favorecendo a expansão clonal das células.

A técnica de PCR-ARMS mostrou-se bastante eficiente na genotipagem dos pacientes para ambos os polimorfismos analisados. É um método simples, rápido e com um custo relativamente baixo, se comparado ao uso de enzimas de restrição, o que favorece muito o estudo em grandes populações. Contudo, a maior vantagem dessa metodologia é, sem dúvida, a segurança, já confirmada em outros trabalhos (USICHENKO et al., 1998; MONTANARO; ARCIOLA, 2002; WETTON et al., 2002). O gene *DD3* foi utilizado como controle interno positivo com sucesso, sendo amplificado em 100% das amostras, garantindo o processo de amplificação e evitando falsos genótipos.

A presença do alelo C tem sido relacionada aos níveis plasmáticos da proteína e do RNAm do TGF- β 1 com resultados controversos. Ziv e colaboradores (2001) descreveram que mulheres caucasianas com idade média de 65 anos e portadoras do genótipo CC, têm menor risco de desenvolverem câncer de mama se comparadas àquelas com genótipo TT e TC. Segundo Arkwright et al. (2000), os genótipos que codificam para prolina em ambos os polimorfismos, códon 10 e 25, estão associados a uma menor produção de TGF- β 1 *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, Dunning e colaboradores (2003) encontraram resultados opostos, mostrando que o alelo C para o códon 10 está recessivamente associado a um acréscimo no risco de desenvolvimento do câncer de mama invasivo, acompanhado por um aumento de 2,8 vezes nas taxas de secreção do TGF- β 1. No câncer de próstata, Li et al. (2004) relataram em um estudo na população japonesa, um maior risco de desenvolvimento de CaP e HPB em homens portadores dos genótipos TT e TC.

Contudo, não é claro se essas descobertas se aplicam a quaisquer populações. Neste estudo, não foi encontrada correlação significativa entre o polimorfismo Leu10Pro e os níveis séricos de RNAm do TGF- β 1.

No presente trabalho foi usada a RT-PCR semi-quantitativa para a análise de expressão gênica. É um método bastante eficaz para estimar a quantidade relativa de uma mensagem em várias populações de RNA (SANTAGATI et al., 1997). As transcrições reversas aqui realizadas, utilizando *primers* hexanucleotídeos randômicos, como descrito por Santagati et al. (1997) e por Pernas-Alonso et al. (1999), foram mais efetivas para a síntese dos cDNAs dos transcritos do gene *TGFB1* e *B2M*, por terem sido realizadas a partir de uma simples preparação de RT. Além disso, a utilização do controle endógeno no ensaio de RT-PCR fornece uma comparação direta entre múltiplas amostras e tem várias outras vantagens. Primeiro, sua detecção após a RT e a PCR indica o sucesso nesses dois passos. Segundo, a quantidade de cDNA correspondente ao marcador endógeno é um indicador do grau de degradação e pureza da amostra. E terceiro, o controle interno compensa a variabilidade entre os ensaios de RT-PCR (PERNAS-ALONSO et al., 1999).

Tem sido demonstrado que resultados obtidos por análises de Q-PCR absoluta têm validado resultados de análises comparativas que utilizam um controle interno com uma correlação acima de 95%. Sendo assim, uma análise comparativa é um procedimento adequado e consistente para investigar níveis de expressão gênica e não é dependente de níveis absolutos de expressão (ROSE MEYER et al., 2003).

Assim como Shariat et al. (2004) que encontraram níveis de TGF- β 1 mais elevados em pacientes com CaP quando comparados a indivíduos saudáveis, a análise semi-quantitativa desenvolvida neste estudo mostrou haver uma associação positiva entre o aumento na expressão sérica do gene *TGFB1* e a ocorrência do câncer de próstata. Os resultados obtidos para a expressão gênica do gene *TGFB1* permitiram a obtenção de um valor de corte para os níveis relativos de RNAm no sangue (IOD RNAm TGF- β 1 / RNAm β -2-microglobulina), o qual resultou em um valor de 0,7; o que significa um nível de expressão de 70% para o gene *TGFB1* em comparação à densidade ótica observada para o controle interno *B2M*. Considerando o valor de corte, pacientes com expressão igual ou

excedente aos 70% do valor referência do gene constitutivo apresentam um risco relativo aumentado em 3,35 vezes para a ocorrência do câncer de próstata.

