

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

(101)
516.55-005.5
SARAIVA
TESE

**IMPLICAÇÕES DO GENE TP53 E DO VÍRUS DO PAPILOMA
HUMANO NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

ANA CÂNDIDA MACHADO SARAIVA

**Tese apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia, como parte
dos requisitos para
obtenção do Título de
Mestre em Genética e
Bioquímica (Área de
Concentração Genética)**

SISBI/UFU



1000224370

**UBERLÂNDIA – MG
2002**

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

**IMPLICAÇÕES DO GENE TP53 E DO VÍRUS DO PAPILOMA
HUMANO NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

ALUNA: ANA CÂNDIDA MACHADO SARAIVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ RICARDO GOULART

**Tese apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia, como parte
dos requisitos para
obtenção do Título de
Mestre em Genética e
Bioquímica (Área de
Concentração Genética)**

**UBERLÂNDIA – MG
2002**

COMISSÃO JULGADORA

MEMBROS TITULARES:

Prof. Dr. LUIZ RICARDO GOULART
ORIENTADOR

Profa. Dra. ANA MARIA BONETTI
CONSELHEIRA

Prof. Dra. LEONILDA STANZIOLA
CONSELHEIRA

MEMBROS SUPLENTE:

Profa. Dra. AMÉLIA HAMAGUSHI

Profa. Dra. VERIDIANA DE MELO RODRIGUES ÁVILA

DEDICATÓRIA

*À MINHA QUERIDA MÃE,
EXEMPLO DE FORÇA,
DIGNIDADE E AMOR. POR
TODO CARINHO E APOIO
DADO EM TODOS MOMENTOS
DE MINHA VIDA, DEDICO
ESTE TRABALHO.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS, POR TER ME DADO A OPORTUNIDADE DE VIVER E SACIAR DE UM DOS MAIORES PRAZERES DA VIDA, O CONHECIMENTO.

AOS MEUS PAIS, JOÃO E LÊDA, POR TEREM SIDO OS RESPONSÁVEIS PELO QUE SOU E POR SEREM SEMPRE ADMIRADORES DO MEU ESFORÇO NOS ESTUDOS.

AOS MEUS IRMÃOS, RODRIGO, PEDRO PAULO E ADRIANA, POR FAZEREM PARTE DA MINHA HISTÓRIA.

AO MEU AMADO SOBRINHO, LUCCA, PELO SIMPLES FATO DE EXISTIR E ALEGRAR TODOS OS MEUS DIAS.

AO MEU NAMORADO, BRUNO, POR TODO AMOR, INCENTIVO E APOIO DADO DURANTE TODOS OS MOMENTOS DE MINHA VIDA.

À TODA MINHA FAMÍLIA, À MINHA AVÓ, AOS MEUS TIOS E PRIMOS, PELO AMOR E POR TORCEREM PELO MEU SUCESSO.

À MINHA QUERIDA AMIGA E COMPANHEIRA, JÚ MEOLA, POR TODAS AS AJUDAS TANTO NO CAMPO PROFISSIONAL QUANTO NO PESSOAL, GUARDO VOCÊ EM MEU CORAÇÃO.

AOS PACIENTES, PELAS AMOSTRAS CONCEDIDAS, SEM AS QUAIS NÃO SERIA POSSÍVEL A REALIZAÇÃO DESTE E DE OUTROS TRABALHOS.

À AMIGA ADRIANA, PELOS AGRADÁVEIS MOMENTOS QUE PASSAMOS JUNTAS.

À QUERIDA JACKIE PELA GENTIL COLABORAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DESTE TRABALHO.

AO GRANDE AMIGO E CIENTISTA, MAURÍCIO MACHAIM, POR SEMPRE AUXILIAR A PESQUISA.

AGRADECIMENTOS

AO PROF. LUIZ RICARDO, POR TER ME ACOLHIDO EM SEU LABORATÓRIO, SENDO UM GRANDE EXEMPLO DE OTIMISMO, CONFIANÇA E ESTÍMULO NA CONSTRUÇÃO DO CONHECIMENTO CIENTÍFICO.

AO GISMAR POR SEMPRE, EM QUALQUER MOMENTO, ESTAR DISPOSTO EM AUXILIAR MEUS TRABALHOS.

ÀS PROFESSORAS ANA MARIA BONETTI E LEONILDA STANZIOLA PELA GENTIL DISPONIBILIDADE EM AUXILIAR ESTE TRABALHO.

ÀS PROFESSORAS AMÉLIA HAMAGUSHI E VERIDIANA ÁVILA PELA GENTILEZA DE SEREM SUPLENTES DE MINHA BANCA.

AOS GRANDES AMIGOS DO GRUPO DE PRÓSTATA: DRI, JÚ, JACKIE, WALDESSE, ANDRÉIA, BETHÂNIA, PELOS MOMENTOS AGRADÁVEIS QUE PASSAMOS E PELAS DIVERSAS DISCUSSÕES QUE ENRIQUECEM NOSSOS TRABALHOS.

À TODOS ESTUDANTES DO LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR: Elis, Fred, Mércia, Alexandra, Walter, Guilherme, Elaine, Rossana, Luciana, Katiana, Renata, Juliana Franco, Juliana Gouveia, Cícero, Cristiane, Fausto, Lorraine, Paula Soares, Paula Cristina, Carlos, Karina, PELA AMIZADE E TRANSMISSÃO DE CONHECIMENTOS OBTIDOS.

À TODOS AQUELES QUE JÁ SE FORAM MAS DEIXARAM SAUDADES: Warley, Jú, Wânia, Bárbara, Marcelo, Lígia, Nádia, Pri, Vivian, Giovana, Machaim.

À TODOS OS AMIGOS, FUNCIONÁRIOS E PROFESSORES DO INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA, POR TEREM AUXILIADO DE FORMA INDIRETA OU DIRETA NA REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

À TODOS OS FUNCIONÁRIOS DO LABORATÓRIO BIOGENETICS, JÚ, WARLEY, LÍGIA, IRIS, JUAREZ, REGINA, TAENE, CIRINO PELOS AGRADÁVEIS MOMENTOS QUE PASSAMOS JUNTOS.

AOS MÉDICOS UROLOGISTAS LINDOLFO E SEBASTIÃO E AOS
RESIDENTES YURI, LEANDRO, RICARDO, PELA GRANDE
COLABORAÇÃO COM A PESQUISA.

À TODO PESSOAL DO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA,
PRINCIPALMENTE AO PROF. DR. ADEMIR E AO MARCINHO,
PELA GENTILEZA EM CONTRIBUIR COM A CIÊNCIA.

AOS ÓRGÃOS DE FOMENTO: CNPq, CAPES, FAPEMIG E UFU PELO
APOIO FINANCEIRO.

À TODOS AQUELES CUJOS OS NOMES FORAM ESQUECIDOS
NESTE MOMENTO MAIS QUE COM CERTEZA FIZERAM PARTE
DESTA CONQUISTA.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	Xi
LISTA DE ABREVIações	Xiii
RESUMO GERAL	Xv
GENERAL ABSTRACT	Xvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. A Próstata	2
2. Patologias da Próstata	4
2.1. Hiperplasia Prostática Benigna	4
2.2. Câncer de Próstata	5
3. Fatores Associados ao Desenvolvimento das Patologias da Próstata	8
3.1. Papilomavírus Humano e sua Relação com as Patologias da Próstata	10
3.1.1. Caracterização dos HPVs	10
3.1.2. HPV e a Próstata	12
3.1.3. Métodos de detecção dos HPVs	14
3.2. O Supressor de Tumor – P53	16
3.2.1. Caracterização do gene e da proteína p53	16
3.2.2. Mecanismos de Regulação da p53	19
3.2.3. Mecanismos de Inativação do gene TP53	21
3.2.4. Mutações no gene TP53 no câncer de próstata	25
3.2.5. Polimorfismo Arg72Pro do gene TP53	26
3.2.6. Metodologias para detecção de mutações no gene P53	28
4. Referências Bibliográficas	29

CAPÍTULO 1 – ANÁLISE MOLECULAR DO HPV E DO POLIMORFISMO Arg72Pro DO GENE TP53 NO CÂNCER DE PRÓSTATA	42
Introdução	43
Pacientes e Métodos	47
Resultados	56
Discussão	62
Resumo	72
Abstract	74
Referências	76
Anexo 1.1. Termo de Consentimento	83
Anexo 1.2. Protocolo de Extração de DNA (Tecido)	84
Anexo 1.3. Protocolo de Extração de DNA (Sangue)	85
Anexo 1.4. Coloração por Nitrato de Prata	87
Anexo 1.5. Purificação de Produtos Amplificados da Agarose	88
Anexo 1.6. Clonagem	89
Anexo 1.7. Extração de Plasmídeos	91
Anexo 1.8. Coloração por Nitrato de Prata e NaOH	92
Anexo 1.9. Estadiamento dos Adenocarcinomas da Próstata	93
CAPÍTULO 2 – MUTAÇÕES NO GENE TP53 SÃO EVENTOS RAROS NO CÂNCER DE PRÓSTATA	94
Introdução	95
Pacientes e Métodos	99
Resultados	104
Discussão	107
Resumo	110
Abstract	111
Referências	112

Anexo 2.1. Termo de Consentimento	117
Anexo 2.2. Protocolo de Extração de DNA (Tecido)	118
Anexo 2.3. Protocolo de Extração de DNA (Sangue)	119
Anexo 2.4. Coloração por Nitrato de Prata	121
Anexo 2.5. Purificação de Produtos Amplificados da Agarose	122
Anexo 2.6. Clonagem	123
Anexo 2.7. Extração de Plasmídeos	125

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Divisões anatômicas da próstata	3
Figura 2. Estrutura do genoma do HPV 16	11
Figura 3. Cromossomo 17	16
Figura 4. Estrutura da proteína p53	18
Figura 1.1a. Perfil eletroforético apresentando a qualidade dos DNAs extraídos	56
Figura 1.1b. Amplificação do exon 4 do gene TP53	56
Figura 1.2. Perfil eletroforético do exon 4 por LIS-SSCP em gel 8% de acrilamida-bis (49:1), mostrando o polimorfismo Arg72Pro	56
Figura 1.3. Polimorfismo do códon 72 do gene TP53 no sangue periférico, analisado pela técnica de PCR-LIS-SSCP	58
Figura 1.4. Padrão eletroforético em gel de agarose 1,5%, das amostras positivas para HPV	60
Figura 1.5. Gel 8% não desnaturante de acrilamida-bis 29:1, apresentando as restrições enzimáticas do HPV 39	61
Figura 1.6. Gel 8% não desnaturante de acrilamida-bis 29:1, apresentando as restrição enzimática do HPV 16	61
Figura 2.1. Perfil eletroforético apresentando a qualidade dos DNAs extraídos	104
Figura 2.2. Amplificação dos exons 5 a 8 do gene TP53	104
Figura 2.3. Perfil eletroforético da PCR-LIS-SSCP para o exon 8 do gene TP53 em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1	105
Figura 2.4. Perfil eletroforético da PCR-LIS-SSCP para o exon 8 do gene TP53 em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1	105