Vale ressaltar que a análise semi-quantitativa multiplex só foi possível porque os *primers* apresentavam mesma temperatura de hibridação e não houve competição prejudicial dos *primers* pelos reagentes. Quando a competição interfere na amplificação de um dos genes ou os *primers* não são compatíveis com as condições da reação, as amplificações devem ser realizadas em tubos separados (DIAS-OLIVEIRA, 2002).

Esses dados sugerem que, além dos múltiplos fatores envolvidos, é possível que as significativas alterações nos níveis séricos do RNAm do *TGFB1* aqui encontradas, possam estar associadas à disseminação de células tumorais, uma vez que sua expressão é muito maior em amostras de tecidos prostáticos cancerosos quando comparados a tecidos hiperpásicos (STEINER et al., 1994; SHARIAT et al., 2004). Todavia, é preciso ser elucidado se os altos níveis plasmáticos de TGF- β 1 têm um papel causativo na progressão do CaP ou se eles meramente refletem a reação sistêmica como resultado do estado avançado da doença (LI et al., 2004).

Tendo em vista as altas prevalências e mortalidade do câncer de próstata, qualquer tentativa no sentido de melhorar o entendimento de suas causas e buscar novos e mais eficazes meios para seu tratamento e prevenção, é válida. De acordo com os dados aqui obtidos, progressivas alterações na expressão, secreção e regulação do TGF- β 1 podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento e progressão dessa doença. Resultados estes de considerável interesse, pois fornecem informações a respeito de um alvo terapêutico potencial para o câncer, com implicações tanto no diagnóstico precoce quanto no tratamento do mesmo.

Diante dos resultados, propõe-se a quantificação de transcritos em sangue periférico associada à análise do polimorfismo no códon 10 do gene *TGFB1* para discriminar pacientes com potencial de desenvolver uma doença metastática, ou seja, pacientes com altos níveis de transcritos e com os genótipos desfavoráveis (TC e CC) são mais predispostos à progressão mais rápida do câncer. A ausência de transcritos ou a detecção de baixos níveis do gene *TGFB1* em pacientes com biópsias positivas para o Cap sugerem uma doença confinada

ao órgão. Esta proposta deve ser confirmada em um número maior de pacientes, com diferentes estágios da doença, além de tentar associar tais resultados a outros biomarcadores para o câncer de próstata.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARKWRIGHT, P. D.; LAURIE, S.; SUPER, M.; PRAVICA, V.; SCHWARZ, M. J.; WEBB, A. K.; HUTCHINSON, V. TGF- β 1 genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. **Thorax**. v. 55, p. 459-462. 2000.

BARTSCH, D.; HAHN, S. A.; DANICHECKSKI, K. D.; RAMASWAMY, A.; BASTIAN, D.; GALEHDARI, H.; BARTH, P.; SCHMIEGEL, W.; SIMON B.; ROTHMUND, M. Mutations of the DPC4/Smad4 gene in neuroendocrine pancreatic tumors. **Oncogene**. v. 18, p. 2367-2371. 1999.

BRATTAIN, M. G.; HOWELL, G.; SUN, L.; WILLSON, J. K. V. Growth factor balance and tumor progression. **Curr. Opin. Oncol.** v. 6, p. 77-81. 1994.

BUSSEMAKERS, M. J.; BOKHOVEN, A.; van VERHAEGH, G. W.; SMIT, F. P.; KARTHAUS, H. F.; SCHALKEN, J. A.; DEBRUYNE, F. M.; RU, N.; ISAACS, W. B. DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. **Cancer Research**. v. 59, p. 5975-5979. 1999.