Figura 2.5. Perfil eletroforético do exon 5 do gene TP53 em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1	106
Figura 2.6. Perfil eletroforético do exon 6 do gene TP53 em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1	106
Tabela 1.1. Tamanho dos fragmentos esperados (em pares de bases - pb) específicos para 32 tipos de HPV	54
Tabela 1.2. Freqüência do polimorfismo Arg72Pro nas biópsias e nos sangues de pacientes estudados	57
Tabela 1.3. Freqüência de LOH nos diversos estadiamentos do câncer de próstata	59
Tabela 1.4. Prevalência do HPV em Patologias da Próstata	59
Tabela 1.5. Pesquisas realizadas para detecção do HPV em amostras prostáticas	66
Tabela 2.1. Programas da PCR para os exons de 5 a 8 do gene TP53	101
Tabela 2.2. Condição da Eletroforese para os exons de 5 a 8 do gene TP53	102

LISTA DE ABREVIATURAS

DHT	Diidrotestosterona
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
CaP	Câncer de Próstata
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NIP	Neoplasia Intraepitelial Prostática
TP53	Gene Supressor de Tumor p53
PSA	Antígeno Específico da Próstata
HPV	Papilomavírus Humano
HPC-1	Gene hereditário do câncer de próstata – cromossomo1
D-VDR	Gene Receptor de Vitamina D
AR	Gene Receptor de Andrógeno
LOH	Perda de Heterozigose
HK-2	Calicreína Humana – 2
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
LCR	Região de Controle Longa
CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
DST	Doença Sexualmente Transmissível
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
pb	Pares de Base
PCR- <i>nested</i>	Reação em Cadeia da Polimerase com dupla amplificação
Kb	quilo-bases
KDa	Quilo-dalton
UV	ultra-violeta
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
Pro	Prolina
Arg	Arginina
Cis	Cisteína
DGGE	Gel de Gradiente de Desnaturação
SSCP	Polimorfismo Conformacional de Fita Simples
LIS-SSCP	Polimorfismo Conformacional de Fita Simples em Tampão de Baixa Força Iônica
LIS	Tampão de Baixa Força Iônica
Rb	Gene Retinoblastoma
Arg72Pro	Polimorfismo do codon 72 – Arginina ou Prolina
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

RTU	Ressecção Transuretral
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
TBE	Tris-Borato-EDTA
Mm	Milimolar
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra Acético Sal Dissódico
mg	Miligrama (s)
ml	Mililitro (s)
VDS	Sistema de Vídeo Documentação
µl	Microlitro (s)
U	Unidade (s)
KCl	Cloreto de Potássio
HCl	Ácido Clorídrico
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
X	Veze
pmoles	pico-moles
X ²	Qui-quadrado
HV	Herpes virus
RT	Transcrição Reversa
mg	Miligramas
TLN	Tampão de lise nuclear
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
Rpm	Rotação por minuto
ml	Mililitro
M	Molar
NCBI	Centro Nacional de Informação de Biotecnologia
g	Grama
µg	Micro-grama
NaOH	Hidróxido de sódio
N	Normal
q.s.q	Quaisquer que sejam as partes
Volts	Voltagem
mA	Miliamper

RESUMO GERAL

A glândula próstata pode ser acometida por várias patologias. Dentre elas o câncer de próstata é a 4^a causa de morte em homens com idade superior a 50 anos. Apesar da etiologia desta doença não ser bem compreendida, as alterações genéticas e a presença de agentes infecciosos têm sido sugeridas como associadas ao desenvolvimento desse câncer. Uma das alterações genéticas mais freqüentes nos cânceres são as relacionadas ao gene supressor de tumor TP53, responsável pelo controle do ciclo celular e apoptose. No início da década de 90, vários trabalhos também surgiram na tentativa de estabelecer relação entre a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) e o câncer de próstata. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivos avaliar a prevalência do HPV, analisar o polimorfismo Arg72Pro, associar este polimorfismo à presença do HPV e rastrear por mutações nos exons de 5 a 8 do gene TP53 em pacientes apresentando câncer de próstata. Foram analisados 36 tecidos prostáticos sendo estes provenientes de adenocarcinoma, HPB e NIP e sangues periféricos de alguns desses pacientes bem como de um grupo de homens escolhidos aleatoriamente na população. As técnicas utilizadas para detecção e tipagem do HPV foram a PCR e a PCR *nested*. Já para a análise do polimorfismo Arg72Pro e para o rastreamento de mutações foram utilizadas as técnicas de PCR e LIS-SSCP. Não houve diferenças das freqüências do polimorfismo Arg72Pro entre os tecidos com HPB e CaP ($p=0,36$; intervalo de confiança 95%). As freqüências obtidas nos sangues de alguns dos pacientes com patologias prostáticas também não diferiram significativamente, sendo que o grupo com HPB não diferiu do grupo CaP ($p=0,72$;

intervalo de confiança 95%), nem este da frequência encontrada na população ($p=0,08$; intervalo de confiança 95%). Foram detectadas perda de heterozigose (LOH) em 9 (34,61%) pacientes que perderam o alelo Pro, ficando Arg/Arg. Desses indivíduos 5 (35,71%) pertenciam ao grupo do câncer, 3 (37,5%) ao grupo das HPBs e 1 (25%) ao grupo das NIPs. Dentre os 36 pacientes analisados para a infecção pelo HPV, por meio da PCR e PCR-*nested*, apenas 2 (5,55%) apresentaram positividade para HPV do tipo 16 e 39. O Teste *t*, com nível de significância de 5%, mostrou não haver diferenças significativas para a presença do HPV entre as amostras obtidas por RTU e prostatectomia radical, nem entre os tecidos malignos e benignos analisados. Os pacientes positivos para a infecção do HPV apresentaram o genótipo homozigoto para arginina, entretanto, a baixa prevalência desta infecção não possibilitou associá-la ao polimorfismo Arg72Pro. Foi detectado um perfil eletroforético diferencial no exon 6 em um paciente com câncer de próstata. Desta forma, a baixa prevalência da infecção pelo HPV, a não associação desta com o polimorfismo Arg72Pro bem como a rara frequência de mutações nos exons analisados sugere que estes não seriam mecanismos essenciais para desenvolvimento do câncer de próstata. Entretanto, o evento de LOH pode estar associado à progressão ou desenvolvimento deste tumor, sendo um evento precoce ou intermediário, porém não obrigatório. Estudos mais detalhados e ampliados devem ser realizados para compreender melhor os processos fisiológicos, que resultam da associação genótipo – ambiente, nesta afecção.

GENERAL ABSTRACT

The prostate gland can be assaulted by many pathologies. Among them the prostate cancer is the 2nd death cause on men older than 50 years old. Although the etiology of this disease is not well comprehended, the genetic alterations and the presence of infectious agents have been suggested as associated to the development of this cancer. One of the most frequent genetic alterations on the cancers are the ones related to the tumor suppressor gene TP53, responsible for the cell cycle control and apoptosis. In the beginning of the 90s, many works also arose on the attempt to establish a relationship between the human papilloma virus (HPV) infection and the prostate cancer. Within this context, this work had as objectives, to evaluate the HPV prevalence, to analyze the Arg72 Pro polymorphism, to associate this polymorphism to the HPV presence and to track for mutations on the exons 5 to 8 of the PT53 gene in patients presenting prostate cancer. 36 prostatic tissues were analyzed, seeing that these proceeding were from adenocarcinomas, BPH and PIN and peripheral blood of some of these patients, as well as of a group of men randomly chosen on the population. The techniques used for the HPV detection and typing were the PCR and *nested* PCR. For the Arg72Pro polymorphism analysis and for the tracking of mutations, the PCR and LIS-SSCP techniques were used. There were no differences on the frequencies of the Arg72Pro polymorphism between the BPH and PCa tissues ($p=0,36$; 95% reliance interval). The frequencies obtained on the blood of some patients with prostatic pathologies also did not differed significantly, whereas the BPH group did not differ from the PCa group ($p=0,72$,

95% reliance interval), nor this from the frequency found on the population ($p=0,08$, 95% reliance interval). It was detected Loss of Heterozigosity (LOH) in 9 (34,61%) patients that lost the Pro allele, becoming Arg/Arg. Among these individuals, 5 (35,71%) belonged to the cancer group, 3 (37,5%) to the BPHs and 1 (25%) to the PINs. Among the 36 analyzed patients for the HPV infection, by means of PCR and *nested* PCR, only 2 (5,55%) presented positivity for HPV types 16 and 39. The t Test, showed that there were no significant differences for the HPV presence among the samples obtained by TUR and radical prostatectomy, nor among the malignant and benignant analyzed tissues. The positive patients for the HPV infection presented an homozygous genotype for arginine, however, the low prevalence of this infection did not allow an association to the Arg 72Pro polymorphism. A possible mutation was detected on the exon 6 in one patient with prostate cancer. In this manner, the low prevalence of the HPV infection, and the non-association of this with the Arg72Pro polymorphism as well as the rare frequency of mutations on the analyzed exons suggest that these would not be the essential mechanisms for the prostate cancer development. However, the LOH event could be associated to the progression or development of this tumor, being a precocious or intermediate event, yet not obligatory. More detailed and amplified studies should be done to clear these results, searching for directions to better comprehend the physiological procedures, which result on the genotype-environment association, on this affection.

INTRODUÇÃO GERAL

1. A PRÓSTATA

A próstata começa seu desenvolvimento na 12^a semana de vida embrionária sobre influência da Diidrotestosterona (DHT), produzida pela conversão da testosterona fetal via atividade enzimática da 5- α redutase, e completa sua diferenciação no 4^o mês de gestação (Tanangho, 1992).

A glândula próstata, que é constituída em 30% de tecido fibromuscular e 70% de tecido glandular, se localiza na pelve verdadeira, circundando a parte posterior da uretra (Tanangho, 1992).

Esta glândula consiste de uma delgada cápsula fibrosa sob a qual estão fibras de músculo liso, o estroma prostático, composto de tecidos conjuntivo e elástico e fibras musculares lisas, nas quais estão mergulhadas as glândulas epiteliais, que drenam para ductos excretores, localizados no assoalho da uretra (Tanagho, 1994).

As secreções prostáticas são constituídas de fosfatases e de substâncias orgânicas e inorgânicas que participam da constituição do líquido seminal, auxiliando a atividade metabólica dos espermatozóides (Sadi, 1975).

McNeal em 1972 propôs um conceito de anatomia regional baseado na histologia e anatomia da próstata (Narayan, 1994). Desta forma, a mesma foi dividida em 5 zonas: **zona fibromuscular anterior**, que contém 30% do volume da próstata, nenhum elemento glandular e praticamente músculo liso; **zona periférica**, considerada a maior subdivisão anatômica que contém 75% do tecido glandular da próstata, sendo o local onde quase todos os carcinomas se desenvolvem, por isso durante a biópsia esta região é sempre um importante alvo; **zona central**, que contém 25% do

tecido glandular, sendo diferenciada da zona periférica pela arquitetura da glândula e detalhes das células, incomum à carcinogênese; **zona pré-prostática**, que tem função de esfíncter durante a ejaculação para prevenir o refluxo do líquido seminal para bexiga e a **zona de transição**, que apresenta menos de 5% da massa glandular normal da próstata, entretanto, tem importante função por ser o local de origem da hiperplasia prostática benigna (Coffey, 1992) (Figura 1).

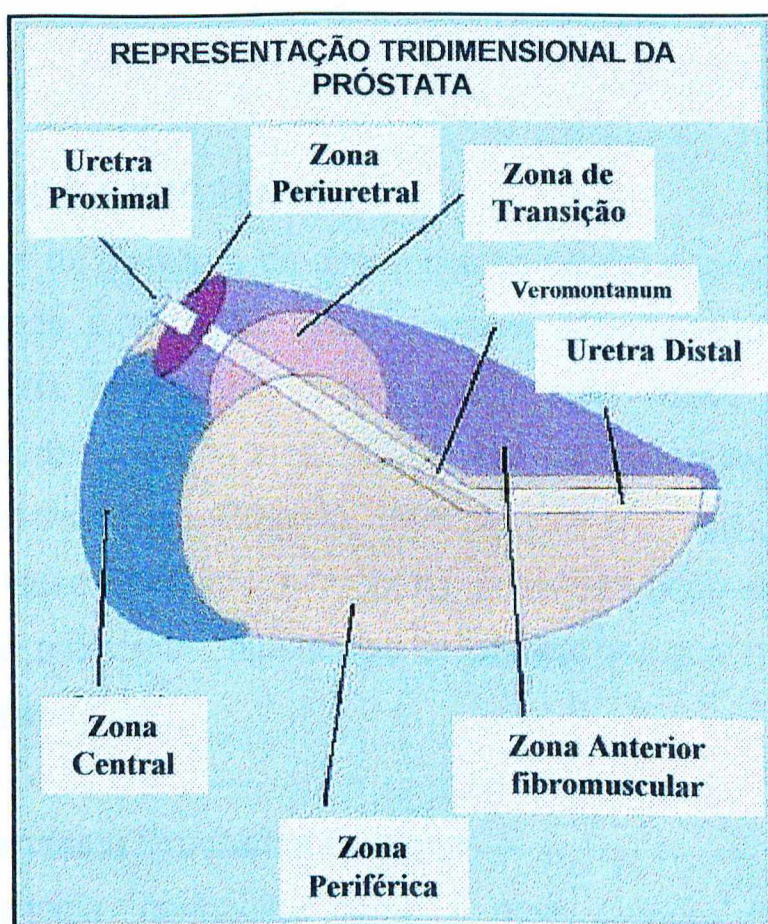


Figura 1. Divisões anatômicas da próstata.

Fonte: www.medscape.com

A próstata, como as outras glândulas acessórias, tem seu crescimento e manutenção regulados pela presença constante da testosterona no sangue. Existem outros andrógenos capazes de estimular a próstata, entretanto, estes não fazem parte da via principal (Coffey, 1992).

Qualquer desequilíbrio na concentração desses hormônios ou mesmo, em receptores dos mesmos ou, ainda, em qualquer outra via que influencie a homeostase do órgão, pode gerar diferentes patologias.

2. PATOLOGIAS DA PRÓSTATA

O controle da divisão e da diferenciação celular é feito por um sistema integrado e complexo, que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos. Qualquer alteração nesse sistema resulta em distúrbios ora do crescimento, ora da diferenciação, ora dos dois ao mesmo tempo (Bogliolo, 1998).

Dentro desse contexto, a próstata pode ser acometida por duas principais patologias: hiperplasia prostática benigna (HPB), e câncer de próstata (CaP).

2.1. Hiperplasia Prostática Benigna

Esta patologia, conhecida como a mais comum entre os tumores benignos, é também, a responsável pela maioria dos sintomas urinários que acometem homens com idade superior a 50 anos e por 20 a 30% das prostatectomias radicais nos indivíduos que vivem até 80 anos (Walsh, 1992).

As primeiras alterações iniciam-se por volta dos 35 anos de idade e consistem em nódulos microscópicos no estroma que

surgem ao redor das glândulas periuretrais. Esses nódulos podem ser compostos tanto de elementos glandulares quanto fibromusculares ou podem ser mistos (Narayan, 1994).

Como a incidência microscópica da HPB é razoavelmente constante em diversos países, as influências do meio e/ou genéticas, parecem não ser cruciais para a origem da doença, mesmo porque todos os homens que viveram muito tempo desenvolverão hiperplasia prostática benigna (Narayan, 1994), embora apenas 20% desses casos complicaram, sendo necessária intervenção cirúrgica e/ou terapia médica (Srougi & Cury, 1999).

Várias hipóteses com relação à histologia, hormônio e idade têm sido sugeridas para explicar a etiologia da HPB, entretanto, esta ainda continua pouco conhecida. Mas já se sabe que é necessário para o desenvolvimento da HPB, o envelhecimento e a presença dos testículos, os quais produzem a testosterona que é convertida em DHT, necessária para crescimento e manutenção da próstata (Walsh, 1992; Narayan, 1994). Dentro deste contexto, acredita-se que os andrógenos seriam necessários para início da HPB e não para sua manutenção (Narayan, 1994).

2.2. Câncer de Próstata

Segundo estimativas do INCA (Instituto Nacional do Câncer) para o ano de 2001, foram estimados 305.330 novos casos de câncer com 117.550 óbitos. Para o sexo masculino, foram esperados 105.450 casos e 63.330 óbitos (Kligerman, 2001).

No contexto geral, o câncer de próstata ocupa o 5º lugar com 20.820 casos. Nas regiões do Brasil, esse tipo de câncer é o segundo mais incidente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste,

ficando com a primeira posição no Nordeste, a terceira no Sul e a quarta no Norte (Kligerman, 2001).

Este câncer é o segundo mais comum em homens, só sendo superado pelo câncer de pele não melanoma. As Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, do Instituto Nacional de Câncer, indicam que vão ocorrer 25.600 novos casos de câncer de próstata em 2002. Em taxa de mortalidade, o câncer de próstata aparece como o quarto tipo mais mortal, tendo sido responsável por 7.223 óbitos em 1999 (INCA, 2002).

Acredita-se que o câncer de próstata se desenvolva no período de maior atividade androgênica, ou seja, aos 35, 40 e 45 anos, tendo progressão lenta, juntamente com a redução das quantidades de hormônios (Sadi, 1975).

Alguns autores sugerem que pacientes apresentando neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de alto grau, juntamente com mutações no gene P53, têm maiores chances de desenvolver o câncer de próstata (Downing *et al.*, 2001).

Embora a incidência desse câncer seja elevada, existe um número muito maior de casos dessa doença, que ocorrem sem que haja sintomas clínicos. Vários pacientes morrem de doenças concomitantes, antes da manifestação clínica do câncer de próstata, já os pacientes que o manifesta, provavelmente, iniciaram a carcinogênese mais jovens ou apresentaram crescimento tumoral mais acelerado (Ruijter, 1994).

Estes tumores que se caracterizam principalmente por adenocarcinomas de células acinares da próstata (Stamey & McNeal, 1992), têm como prognóstico o estadiamento do tumor, entretanto, apesar deste fator ter papel importante, o acompanhamento desses pacientes é de extrema importância, pois

as metástases podem surgir até 12 anos após o diagnóstico (Srougi, 1999).

A maioria dos cânceres de próstata é multifocal, sendo que 70% originam na zona periférica; 15 a 20% na zona central e 10 a 15% na zona de transição (Narayan, 1994).

Os programas de detecção precoce, as medidas do antígeno prostático específico (PSA), o toque digital e a biópsia dirigida pelo ultra-som transretal aumentaram significativamente a frequência do câncer localizado, possibilitando melhores prognósticos aos pacientes (Narayan, 1994; Walsh & Worthington, 1998; Srougi, 1999).

O grande número de trabalhos realizados com esta neoplasia é justificado pela alta incidência desta patologia, que representa cerca de 40% (Srougi, 1999) dos tumores que acometem os homens, bem como pela necessidade de compreender melhor a etiologia dessa malignidade, tão complexa e heterogênea.

3. FATORES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DAS PATOLOGIAS DA PRÓSTATA

Apesar de não existir uma inter-relação consistente, os fatores ambientais e genéticos parecem participar da etiologia do câncer de próstata. Assim, os hormônios masculinos apresentam papel crucial na promoção do tumor, porém, não desempenham a mesma função na manutenção desses (Narayan, 1994; Walsh & Worthington, 1998).

Os processos biológicos do envelhecimento mostram clara relação com essas patologias, uma vez que essas doenças acometem homens em idades avançadas (Srougi, 1999).

Alguns autores tentam explicar a diferença na incidência do câncer de próstata nas raças, baseando-se no polimorfismo da repetição CAG do receptor de andrógeno (Cussenot & Valeri, 2001).