CAMBIEN, F.; RICARD, S.; TROESCH, A.; MALLET, C.; GENERENAZ, L.; EVANS, A.; ARVEILER, D.; LUC, G.; RUIDAVETS, J. B.; POIRIER, O. Polymorphisms of the transforming growth factor- β 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. **Hypertension**. v. 28, p. 881-887. 1996.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**. v. 162, p. 156-159. 1987.

DALAL, B. I.; KEWON, P. A.; GREENBERG, A. H. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor β 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. **Am. J. Pathol.** v. 143, p. 381-389. 1993.

DERYNCK, R.; JARRET, J. A.; CHEN, E. Y.; EATON, D. H.; BELL, J. R.; ASSOIAN, R. K.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B.; GOEDDEL, D. V. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. **Nature**, v. 316, p. 701-705. 1985.

DERYNCK, R.; RHEE, L.; CHEN, E.Y.; VAN TILBURG, A. Intron-exon structure of the transforming growth factor- β precursor gene. **Nucleic Acids Research**. v. 15, p. 3188-3189. 1987.

DIAS-OLIVEIRA, J. D. D. **Expressão do gene DD3 no desenvolvimento do câncer de próstata**. 2001. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

DUNNING, A. M.; ELLIS, P. D.; McBRIDE, S.; KIRSCHENLOHR, H. L.; HEALEY, C. S.; KEMP, P. R.; LUBEN, R. N.; CHANG-CLAUDE, J.; MANNERMAA, A.; KATAJA, V.; PHAROAH, P. D. P.; EASTON, D. F.; PONDER, B. A. J.; METCALFE, J. C. A transforming growth factor β 1 signal peptide variant increases secretion *in vitro* and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. **Cancer Research**. v. 63, p. 2610-2615. 2003.

EDER, I. E.; STENZL, A.; HOBISCH, A.; CRONAUER, M. V.; BARTSCH, G.; KLOCKER, H. Transforming growth factor- β 1 e β 2 in serum and urine from patients with bladder carcinoma. **J. Urol**. v. 156, p. 953-957. 1996.

EWART-TOLAND, A.; CHAN, J. M.; YUAN, J.; BALMAIN, A.; MA, J. A gain of function TGFB1 polymorphism may be association with late stage prostate cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. v. 13, p. 759-764. 2004.

FUJII, D.; BRISSENDEN, J. E.; DERYNCK, R.; FRANCKE, U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. **Somatic Cell Mol. Genet**. v. 12, p. 281-288. 1986.

FYNAN, T. M.; REISS, M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor- β and its role in oncogenesis. **Crit. Rev. Oncog**. v. 4, p. 493-540. 1993.

GEWALTIG, J.; MANGASSER-STEPHAN, K.; GARTUNG, C.; BIESTERFELD, S.; GRESSNER, A. M. Association of polymorphisms of the transforming growth factor- β 1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. **Clinica Chimica Acta**. v. 316, p. 83-94. 2002.