Vários fatores têm sido sugeridos como associados ao desenvolvimento do câncer de próstata, como dietas ricas em gorduras, o fumo, a exposição à radiação, a obesidade, a altura, o peso ao nascer, a presença de HPB, o consumo de álcool, os níveis de atividade física (Walsh & Worthington, 1998), a presença de neoplasia intra-epitelial prostática (NIP) (Downing *et al.*, 2001), as práticas sexuais ou mesmo a presença de agentes infecciosos (Stamey & McNeal, 1992).

No início da década de 90, vários trabalhos surgiram na tentativa de estabelecer relação entre a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) e o câncer de próstata (McNeal & Dodd, 1990; McNeal & Dood, 1991; Effert *et al.*, 1992).

Atualmente, diversos genes têm sido estudados com intuito de encontrar marcadores de iniciação e progressão para o câncer de próstata. Entre eles destacam-se alguns genes que freqüentemente

apresentam alterações genéticas em células germinativas, como os genes ligados a herança familiar, HPC-1 (Cussenot & Valeri, 2001) e os genes relacionados com polimorfismos, como o receptor de vitamina D – VDR (Taylor *et al.*, 1996), a 5 α -redutase (Reichardt *et al.*, 1995), o receptor de andrógeno - AR (Kantolf *et al.*, 1998), dentre outros.

Outros genes estão diretamente relacionados com alterações somáticas. Dentro desse contexto, destacam-se vários processos como a perda de heterozigosidade (LOH) no cromossomo 13q (Cher *et al.*, 1996) e 17p (Massenkeil *et al.*, 1994); o ganho cromossomal no cromossomo 8q (Cher *et al.*, 1996); a amplificação gênica do AR (Visakorpi, *et al.*, 1995) e da proteína mdm-2 (Osman *et al.*, 1999); a metilação de ilhas CpG em promotores e/ou *enhancer* dos genes AR (Jarrard *et al.*, 1998), E-caderina (Graff *et al.*, 1995) e outros.

Existem, ainda, marcadores sanguíneos como o PSA e a Calikreína humana (HK-2) bem como, marcadores para verificar proliferação celular e inibição de ciclinas dependentes de quinases, além de genes relacionados a apoptose, a angiogênese, a adesão celular, a supressão de metástases, a imortalização (Marzo *et al.*, 2001) e a supressão de tumor, como o gene TP53 (Levine, 1997).

Existem ainda vários outros marcadores que foram recentemente descobertos, como DD3 (Verhaegh *et al.*, 2001) e Rnase L (Carpten *et al.*, 2002).

Compreender os complexos mecanismos que resultam nas patologias da próstata, caracterizando os genes e os possíveis agentes infecciosos associados a estas afecções, pode auxiliar a detecção, o estadiamento, o prognóstico e o tratamento dessas patologias prostáticas, principalmente ao câncer.

3.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E SUA RELAÇÃO COM AS DOENÇAS DA PRÓSTATA

3.1.1. Caracterização dos HPVs

Os vírus têm sido implicados como fatores que contribuem para desenvolvimento de cânceres específicos em humanos (McNicol & Dodd, 1991), devido a vários mecanismos, como estimulação genética da proliferação celular e a imunossupressão do hospedeiro, permitindo, assim, a emergência do tumor (Zur Hausen, 1991).

Os HPVs são pequenos vírus constituídos de DNA que infectam as células epiteliais e mucosas, podendo causar uma variedade de lesões hiperplásicas (Alani & Münger, 1998). Estes vírus, portanto, podem ser mucosotrópicos, que infectam as mucosas, oral, respiratória e genital, e cutaneotrópicos encontrados em indivíduos imunocompetentes e em portadores de epidermodisplasias verruciformes (Reid *et al.*, 1987).

São constituídos por genoma de 7,2 a 8 Kb, o qual pode ser dividido em 3 regiões: a região de controle longa (LCR), que representa 10% do genoma, a região inicial, que apresenta os genes transcritos inicialmente (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), importantes no controle da replicação e transcrição e a tardia, que apresenta os genes expressos tardiamente, L1 e L2, que compõem o capsídeo viral (Figura 2). O controle da expressão gênica é complexo e controlado por fatores transcricionais celulares e virais (Zur Hausen, 1996).

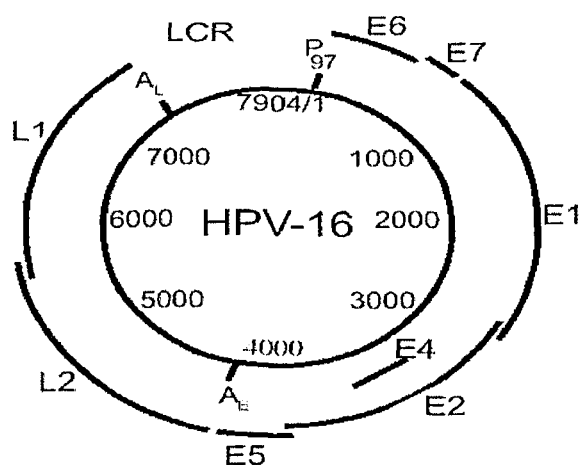


Figura 2. Estrutura do genoma do HPV 16.

Fonte: www.kesler.biology.rhodes.edu/scij/1999/lum.html

Atualmente, existem mais de 90 tipos de HPVs, sendo que aproximadamente 40 infectam o trato anogenital, podendo ser divididos em tipos de alto e baixo risco, associados a carcinogênese anogenital (Alani & Münger, 1998).

Os tipos 16 e 18 que infectam essa região têm sido considerados como tendo alto risco na conversão maligna, diferentemente dos tipos 6 e 11, os quais raramente estão associados a este tipo de lesão, sendo portanto considerados tipos de baixo risco (Zur Hausen, 1996).

As proteínas iniciais, E6 e E7, dos HPV de alto risco são consideradas oncoproteínas (Zur Hausen, 1991), devido à habilidade de se ligarem, respectivamente, as proteínas da célula hospedeira, p53 e Rb (Tu *et al.*, 1994; Zur Hausen, 1994).

Em 1996, o "Centers for Disease Control & Prevention" (CDC), estimou ser o HPV, a doença viral sexualmente transmissível (DST), mais freqüente na população (Okada *et al.*, 2000). Sabe-se que os HPVs são detectados em mais de 90% dos cânceres do colo

uterino (Favre *et al.*, 1997), mostrando, assim, a importância de programas de saúde para o controle destas infecções.

3.1.2. HPV e a Próstata

Atualmente, as pesquisas relacionadas com a presença do HPV se restringem à população do sexo feminino, na qual esta associação tem sido repetidamente documentada. Pouco se sabe da relação entre HPV e a infecção no sexo masculino, apesar da via de transmissão destes vírus ser sexual e bem conhecida.

Acredita-se, portanto, que a discrepância de lesões malignas, HPV associadas, entre homens e mulheres se deve às diferenças de infectividade, persistência e suscetibilidade do epitélio genital à transformação induzida por esses vírus (McNicol & Dodd, 1991).

Mesmo assim, as evidências de HPV em tumores cervicais, vulvares (McNicol & Dodd, 1990; Tu *et al.*, 1994), em lesões penianas, uretrais (McNicol & Dodd, 1991) no líquido seminal, em células do esperma (Effert *et al.*, 1992; Lai *et al.*, 1996) e na urina (Nakazawa *et al.*, 1991) dão suporte para investigação desses vírus na próstata.

Esses vírus têm efeito cooperativo, juntamente com outros carcinógenos humanos, no desenvolvimento dos tumores HPV associados, sendo que, o vírus sozinho não é suficiente para causar câncer, sendo necessário modificações adicionais no DNA da célula hospedeira (Zur Hausen, 1989; Zur Hausen, 1991).

A identificação de um agente infeccioso associado ao CaP, poderia ser importante descoberta juntamente com a possibilidade da próstata atuar como um reservatório glandular desses agentes, participando, então, da transmissão desses organismos por meio de

contatos sexuais (Strickler *et al.*, 1998) ou mesmo via ejaculação (Serfling *et al.*, 1992).

Kyo *et al.*, (1994) sugerem altas taxas de infecção do HPV na próstata, devido à analogia com o colo uterino.

Entretanto, a associação do CaP com HPV é muito mais fraca do que a associação desses vírus com câncer cervical, devido à baixa prevalência de HPV encontrados, porém, é importante lembrar que, os estudos associando HPV e o câncer cervical ficaram inconsistentes por vários anos e isto pode ser o que esteja acontecendo, atualmente, com associação entre o HPV e a próstata (Dillner *et al.*, 1998).

Alguns pesquisadores encontraram clara associação do câncer de próstata com HPV (Serth *et al.*, 1999), sugerindo que o HPV 16 pode estar contribuindo para desenvolvimento desse câncer, enquanto outros mostraram que o HPV está presente de forma semelhante em tecidos malignos e benignos (HPB e tecido normal), sugerindo que a próstata funcionaria como possível reservatório da infecção e re-infecção associadas às neoplasias cervicais (McNicol & Dodd, 1990; McNicol & Dodd, 1991; Rotola *et al.*, 1992). Contrapondo estes resultados, outros autores não encontraram HPV nos tecidos prostáticos analisados (Effert *et al.*, 1992; Wideroff *et al.*, 1996; Strickler *et al.*, 1998), concluindo que estes vírus não estão associados às doenças da próstata.

Acredita-se que estas variações se devam às diferenças na sensibilidade dos métodos utilizados (Serth *et al.*, 1999), ao tipo e quantidade de amostras (Ibrahim *et al.*, 1992; Strinckler *et al.*, 1998), ao método cirúrgico utilizado para coletar amostra (Tu *et al.*, 1994), às características da população analisada (Ibrahim *et al.*, 1992; Tu *et al.*, 1994), ao baixo número de cópias virais bem como

à heterogeneidade genética e/ou histológica da próstata (Serth *et al.*, 1999).

3.1.3. Métodos de Detecção dos HPVs

Os diagnósticos convencionais incluindo cultura, imunohistoquímica e microscopia eletrônica são ineficientes ou insensíveis para detectar HPV em amostras clínicas (McNicol & Dodd, 1991).

Recentemente, técnicas que utilizam ácidos nucléicos, como a técnica de hibridação (Southern, 1975), bem como PCR, desenvolvida em 1985 por Kary Mullis (Saiki *et al.*, 1985), têm permitido rastrear a presença do DNA viral em amostras clínicas.