- GRIFFITHS, K.; MORTON, M. S. Aspects of the cell biology of prostate cancer. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. **Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment**. London: Martin Dunitz, 1999. cap. 4, p. 51-74.
- IRUELA-ARISPE, M. L.; SAGE, E. H. Endothelial cells exhibiting angiogenesis *in vitro* proliferate in response to TGF- β 1. **Cell Biochem.** v. 52, p. 414-430. 1993.
- IVANOVIC, V.; MELMAN, A.; DAVIS-JOSEPH, B.; VALCIC, M.; GELIEBTER, J. Elevated plasma levels of TGF- β 1 in patients with invasive prostate cancer. **Nat. Med.** v. 1, p. 282-284. 1995.
- IVANOVIC, V.; DEMAJO, M.; IVANISEVIC-MILANOVIC, O. Transforming growth factor- β 1 as a prognostic biomarker of prostate carcinoma. **Arch. Oncol.** v. 6, p. 159-162. 1998.
- IVANOVIC, V.; TODOROVIC-RAKOVIC, N.; DEMAJO, M.; NESKOVIC-KONSTANTINOVIC, Z.; SUBOTA, V.; IVANISEVIC-MILOVANOVIC, O.; NIKOLIC-VUKOSAVLJEVIC, D. Elevated plasma levels of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. **Eur. J. Cancer.** v. 39, p. 454-461. 2003.
- KLEEFF, J.; ISHIWATA, T.; MARUYAMA, H.; FRIESS, H.; TRUONG, P.; BUCHLER, M. W.; FALB, D.; KORC, M. The TGF-beta signaling inhibitor Smad 7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. **Oncogene.** v. 18, p. 5363-5372. 1999.
- LI, Z.; HABUCHI, T.; TSUCHIYA, N.; MITSUMORI, K.; WANG, L.; OHYAMA, C.; SATO, K.; KAMOTO, T.; OGAWA, O.; KATO, T. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with transforming growth factor-beta 1 gene polymorphisms at codon 10. **Carcinogenesis.** v. 25, p. 237-240. 2004.
- MARKOWITZ, S. TGF-beta receptors and DNA repair genes, coupled targets in a pathway of human colon carcinogenesis. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1470, p. M13-M20. 2000.
- MASSAGUE, J. The transforming growth factor- β family. **Annu. Rev. Cell. Biol.** v. 6, p. 597-641. 1990.

- MIYAZONO, K.; SUZUKI, H.; IAMAMURA, T. Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. **Cancer Sci.** v. 94, p. 230-234. 2003.
- MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Detection of the G \rightarrow T polymorphism at the Sp1 binding site of the collagen type α 1 gene by a novel Arms-PCR method. **Genetic Testing.** v. 6, p. 53-57. 2002.
- OLIVEIRA-JR., W. P. **Associação da expressão gênica do receptor de vitamina D e seus polimorfismos e caracterização de genes diferencialmente expressos no câncer de próstata.** 2003. 124 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- PERNAS-ALONSO, R.; MORELLI, F.; PORZIO, U.; di, PERRONE-CAPANO, C. Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. **Brain Research Protocols.** v. 4, p. 395-406. 1999.
- PORKKA, K. P.; VISAKORPI, T. Molecular mechanisms of prostate cancer. **European Urology.** p. 1-9, 2004.
- RANDALL, L. L.; HARDY, S. J. Unity in function in the absence of consensus in sequence: role of leader peptides in export. **Science.** v. 243, p. 1156-1159. 1989.
- REISS, M. TGF- β and cancer. **Microbes and Infection.** v. 1, p. 1327-1347. 1999.
- ROBSON, H., ANDERSON, E.; JAMES, R. D.; SCHOFIELD, P. F. Transforming growth factor- β 1 expression in human colorectal tumours: an independent prognostic marker in a subgroup of poor prognosis patients. **Br. J. Cancer.** v. 74 p. 753-758. 1996.
- ROSEMEYER R. B.; MELLICK A. S.; GARNHAM B. G.; HARRISON G. J. MASSA H. M.; GRIFFITHS L. R. The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. **Brain Research Protocols.** v. 11, p. 9-18. 2003.
- RUSCETTI, F.; VARESI, L.; ORTALDO, J. Pleiotropic effects of transforming growth factor- β on cells of the immune system. **Ann. Acad. Sci.** v. 685, p. 480-500. 1993.

SANTAGATI, S.; GARNIER, M.; CARLO, P.; VIOLANI, E.; PICATTI, G. B.; MAGGI, A. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using polymerase chain reaction (PCR)-based methods. **Brain Research Protocols**. v. 1, p. 217-223. 1997.

SHARIAT, S. F.; MENESSES-DIAZ, A.; KIM, I. Y.; MURAMOTO, M.; WHEELER, T. M.; SLAWIN, K. M. Tissue expression of transforming growth factor β 1 and its receptors: correlation with pathologic features and biochemical progression in patients undergoing radical prostatectomy. **Urology**. v. 63, p. 1191-1197. 2004.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. TGF- β : problems and prospects. **Cell. Regul.** v. 1, p. 875-882. 1990.

STATISTICA 99 Edition: Statistica for Windows (Computer program manual), Kernel release 5.5 A. Tulsa, OK. StatSoft Inc., 1999.

STEINER, M. S.; ZHOU, Z. Z.; TONB, D. C.; BARRACK, E. R. Expression of transforming growth factor- β 1 in prostate cancer. **Endocrinology**. v. 135, p. 2240-2247. 1994.

TSUSHIMA, H.; KAWATA, S.; TAMURA, S.; ITO, N.; SHIRAI, Y.; KISO, S.; IMAI, Y.; SHIMOMUKAI, H.; NOMURA, Y.; MATSUDA, Y.; MATSUZAWA, Y. High levels of transforming growth factor β 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. **Gastroenterology**. v. 110, p. 375-382. 1996.

USICHENKO, T.; LATTERMANN, A.; MULLER-ECKHARDT, G. Serology versus ARMS-PCR in prospective HLA-class I typing for bone marrow transplantation. **Ann. Hematol.** v. 77, p. 97-100. 1998.

WALKER, R. A.; DEARING, S. J. Transforming growth factor- β 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the breast. **Eur. J. Cancer**. v. 28, p. 641-644. 1992.

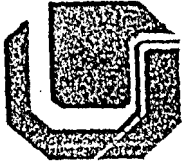
WELCH, D. R.; FABRA, A.; NAKAJIMA, M. transforming growth factor β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. **Proc. Natl. Acad Sci.** v. 87, p. 7678-7682. 1990.

WETTON, J. H.; TSANG, C. S. F.; RONEY, C. A.; SPRIGGS, A. C. An extremely sensitive species-specific ARMS PCR test for the presence of tiger bone DNA. **Forensic Science International**. v. 126, p. 137-144. 2002.

ZIV, E.; CAULEY, J.; MORIN, P. A.; SAIZ, R.; BROWNER, W. S. Association between the T29→C polymorphism in the transforming growth factor beta 1 gene and breast cancer among elderly white women: the study of osteoporotic fractures. **J. Am. Med. Assoc.** v. 285, p. 2859-2863. 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho compreende uma das etapas iniciais de um estudo complexo, consistindo na análise de diversos polimorfismos de DNA e dos níveis de expressão gênica, que permitirá auxiliar pesquisadores e clínicos na compreensão biológica do desenvolvimento do câncer de próstata. Para isso, um extenso banco de dados está sendo formado com o intuito de correlacionar vários genes candidatos a variados parâmetros clínicos e laboratoriais, para que num futuro próximo tais estudos façam parte de novas modalidades no diagnóstico e tratamento desta doença.



Universidade Federal de Uberlândia
Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer nº: 005/2001

Anexo I

Título do Projeto	Biologia molecular do câncer de próstata: Análise da Expressão gênica, estudo de polimorfismos, isolamento e caracterização de epítopos específicos.
Coordenador	Dr Luiz Ricardo Goulart Gallo
Relator	Prof. Dr. Miguel Tommas Jorge
Área do Conhecimento	Ciências Biológicas - Genética
Código	2.02
Projeto	<input checked="" type="checkbox"/> Local
Área Temática	<input type="checkbox"/> Multicêntrico: <input type="checkbox"/> Nacional <input type="checkbox"/> Internacional <input checked="" type="checkbox"/> Grupo I Nível <input type="checkbox"/> Prevenção <input checked="" type="checkbox"/> Epidemiológico <input type="checkbox"/> Grupo II <input type="checkbox"/> Diagnóstico <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> Grupo III <input type="checkbox"/> Terapêutico
Objetivo(s)	<p>criar um banco de dados de genes relacionados ao câncer de próstata. Desenvolver um "chips array" contendo os genes para análise de expressão de genes no câncer de próstata.</p>
Metodologia	

Anexo II**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Termo de Consentimento

O Laboratório de Genética Molecular dirigido pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho juntamente com o Serviço de Urologia, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, estão realizando um estudo genético relacionado ao Câncer de Próstata.