A PCR, que demonstra ser uma técnica eficiente e extremamente sensível, capaz de detectar ínfimas cópias do DNA viral do HPV, é um método de amplificação *in vitro*, de pequenas quantidades de DNA ou RNA, que requer a enzima DNA polimerase, os dNTPs (nucleotídeos trifosfatos – citosina, guanina, timina e adenina), a molécula de ácido nucléico e os *primers*, que seriam os iniciadores, desenhados para flanquearem a região de interesse do estudo a ser realizado. Estes reagentes são misturados em um recipiente e encaminhados ao termociclador no qual os passos de desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* e extensão dos fragmentos pela atividade enzimática da *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerase), permitem gerar milhões de cópias da região alvo (Innis & Gelfand, 1990).

Dentre os *primers* mais utilizados nos EUA para detecção do HPV encontra-se o par MY09/MY11 (Manos *et al.*, 1989), capaz de detectar 1 cópia do DNA viral por 100 células da próstata (Strickler *et al.*, 1998). Estes iniciadores amplificam a região L1 do capsídeo

viral, gerando um fragmento de aproximadamente 450 pb, de pelo menos, 25 tipos de HPV genitais (Ting & Manos, 1990).

A possibilidade de erro em detectar agentes infecciosos, torna necessário e indispensável o uso de um gene controle na PCR com intuito de monitorar o processamento da amostra clínica e o desempenho da reação (Ting & Manos, 1990).

Posteriormente à detecção dos HPVs, são realizadas as genotipagens ou tipagens dos mesmos. Várias técnicas como *Southern blot*, *dot blot* (Ting & Manos, 1990), ou mesmo restrição enzimática (Bernard *et al.*, 1994), têm sido utilizadas para este fim. Entretanto, a PCR é mais sensível por permitir amplificação da seqüência alvo do DNA, sendo, portanto, a melhor escolha para estudos epidemiológicos de investigação do HPV (Guerrero *et al.*, 1992; Herrington *et al.*, 1995).

A modificação na PCR, como a dupla amplificação (PCR-*nested*) de um fragmento, ou seja, o fragmento gerado durante a primeira reação é, posteriormente, amplificado com outro par de *primer*, interno ao primeiro fragmento, aumentando a sensibilidade de detecção desses agentes (Tang *et al.*, 1997), diminuindo resultados falso-negativos e aumentando a chance de gerar resultados falso-positivos durante a manipulação. Por isso todo cuidado deve ser tomado durante a transferência do produto da primeira reação para a segunda.

Esta técnica tem sido utilizada para detecção de HPV em verrugas cutâneas (Harwood *et al.*, 1999) e em esfregaços cervicais e vaginais (Husnjak *et al.*, 2000).

3.2. O SUPRESSOR DE TUMOR – P53

3.2.1. Caracterização do gene e da proteína p53

O gene TP53, descoberto em 1979, foi considerado por muito tempo como proteína oncogênica, envolvida no controle do ciclo celular. Este gene localiza-se no braço curto do cromossomo 17 (Figura 3), na posição 17p13 (McBride *et al.*, 1986) e contém em extensão total 20 Kb e 11 exons, sendo o primeiro exon separado do segundo, por um intron de aproximadamente 10 Kb (Lamb & Crawford, 1986).

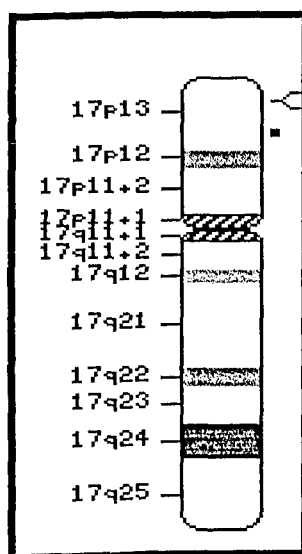


Figura 3. Cromossomo 17.
Na posição 17p13 localiza
o locus do gene TP53.

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov

Este gene, supressor de tumor (Koshland, 1993), apresenta 2 promotores, o P1, que está localizado 100-250 pb acima do primeiro exon do gene, o qual não é traduzido, e o segundo promotor, P2, que se localiza no intron 1 e é 50 vezes mais eficiente do que o primeiro. Desta forma, a regulação do TP53 se dá por 2 promotores, que desempenham papel importante tanto em células normais quanto nas células mutadas (Reisman *et al.*, 1988).

O gene supressor de tumor TP53 codifica para uma fosfoproteína (Hainaut *et al.*, 1997) de 393 aminoácidos (Levine, 1997), 53 KDa (Reisman *et al.*, 1988) que atua como fator de transcrição (Koshand, 1993; Levine, 1997; Hainaut *et al.*, 1997), no ciclo celular, regiões conhecidas como *checkpoints* (Paulovich *et al.*, 1997; Meek, 1999), na integridade do DNA e na sobrevivência de células expostas à agentes que danificam o material genético, atuando desta forma, como inibidora da carcinogênese (Hainaut *et al.*, 1997).

Os *checkpoints* são como sistemas de transdução de sinal que comunica a informação entre a lesão no DNA e os componentes do ciclo celular (Paulovich *et al.*, 1997).

A proteína p53, que é um tetrâmero (Jeffrey *et al.*, 1995), apresenta 4 domínios principais, sendo o domínio N-terminal, a região onde ocorre ativação positiva da transcrição (resíduos 1-42), regulada negativamente pela mdm2 (May & May, 1999), a qual tem importante papel na degradação da p53, funcionando com ubiquitina-ligase ou como proteína exportadora da p53 do núcleo para o citoplasma, onde será degradada (Ashcroft & Vousden, 1999). Posteriormente, existe um domínio central ou core, o qual apresenta duas atividades bioquímicas, ou seja, capacidade de se ligar as seqüências específicas no DNA (resíduos 102-292) (May &

May, 1999) e de reparar os danos do DNA via atividade de exonuclease 3' - 5' (Albrechtsen *et al.*, 1999). Em seguida, entre os aminoácidos 324-355, existe um sítio de oligomerização da proteína, que é constituído por 2 alfa hélices e 2 beta pregueadas (Levine, 1997), sendo essencial para atividade supressora da proteína (Jeffrey *et al.*, 1995). Por último, um complexo domínio C-terminal com múltiplas funções, como as interações com proteínas heterólogas e a capacidade de se ligarem sem especificidade, ao DNA danificado (Hainaut *et al.*, 1997), ou mesmo, a habilidade em regular a ligação da p53, por meio do domínio core, às seqüências específicas no DNA ou RNA (Levine, 1997).

Mesmo com todas estas descrições, acima mencionadas, o exato papel de cada um dos domínios ainda não está claro (Hainaut *et al.*, 1997).

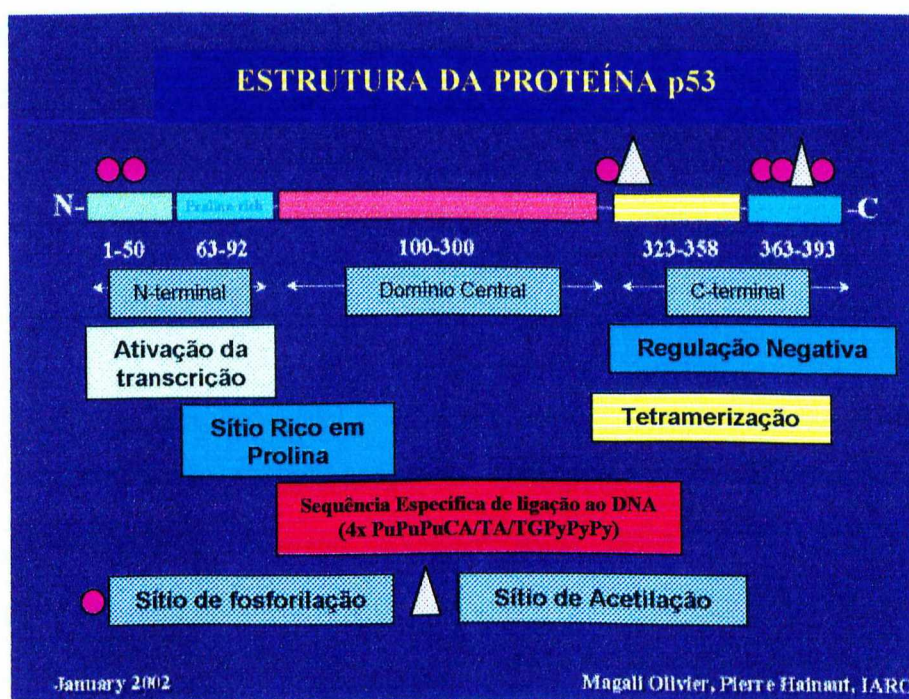


Figura 4. Estrutura da proteína p53.

Fonte: www.iarc.fr/p53/

3.2.2. Mecanismos de Regulação da p53

Geralmente, em uma célula normal a concentração da p53 é baixa e tem vida-média curta de aproximadamente 20 minutos (Levine, 1997). Entretanto, diferentes tipos de danos ao DNA como, por exemplo, quebra da fita dupla produzida por irradiação e a presença de outros tipos de danos, devido à irradiação UV ou químicos, levam ao aumento da vida-média da proteína p53 que, possivelmente, acontece, graças à modificação pós-traducional da proteína, sem indução dramática nos níveis de RNA mensageiro, via mecanismos de acetilação, fosforilação e desfosforilação da proteína (Jimenez *et al.*, 1999). Entretanto, alguns autores acreditam que este mecanismo de regulação pode ocorrer também, em nível transcricional (Reisman *et al.*, 1988). Esta proteína é, então, translocada para o núcleo e estabilizada, ficando competente para ligar ao DNA e transativar genes em respostas aos danos (Jimenez *et al.*, 1999).

O controle pós-traducional é permitir um método rápido, sensível e flexível, tendo fácil reversão, para regular a atividade da p53, em resposta a vários estresses celulares (Lakin & Jackson, 1999).

Outro mecanismo capaz de ativar p53 é a hipóxia, freqüente em tumores que se multiplicam e chegam a tamanhos críticos, gerando a necessidade de angiogênese para dar subsídios ao crescimento tumoral, entretanto a p53 do tipo selvagem, leva a célula à morte, por inibir a angiogênese (Almog & Rotter, 1997).