O projeto consiste no estudo da Biologia Molecular do Câncer de Próstata.

Para realização dos exames laboratoriais serão necessárias a coleta de 10 ml de sangue periférico e biópsias de tecidos tumorais da próstata. Cabe ressaltar que todo material utilizado será estéril e descartável, e no caso das biópsias, serão realizadas juntamente com os procedimentos rotineiros do centro cirúrgico do Hospital de Clínicas, sem qualquer desconforto adicional ao paciente.

O material coletado será enviado ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames de RNA e DNA.

É direito do paciente pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados.

Espera-se que, com este estudo seja possível detectar em que estágio de desenvolvimento se encontra a doença no paciente, bem como definir os possíveis biomarcadores a serem utilizados na detecção precoce, auxiliando o tratamento.

Almeja-se com isso, estabelecer um programa de tratamento precoce e integrado do paciente, a fim de prevenir o desenvolvimento da doença.

Os pacientes e contatos familiares que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, Eu, _____, concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura _____

Testemunhas _____

Anexo III**PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE PERIFÉRICO**

- 1- Centrifugar o sangue total a 5.000 rpm por 40 min para formar a camada de leucócitos entre o plasma e parte sólida do sangue
- 2- Remover uma alíquota de 500 μ l da camada de leucócitos, colocar em um tubo de 2 ml e adicionar 800 a 900 μ l de tampão de lise celular gelado
- 3- Agitar em vortex cuidadosamente por 10 s para ressuspender as células e completar a lise
- 4- Centrifugar a 5.000 rpm durante 5 min para precipitar os núcleos
- 5- Descartar o sobrenadante cuidadosamente, adicionar 1 ml de tampão de lise celular e repetir os passos 3 e 4 até o precipitado adquirir uma coloração leitosa
- 6- Adicionar 400 μ l de master mix a cada tubo e homogeneizar a solução até que o precipitado se desfazer
- 7- Se o precipitado não se desfizer facilmente, agitar em vortex por 15 s, adicionar 20 μ l de proteinase K e incubar as amostras a 65°C por 2 horas ou a 55°C *overnight*
- 8- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min para precipitar alguns debris celulares
- 9- Recolher o sobrenadante em tubo limpo, adicionar 200 μ l de cloreto de lítio 7,5 M ou NaCl saturado 7 M
- 10- Agitar em vortex por 5 s e colocar as amostras em gelo por 10 min
- 11- Centrifugar por 15 min a 13.000 rpm para precipitar as proteínas e outros contaminantes
- 12- Recolher o sobrenadante em um tubo limpo e adicionar 1 ml de álcool etílico absoluto e misturar por inversão
- 13- Centrifugar a 13.000 rpm por 10 min e adicionar 1 ml de álcool etílico 70% e centrifugar novamente
- 14- Descartar o etanol, deixar secar por 30 min e ressuspender em 50 μ l de água destilada

Anexo IV

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE SANGUE PERIFÉRICO

- 1- Colocar todo o sangue em um tubo limpo de 15 ml
- 2- Centrifugar o sangue por 10 min. a 2.500 rpm, à 4°C
- 3- Descartar o plasma e deixar no máximo 2,5 ml no tubo
- 4- Adicionar 9 partes de cloreto de amônio e 1 parte de bicarbonato de amônio (para 2,5 ml de sangue: 11,25 ml de cloreto e 1,25 ml de bicarbonato (fazer a solução antes de adicionar às células)
- 5- Inverter delicadamente para misturar
- 6- Incubar em gelo por 10 min.
- 7- Centrifugar por 15 min. a 3000 rpm a 4°C e desprezar o sobrenadante
- 8- Adicionar 1 ml de solução D
- 9- Adicionar 7,2 µl de β/2 mercaptoeptanol
- 10-Agitar levemente e mergulhar em gelo
- 11-Adicionar 100 µl de acetato de sódio 2M pH=4
- 12-Adicionar 1 ml de fenol saturado em água pH=4
- 13-Acrescentar 200 µl de clorofórmio – álcool isoamílico (49:1 – 196 µl clorofórmio : 4 µl isopropanol)
- 14-Agitar em vortex a suspensão por 10 s. e distribuir a mistura em microtubos de 2 ml.
- 15-Colocar em gelo por 15 min.
- 16-Centrifugar a amostra por 15 min a 12.000 g. a 4°C.
- 17-Transferir no máximo 1 ml da fase aquosa para outro microtubo e adicionar 1 ml de álcool isopropílico, mantenha a -20°C *overnight*
- 18-Centrifugar a 12.000 g por 15 min a 4°C e descartar o álcool com cuidado
- 19-Lavar o precipitado colocando primeiro 700 µl de álcool etílico absoluto e em seguida 300 µl de água DEPC
- 20-Centrifugar o precipitado a 12.000 por 10 min a 4°C
- 21-Deixar secar a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min e ressuspender em 50 µl de água tratada com DEPC

REAGENTES E SOLUÇÕES PARA O TAMPÃO DE LISE CELULAR

Solução de Trabalho	Estoque	Preparo Solução de Trabalho
320 mM de Sacarose	100%	43,13 g
10 mM Tris-HCl pH 7,5	1M	4,0 ml
5 mM MgCl ₂	1M	2,0 ml
Triton X-100	100%	4,0 ml
Água		Completar até 400 ml

MÁSTER MIX *

Solução de Trabalho	Estoque	Preparo Solução de Trabalho
10 mM Tris-HCl pH 7,5	1,0 M	2,0 ml
10 mM EDTA	0,5 M	4,0 ml
10 mM NaCl	3,0 M	667 µl
0,5 % SDS	10%	10,0 ml
Proteinase K	10 mg/ml	**
Água		Completar até 400 ml

* Pode ser armazenado à temperatura ambiente

** A proteinase K é adicionada na hora do uso. e assim que manipulada deve ser recongelada a -20°C rapidamente

REAGENTES PARA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO D

Reagente	Solução de Trabalho
Tiocianato de Guanidina	50 g
Citrato de Sódio 0,75 M, pH 7,0	3,52 ml
Sarcosil 10%	5,3 ml
Água DEPC	58,6 ml

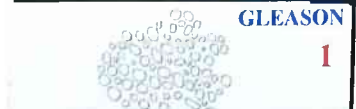




Anexo V

**ESTADIAMENTO DOS ADENOCARCINOMAS DA PRÓSTATA,
CLASSIFICAÇÃO DE WHITMORE-JEWETT E TNM 1992 (apud Stamey;
McNeal 1992; Srougi, 1998)**