O aumento na expressão de p53 está diretamente relacionado com a extensão do dano no DNA (Levine, 1997), que ativa transcrição de genes como os inibidores de ciclina quinase, p21 (Levine, 1997; Hainaut *et al.*, 1997; Lakin & Jackson, 1999) e

GADD45 (Levine, 1997), os quais regulam negativamente o ciclo celular em G1 e reguladores de apoptose como bax-1, que inibe bcl-2, que é considerada uma proteína anti-apoptótica (Hainaut *et al.*, 1997; Lakin & Jackson, 1999) e IGF (fator de crescimento de insulina) que aumenta apoptose e diminui a resposta a replicação celular (Levine, 1997; Almog & Rotter, 1997).

A p53 parece atuar, também, em mais 2 pontos do ciclo G2/M e G0/G1 (Levine, 1997; Almog & Rotter, 1997). A interrupção do ciclo celular em G2 parece estar associada à indução da proteína sigma 14-3-3 (Lakin & Jackson, 1999). Existem relatos de que p53 regula a duplicação do centrômero ou monitora a super produção dos mesmos, sugerindo possível mecanismo pelo qual, a perda da p53 leva à instabilidade genética (Fukasawa *et al.*, 1996).

Vários outros genes têm sido relacionados ao controle da atividade da p53. As proteínas quinases, ATM (proteína quinase mutada em pacientes com ataxia telangiectasia) e ATR (quinase relacionada à ataxia telangiectasia), fosforilam p53 em algumas serinas, como a 15 e 37 e com isto modificam a estrutura terciária da proteína, o que leva à inibição da interação entre a região N-terminal da p53 e mdm2 (Lakin & Jackson, 1999; Matlashewski *et al.*, 1999; Jimenez *et al.*, 1999).

Não se sabe ao certo, como a célula opta por cessar a replicação ou levar a célula à morte, porém numerosos fatores afetam esta decisão (Levine, 1997; Lakin & Jackson, 1999), como a especificidade e maturidade celular, os fatores celulares internos, ou mesmo, os sinais externos que ativam p53 na célula (Almog & Rotter, 1997).

O produto do gene TP53 parece ter também envolvimento na diferenciação de diversos tipos de células, sendo a p53 regulada

em momentos diferentes, dependente do tipo de célula (Almog & Rotter, 1997).

3.2.3. Mecanismos de Inativação do Gene TP53

Em, aproximadamente, 50% dos cânceres (Koshland, 1993; Harris, 1993; Almog & Rotter, 1997), ocorre inativação da função da proteína supressora de tumor, p53, por meio de vários mecanismos, incluindo deleção e, principalmente, mutação de ponto (Hainaut *et al.*, 1997) *missense* (troca o sentido do aminoácido), que ocorre com freqüência superior a 90% (Harris, 1993; Hernandez-Boussard, *et al.*, 1999), sendo, portanto, o tipo mais freqüente (Vogelstein & Kinzler, 1992; Almog & Rotter, 1997). As deleções e inserções são menos freqüentes representando, 12,5% do total de mutações (Hernandez-Boussard, *et al.*, 1999). As mutações sem sentido (nonsense) geralmente produzem proteínas truncadas e não ocorrem na região de ligação ao DNA (May & May, 1999).

A pré-seleção da mutação é feita quando a enzima DNA polimerase passa, na fita do DNA, e erra ao ler a lesão que aí se encontra. Assim, a fita não transcrita é reparada com menor eficiência do que a fita transcrita, na qual ocorre a maioria das mutações (Pfeifer, 1997).

As células que apresentam mutações ou inativação da p53, por proteínas virais ou próprias do hospedeiro, são geneticamente mais instáveis, o que permite acúmulo de mutações e rearranjos cromossômicos que irão aumentar e permitir rápida seleção de clones malignos (Lane, 1992).

Já foram descritas, até 2002, mais de 16.000 mutações (IARC, 2002) que, freqüentemente, resultam em proteína mutante, superexpressa, quando comparada aos níveis da proteína

selvagem. Entretanto, existem mutações que levam à ausência da proteína, ou mesmo, a não modificação da quantidade da mesma (Borresen, *et al.*, 1991).

Alguns tumores inativam p53 via amplificação do gene MDM2 ou pela localização da proteína no citoplasma, ou seja, translocação via mdm2 da p53 para citoplasma, tornando-a inativa (Vogelstein & Kinzler, 1992; Levine, 1997; Lakin & Jackson, 1999), portanto nestes tumores, P53 não está mutado (Lane, 1992), uma vez que a proteína já está sendo inativada. Existem, ainda, cânceres que não apresentam mutações no P53, como teratocarcinomas (Levine, 1997) ou que apresentam inativação da p53 por interação com proteínas virais (Vogelstein & Kinzler, 1992), como a interação da oncoproteína viral E6 do Papilomavírus Humano tipo 16 e 18 com a p53. Esta interação ocorre via proteína ligase E6-AP (Hengstermann *et al.*, 2001), a qual leva à degradação da p53 via proteossomo dependente de ubiquitina (Scheffner *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1999a). Este mecanismo bloqueia o controle via p53, do ciclo celular e da apoptose, favorecendo a replicação viral (Lane, 1992; Tong *et al.*, 2000).

Ao contrário destes mecanismos, as mutações podem levar à perda de função (capacidade supressora de tumor) e/ou ganho de função (funcionando como oncogene), devido à alteração do repertório de genes regulados pela p53 (Harris, 1993).

A maioria das mutações, que predispõe ao pior prognóstico (Koshland, 1993), acontece na região onde a proteína apresenta sítios de ligação ao DNA. Este evento permite a proliferação de células que possuem p53 suprimidas ou ausentes (Hainaut *et al.*, 1997; Pfeifer, 1997), devido à perda da capacidade da proteína p53 se ligar aos sítios específicos e regular a transcrição de genes

importantes (Vogelstein & Kinzler, 1992) no controle do ciclo celular e da apoptose.

Essas mutações permitem vantagens para expansão clonal das células pré-neoplásicas ou neoplásicas (Hainaut *et al.*, 1997), por aumentarem as taxas de proliferação celular e a quantidade de células transformadas, devido a inibição da apoptose (Harris, 1993).

A grande diversidade de mutações, em mais de 250 códons, se torna uma valiosa ferramenta para identificar as causas de algumas neoplasias humanas podendo ser útil à detecção, ao diagnóstico e às terapias do câncer em questão (Vogelstein & Kinzler, 1992).

Acredita-se que a p53 mutante pode se associar à proteína tipo selvagem, de maneira negativa-dominante, levando a perda de função da proteína do tipo selvagem, assim, o indivíduo heterozigoto para alelo selvagem não tem função normal (Vogelstein & Kinzler, 1992). Ao contrário, Chen *et al.*, (1990) relatam que ambos alelos selvagens do P53 têm que estar mutados para ter efeito oncogênico e que, em igual dosagem, o tipo selvagem é capaz de superar a influência do alelo mutado.

Segundo o banco de dados do IARC (International Agency of Research on Cancer), a maioria das mutações, aproximadamente 90% (Levine, 1997; Hainaut *et al.*, 1997), são encontradas nas regiões dos exons de 5 a 8. Existem, ainda, dentro destas regiões, os *hotspots* (códons 175, 245, 248, 273 e 282) (Pfeifer, 1997), que seriam tanto regiões do DNA altamente suscetíveis a mutações como um códon que produz um resíduo chave na função biológica da proteína, ou mesmo, ambos (Beroud *et al.*, 1996).

Esse mesmo banco de dados relata que esta proporção de mutações pode estar subestimada, devido ao grande número de

pesquisas que utilizam apenas as regiões *hotspots* para avaliar a presença de mutações (Beroud *et al.*, 1996).

Acredita-se que após a mutação do tipo *missense* ocorrer em um dos alelos, a função do outro alelo selvagem é perdida pelo evento conhecido como perda de heterozigosidade (LOH) (May & May, 1999). Entretanto, alguns autores acreditam que LOH é um dos múltiplos eventos que ocorre anterior às mutações (Macera *et al.*, 1999).

Pessoas heterozigotas para alelo selvagem do P53 desenvolvem câncer com alta frequência (90-95%) e quase sempre em idade precoce, mostrando que a quantidade de p53 na célula influencia o fenótipo (Levine, 1997).

A natureza das mutações também varia de um tumor para outro (Hainaut *et al.*, 1997) e este fato altera a expressão da proteína p53 por alterar os mecanismos de transativação, necessários para regular a expressão do gene TP53 (Reisman *et al.*, 1988) e dos genes regulados por ele.

3.2.4. Mutações no gene TP53 no câncer de próstata

A frequência de mutações em câncer de próstata primários varia de 0-42% (Castagnaro *et al.*, 1993; Moyret Lalle *et al.*, 1995; Wertz *et al.*, 1996).

Alguns autores acreditam que essas mutações representam um evento tardio na progressão do câncer de próstata, ou seja, câncer metastático ou resistente a andrógeno, não estando presentes em todos focos derivados de um mesmo tumor (Roy-Burman *et al.*, 1997). Outros sugerem que estas mutações não são essenciais para o câncer metastático (Wang & Wong, 1997).

Apesar da incidência de mutação não ser alta, quando ocorre, contribui para evolução do câncer de próstata, sendo importante marcador para prognóstico de agressividade e de tratamento da doença (Roy-Burman *et al.*, 1997; Wang & Wong, 1997). Essas mutações são importantes para terapias que visam reparo da p53 inativa (Almog & Rotter, 1997).

A proteína p53 selvagem, parece ter efeito negativo, "*in vitro*", na transcrição do gene PSA, por interromper a interação entre a região N-terminal e a C-terminal do receptor de andrógeno humano (ARh), necessária para regular positivamente a expressão do PSA. Entretanto, sugere-se que a proteína p53 mutada não tem esta atividade negativa permitindo alta transcrição do gene PSA pela alta transativação do AR no promotor deste gene. Assim, o fenótipo metastático do câncer de próstata, pode depender das mudanças na expressão de genes que são regulados pelo TP53, tanto por via direta na transcrição quanto por efeito negativo no ARh, sendo portanto, associado a regulação da expressão gênica regulada por andrógenos (Shenk, *et al.*, 2001).

Alguns autores levantam a hipótese de que diferenças no padrão de mutações no gene TP53, em vários de tipos de cânceres, refletem efeito da especificidade a carcinógenos particulares, endógenos ou exógenos, bem como da origem do tumor (May & May, 1999; Pfeifer, 1997). Assim, estas mutações no TP53, variam consideravelmente, com o tipo do tumor e parece ser específica a cada órgão (Pfeifer, 1997).