WHITMORE-JEWETT	TNM 1992 T- Tumor primário N- Linfonodos M- Metástases (proposto pela União Interacional contra o Câncer)
<p>A Tumor não palpável no toque retal</p> <p>A1 Tumor não palpável ocupando $\leq 5\%$ da próstata</p> <p>A2 Tumor não palpável ocupando $> 5\%$ da próstata</p> <p>B1 Nódulo $\leq 1,5$ cm em um lobo prostático</p> <p>B2 Nódulo $> 1,5$ cm e/ou ocupando os dois lobos da próstata</p> <p>C1 Extensão peri prostática mínima (sulcos)</p> <p>C2 Invasão da base das vesículas seminais com ou sem invasão dos sulcos</p> <p>C3 Invasão da base das vesículas seminais com ou sem a invasão de outros órgãos adjacentes</p>	<p>pTx Tumor não avaliado</p> <p>pTo Sem evidência de tumor</p> <p>pT1 Tumor incidental impalpável e invisível por técnicas de obtenção de imagens</p> <p>pT1a Tumor incidental ocupando $\leq 5\%$ do tecido ressecado</p> <p>pT1b Tumor incidental ocupando $> 5\%$ do tecido ressecado</p> <p>pT1c Tumor não palpável ou visível por imagem, diagnosticado por biópsia com agulha em um ou ambos os lobos, em pacientes com PSA sanguíneo elevado</p> <p>pT2 Tumor limitado à glândula</p> <p>pT2a Até metade de um lobo ou menos</p> <p>pT2b Até mais da metade de um lobo porém não os dois lobos</p> <p>pT2c Comprometimento dos dois lobos</p> <p>pT3 Tumor estende além da cápsula prostática</p> <p>pT3a Extensão extra capsular unilateral</p> <p>pT3b Extensão extra capsular bilateral</p> <p>pT3c Tumor invade vesícula seminal</p> <p>pT4 Tumor fixo ou invadindo outras estruturas pélvicas adjacentes exceto as vesículas seminais</p> <p>pT4a Tumor invadindo o colo vesical e/ou o esfíncter externo e/ou o reto</p> <p>pT4b Tumor invadindo o músculo elevador do ânus e/ou fixo à parede pélvica</p>
<p>D1 Metástases em linfonodos pélvicos</p>	<p>pNx Linfonodos regionais não avaliados</p> <p>pNo Sem metástases ganglionares</p> <p>pN1 Um linfonodo envolvido ≤ 2 cm</p> <p>pN2 Um linfonodo $>2 \leq 5$ e/ou múltiplos ≤ 5 cm</p> <p>pN3 Linfonodos envolvidos > 5 cm</p>
<p>Do Metástases não identificadas</p> <p>D2 Metástases à distância</p> <p>D3 Resistente ao tratamento hormonal</p>	<p>pMx Metástases não avaliadas</p> <p>pMo Sem metástases à distância</p> <p>pM1 Metástases presentes</p> <p>pM1a Linfonodo(s) não regional(is)</p> <p>pM1b Osso(s)</p> <p>pM1c Outras localizações</p>

Anexo VI

SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICO DE GLEASON

Escala de Gleason		GLÂNDULA			
	MARGENS	Padrão Glandular	Tamanho	Distribuição	
	GLEASON 1	Bem definida	Simples Separadas Redondas	Médio	Pacote fechado
	2	Menos definida	Simples - Separadas Redondas Mais Variadas	Pequeno Médio Grande	Espaçamento médio de um diâmetro glandular
	3	Irregular Infiltrada	Simples, separadas, mais irregular Massas epiteliais redondas cribriformes ou papilar	Pequeno	Espaçamento médio de mais de um diâmetro glandular. Raramente em pacotes. Massas arredondadas c/
	4	Irregular Infiltrada	Massas glandulares fundidas do tipo hipercribróide	Pequeno	Massas epiteliais anaplásicas irregulares
	5	Mal definida	Poucos e pequenos lúmens envolvidos por massa epitelial sólida às vezes com necrose central	Pequeno	Massas irregulares ou cordões com contornos pouco definidos
Padrões Anatomopatológicos Adenocarcinoma da Próstata					

Fonte: Gleason 2 a 4 Diferenciado. 5 6 e 7 Moderadamente Dif. 8 a 10 Indif.

* Como os adenocarcinomas da próstata apresentam mais de um padrão histológico, o diagnóstico final na escala Gleason é dado pela soma dos graus do padrão primário (predominante) e do padrão secundário (segunda menor área representada) (Stamey; McNeal 1992; Isaacs, 1997; Srougi, 1998).

FU00034880-9