Acredita-se ainda, que alguns parâmetros podem influenciar o espectro de mutações, como a idade, o sexo, a raça, o local de moradia, os fatores ambientais, etc (De Vries *et al.*, 1996; Hainaut *et al.*, 1997).

Os dados controversos em relação à presença de mutações no gene TP53 no câncer de próstata, sugerem que este gene não é um bom marcador para predizer o prognóstico do paciente, entretanto, acredita-se que estas alterações possam ter importante papel no desenvolvimento de resistência ao tratamento de radiação em cânceres metastáticos (Ruijter *et al.*, 1999).

3.2.5. Polimorfismo Arg72Pro do gene TP53

Um trabalho realizado com cDNA e alguns clones genômicos do gene TP53 de uma variedade de células normais e transformadas, revelou que no códon 72 desse gene, existem variações de aminoácidos como prolina (Pro), arginina (Arg) e raramente cisteína (Cis) (Matlashewski *et al.*, 1987).

Nos humanos, tem-se sugerido que indivíduos homozigotos para alelo arginina são mais predispostos ao desenvolvimento de tumores do que os homozigotos para alelo prolina (Matlashewski *et al.*, 1987).

Estes polimorfismos são mantidos pela seleção natural (Beckman *et al.*, 1994), embora apresentem habilidades diferentes de se ligarem a componentes da maquinaria transcricional, o que resulta em diferentes mecanismos de ativar transcrição, induzir apoptose e reprimir transformação de células tumorais primárias (Thomas *et al.*, 1999b).

Acredita-se que o desenvolvimento do câncer e a possibilidade de alguns tumores responderem a terapia, dependem do polimorfismo do códon 72 do gene P53 (Thomas *et al.*, 1999b).

Homozigotos para alelo que codifica para arginina pode representar potencial risco para tumorigênese da pele (Dokianakis *et al.*, 2000) e da bexiga (Soulitzis *et al.*, 2001).

Entretanto, não foi encontrada diferença na frequência alélica desse polimorfismo entre os pacientes com carcinoma cervical e o grupo controle (Tong *et al.*, 2000), apesar de outro trabalho ter encontrado que os homozigotos para alelo arginina conferem alta suscetibilidade a tumorigênese cervical associada ao HPV (Makni *et al.*, 2000).

Similarmente tem sido sugerido que homens com o genótipo Pro/Pro possuem um risco reduzido para desenvolver câncer de próstata (Henner *et al.*, 2001).

A diversidade genética das diferentes populações dá subsídio aos estudos epidemiológicos que tentam relacionar o polimorfismo do códon 72 com o desenvolvimento de neoplasias associadas ou não ao HPV.

3.2.6. Metodologias para Detecção de Mutações no gene P53

A variação na detecção de mutações no gene TP53 resulta do uso de diferentes técnicas, como gel de gradiente de desnaturação (DGGE) ou polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), ou também da heterogeneidade das amostras analisadas. Assim, as alterações neste gene podem depender não apenas de qual tumor esta sendo analisado, mas também de qual região desse tumor (Roy-Burman *et al.*, 1997; Ruijter *et al.*, 1999).

A técnica de SSCP permite a detecção de mutações de ponto ou variações nas seqüências nucleotídicas, devido às mudanças conformacionais nas moléculas de DNA de fita simples, durante a eletroforese em gel não desnaturante (Pooart *et al.*, 1999). Entretanto, vários fatores, como quantidade de *primers*, tamanho do fragmento a ser amplificado, a posição e a natureza da substituição no fragmento, a composição da seqüência do fragmento de DNA, influenciam na conformação das fitas simples (Sarkar *et al.*, 1992; Scheffield *et al.*, 1993).

Devido à instabilidade da conformação gerada pela fita simples do DNA, alguns autores desenvolveram o LIS-SSCP (Low ionic strength – single strand conformational polymorphism), que consiste em uma adaptação da técnica de SSCP, onde a solução desnaturante de formamida é substituída por uma solução de baixa força iônica (LIS), capaz de garantir maior estabilidade das moléculas (Maruya *et al.*, 1996).

4. REFERÊNCIAS

- Alani, R. & Münger, K., Human papillomaviruses. *Science & Medicine*, 28-35 (1998).
- Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmüller, L. & Deppert, W., Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, **18**, 7706-7717 (1999).
- Almog, N. & Rotter, V., Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1333**, F1-F27 (1997).
- Ashcroft, M. & Vousden, K.H., Regulation of p53 stability. *Oncogene*, **18**, 7637-7643 (1999).
- Beckman, G., Birgander, R., Sjölander, A., Saha, N., Holmberg, P.A., Kivelä, A. & Beckman, L., Is p53 polymorphism maintained by natural selection?. *Hum. Hered.*, **44**, 266-270 (1994).
- Bernard, H-U., Chan, S-Y., Manos, M.M., Ong, C-K., Villa, L.L., Delius, H., Peyton, C.L., Bauer, H.M. & Wheeler, C.M., Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J. Inf. Disease*, **170**, 1077-1085 (1994).
- Béroud, C., Verdier, F. & Soussi, T., p53 gene mutation: software and database. *Nucl. Acid. Research*, **24**, 147-150 (1996).
- Bogliolo, G. ed. Bogliolo – *Patologia Geral*, 2^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998. 220p.
- Borresen, A-L., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Malkin, D. Lystad, S., Andersen, T.I., Nesland, J.M., Isselbacher, K.J. & Friend, S.H., Constant denaturant gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8405-8409 (1991).

Carpten, J., Nupponen, N., Isaacs, R.S., Robbins, C., Xu, J., Faruque, M., Moses, T., Ewing, C., Gillanders, E., Hu, P., Bujnovszky, P., Mkalowska, I., Baffoe-Bonnie, A., Faith, D., Smith, J., Stephan, D., Wiley, K., Brownstein, M., Gildea, D., Kelly, B., Jenkins, R., Hostetter, G., Mtikainen, M., Schleutker, J., Klinger, K., Connors, T., Xiang, Y., Wang, Z., De Marzo, A., Papadopoulos, N., Kallioniemi, O.-P., Burk, R., Meyers, D., Grönberg, H., Meltzer, P., Silverman, R., Bailey-Wilson, J., Walsh, P., Isaacs, W. & Trent, J. Germiline mutation in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nature Genetics*, **30**, 181-184 (2002).

Castagnaro, M., Yandell, D.W., Dockhorn Doworniczak, B., Wolfe, H.J. & Poremba, C., Androgen receptor gene mutations and p53 gene analysis in advanced prostate cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol*, **77**, 119-123 (1993).

Chen, P.-L., Chen, Y., Bookstein, R. & Lee, W.-H., Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science*, **250**, 1576-1580 (1990).

Cher, M.L., Bova, G.S., Moore, D.H., Small, E.J., Carroll, P.R., Pin, S.S., Epstein, J.I., Isaacs, W.B. & Jensen, R.H. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res.*, **56**, 3091-3102 (1996).

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*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992: 226-227.

Cussenot, O. & Valeri, A., Heterogeneity in genetic susceptibility to prostate cancer. *Eur. J. Int. Med.*, **12**, 11-16 (2001).

De Vries, E.M.G., Ricke, D.O., De Vries, T.N., Hartmann, A., Blaszyk, H., Liao, D., Soussi, T., Kovach, J.S. & Sommer, S.S., Database of mutations in the p53 and APC tumor suppressor genes designed to facilitate molecular epidemiological analyses. *Hum. Mut.*, **7**, 202-213 (1996).

Dillner, J., Knekt, P., Boman, J., Lehtinen, M., Af Geijersstam, V., Sapp, M., Schiller, J., Maatela, J. & Aromaa, A., Sero-epidemiological association between human-papillomavirus infection and risk of prostate cancer. *Int. J. Cancer*, **75**, 564-567 (1998).

Dokianakis, D.N., Koumantaki, E., Billiri, K. & Spandidos, D.A., P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in development of HPV-associated non-melanoma skin cancer in immunocompetent hosts. *Int. J. Mol. Medicine*, **5**, 405-409 (2000).

Downing, S.R., Jackson, P. & Russell, P.J., Mutations within the tumour suppressor gene p53 are not confined to a late event in prostate cancer progression: a review of the evidence. *Urol. Oncol.*, **6**, 103-110 (2001).

Effert, P.J., Frye, R.A., Neubauer, A., Liu, E.T. & Walther, P.J., Human papillomavirus types 16 and 18 are not involved in human prostate carcinogenesis: analysis of archival human prostate cancer specimens by differential polymerase chain reaction. *The J. Urol.*, **147**, 192-196 (1992).

Favre, M., Ramoz, N. & Orth, G., Human papillomaviruses: general features. *Clinics in Dermat.*, **15**, 181-198 (1997).

Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. & Woude, G.F.V., Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, **271**, 1744-1747 (1996).

Graff, J.R., Herman, J.G., Iqbal, R.G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D.F., Isaacs, W.B., Pitha, P.M., Davidson, N.E. & Baylin, S.B., E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.*, **55**, 5195-5199 (1995).

Guerrero, E., Daniel, R.W., Bosch, F.X., Castellsagué, X., Muñoz, N., Gili, M., Viladiu, P., Navarro, C., Zubiri, M.L., Ascunce, N., Gonzalez, L.C., Tafur, L., Izzarugaza, I. & Shah, K.V., Comparison of ViraPap, southern hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2951-2959 (1992).

Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Hollstein, M., Greenblatt, M., Hovig, E., Harris, C.C. & Montesano, R., Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucl. Acid. Res.*, **25**, 151-157 (1997).

Harris, C.C., p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science*, **262**, 1980-1981 (1993).

Harwood, C.A., Spink, P.J., Suretheran, T., Leigh, I.M., De Villiers, E-M., McGregor, J.M., Proby, C.M. & Breuer, J., Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3545-3555 (1999).

Hengstermann, A., Linares, L.K., Ciechanover, A., Whitaker, N.J. & Scheffner, M., Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *PNAS*, **98**, 1218-1223 (2001).

Henner, W.D., Evans, A.J., Hough, K.M., Harris, E.L., Lowe, B.A. & Beer, T.M., Association of codon 72 polymorphism of p53 with lower prostate cancer risk. *Prostate*, **49**, 263-266 (2001).

Hernandez-Boussard, T., Montesano, R. & Hainaut, P., Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database. *Genet. Analysis: Biomol. Engineering*, **14**, 229-233 (1999).

Herrington, C.S., Anderson, S.M., Bauer, H.M., Troncone, G., De Angelis, M.L., Noell, H., Chimera, J.A., Van Eyck, S.L. & McGee, J.O'D., Comparative analysis of human papillomavirus detection by PCR and non-isotopic in situ hybridization. *J. Clin. Pathol.*, **48**, 415-419 (1995).

Husnjak, K., Grce, M., Magdic, L. & Pavelic, K., Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J. Virol. Methods*, **88**, 125-134 (2000).

Ibrahim, G.K., Gravitt, P.E., Dittrich, K.L., Ibrahim, S.N., Melhus, O., Anderson, S.M. & Robertson, C.N., Detection of human papillomavirus in the prostate by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *The J. Urol.*, **148**, 1822-1826 (1992).

Innis, M.A. & Gelfand, D.H. Optimazation of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Skinsky, J.J. & White, T.J. *PCR protocols: A guide to methods and Applications*, San Diego: Academic Press, Inc, 1990: 3-12.

Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de Próstata**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/câncer/tipos/próstata>>. Acessado em: 10 out. 2002.

International Agency of Research on Cancer. **IARC TP53 mutation database**. Disponível em: <<http://www.p53.fr>>. Acesso em: 20 jan. 2002.

Jarrard, D.F., Kinoshita, H., Shi, Y., Sandefur, C., Hoff, D., Meisner, L.F., Chang, C., Herman, J.G., Isaacs, W.B. & Nassit, N. Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **58**, 5310-5314 (1998).

Jeffrey, P.D., Gorina, S. & Pavletich, N.P., Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, **267**, 1498-1502 (1995).

Jimenez, G.S., Kahn, S.H., Stommel, J.M. & Wahl, G.M., p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene*, **18**, 7656-7665 (1999).

Kantoff, P., Giovannucci, E. & Brown, M. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and its relationship to prostate cancer. *Biochim. Biophys Acta*, **1378**, C1-C5 (1998).

Kligerman, J., Estimativas sobre a incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2001. *Revista Brasileira de Cancerologia*, **47**, 111-114 (2001).

- Koshland, D.E., Molecule of year. *Science*, **262**, 1953 (1993).
- Kyo, S. Inoue, M., Koyama, M., Fujita, M., Tanizawa, O, & Hakura, A., Detection of High-Risk Human Papillomavirus in the cervix and semen of sex partners. *J. Inf. Diseases*, **170**, 682-685 (1994).
- Lai, Y.M., Yang, F-P. & Pao, C.C., Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fert. and Steril.*, **65**, 1026-1030 (1996).
- Lakin, N. & Jackson, S., Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, **18**, 7644-7655 (1999).
- Lamb, P. & Crawford, L., Characterization of the human p53 gene. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1379-1385 (1986).
- Lane, D.P., p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16 (1992).
- Levine, A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331 (1997).
- Macera, M.J., Godec, C.J., Sharma, N. & Verma, R.S., Loss of heterozygosity of the TP53 tumor suppressor gene and detection of point mutations by the non-isotopic RNase cleavage assay in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet.*, **108**, 42-47 (1999).
- Makni, H., Franco, E.L., Kaiano, J., Villa, L.L., Babrecque, S., Dudley, R., Storey, A. & Matlasshewski, G., p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int. J. Cancer*, **87**, 528-533 (2000).
- Manos, M.M., Ting, Y., Wright, D.K., Lewis, A.J., Broker, T.R. & Wolinsky, S.M., The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, **7**, 209-214 (1989).
- Maruya, E., Saji, H. & Yokoyama, S., PCR-LIS-SSCP (Low Ionic strength Single-stranded conformation polymorphism) – A simple method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1, -DQB1, and –DPB1. *Genome Methods*, **6**, 51-57 (1996).

Marzo, A.M., Putzi, M.J. & Nelson, W.G., New concepts in the pathology of prostatic epithelial carcinogenesis. *Urol.*, **57**, 103-114 (2001).

Massenkeil, G., Oberhuber, H., Hailemariam, S., Sulser, T., Diener, P.A., Bannwart, F., Schafer, R. & Schwarte-waldhoff, I. P53 mutations and loss of heterozygosity on chromosome 8p, 16p, 17p, and 18q are confined to advanced prostate cancer. *Anticancer Res.*, **14**: 2785-90 (1994).

Matlashewski, G.J., Tuck, S., Pim, D., Lamb, P., Schneider, J. & Crawford, L.V., Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 961-963 (1987).

Matlashewski, G., p53: Twenty years on, meeting review. *Oncogene*, **18**, 7618-7620 (1999).

May, P. & May, E., Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, **18**, 7621-7636 (1999).

McBride, O.W., Merry, D. & Givol, D., The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 130-134 (1986).

McNicol, P.J. & Dodd, J.G., Detection of human papillomavirus DNA in prostate gland tissue by using the polymerase chain reaction amplification assay. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 409-412 (1990).

McNicol, P.J. & Dodd, J.G., High prevalence of human papillomavirus in prostate tissues. *The J. Urol.*, **145**, 850-853 (1991).

Meek, D.W., Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?. *Oncogene*, **18**, 7666-7675 (1999).

Moyret Lalle, C., Marcais, C., jacquemier, J., Moles, J.P., Daver, A., Soret, J.Y., Jeanteur, P., Ozturk, M. & Theillet, C., Ras, p53 and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int. J. Cancer*, **64**, 124-129 (1995).

Nakazawa, A., Inoue, M., Fujita, M., Tanizawa, O. & Hakura, A., Detection of human papillomavirus type 16 in sexual partners of patients having cervical by polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1187-1190 (1991).

Narayan, P., Neoplasias da próstata. In: Tanagho, E.A. & Mcaninch, J.W. *Smith – Urologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 1994: 292-293.

Okada, M.M.K., Gonçalves, M.A.G. & Giraldo, P.C., Epidemiologia e Patogênese do Papilomavírus humano (HPV). In: Carvalho, J.J.M. & Oyakawa, N., *1 Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano*. São Paulo: BG Editora e Produções Culturais Ltda, 2000: 1.

Osman, I., Dobnjak, M., Fazzari, M., Ferrara, J., Scher, H.I. & Condorn-Cardo, C., Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact on tumor progression. *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2082-2088 (1999).

Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. & Hartwell, L.H., When checkpoints fail. *Cell*, **88**, 315-321 (1997).

Pfeifer, G.P. & Holmquist, G.P., Mutagenesis in the P53 gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1333**, M1-M8 (1997).

Pooart, J., Limpai boon, T. & Lulitanond, V., Improved nonisotopic PCR-SSCP for screening of p53 mutations. *Clin. Biochem.*, **32**, 233-235 (1999).

Redi, R., Greenberg, M., Jenson, A.B., Husain, M., Willett, J., Daoud, Y., Temple, G., Stanhope, C.R., Sherman, A.I., Phibbs, G.D. & Lorincz, A.T., The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am. J. Obst. Gynecol.*, **156**, 212-222 (1987).

Reichardt, J.K., Makridakis, N., Henderson, B.E., Yu, M.C., Pike, M.C. & Ross, R.K. Genetic variability of the human SRD5A2 gene: implications for prostate cancer risk. *Cancer Res.*, **55**, 3973-3975 (1995).

Reisman, D., Greenberg, M. & Rotter, V., Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5146-5150 (1988).

Rotola, A., Monini, P., Di Luca, D., Savioli, A., Simone, R., Secchiero, P., Reggiani, A. & Cassai, E., Presence and physical state of HPV DNA in prostate and urinary-tract tissues. *Int. J. Cancer*, **52**, 359-365 (1992).

Roy-Burman, P., Zheng, J. & Miller, G.J., Molecular heterogeneity in prostate cancer can TP53 mutation unravel tumorigenesis?. *Mol. Med. Today*, 476-482 (1997).

Ruijter, E., Van de kaa, C., Miller, G., Ruiten, D., Debruyne, F. & Schalken, J., Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocrine Review*, **20**, 22-45 (1999).

Sadi, A., ed. *Patologia Urogenital*. Sao Paulo: EDART, 1975. p.545,602.

Saiki, R.K., Gelfand, D.A., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.K. & Erlich, H.A., Primer directed enzymatic amplification DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491 (1988).

Sarkar, G., Yoon H.-S., & Sommer, S.S., Screening for mutations by RNA single-strand polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucl. Acid. Research*, **20**, 871-878 (1992).

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. & Howley, P.M., The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 e 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129-1136 (1990).

Serfling U., Ciancio, G., Zhu, W-Z., Leonardi, C. & Penneys, N.S., Human papillomavirus and herpes virus DNA are not detected in benign and malignant prostatic tissue using the polymerase chain reaction. *The J. Urol.*, **148**, 192-194 (1992).

Serth, J., Panitz, F., Paeslack, U., Kuczk, M.A. & Jonas, U., Increased levels of human papillomavirus type 16 DNA in a subset of prostate cancers. *Cancer Res.*, **59**, 823-825 (1999).

Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E., Sandstrom, D.W. & Stonet, E.M., The sensitivity of single-strand conformational polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, **18**, 325-332 (1993).

Shenk, J.L., Fisher, C.J., Chen, S.-Y., Zhou, X.-F., Tillman, K. & Shemshedini, L., p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38742-38479 (2001).

Soulitzis, N., Sourvinos, G., Dokianakis, D.N. & Spandidos, D.A., p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer letters*, **179**, 175-183 (2002).

Southern, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragment separated by eletrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).

Srougi, M. Neoplasias Urogenitais. In: Prado, F.C., Ramos, J. & Valle, J.R. *Atualização terapêutica – Manual prático de diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Artes Médicas Ltda, 1999: 1186-1187.

Srougi, M. & Cury, J. Hiperplasia benigna da próstata. In: Prado, F.C., Ramos, J. & Valle, J.R. *Atualização terapêutica – Manual prático de diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Artes Médicas Ltda, 1999: 1193-1195.

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*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992: 1182-1184.

Strickler, H.D., Burk, R., Shah, K., Viscidi, R., Jackson, A., Pizza, G., Bertoni, F., Schiller, J.T., Manns, A., Metcalf, R., Qu, W. & Goedert, J.J., A multifaceted study of human papillomavirus and prostate carcinoma. *Am. Can. Society*, **82**, 1118-1125 (1998).

Tanagho, E. A. Anatomy of the lower urinary tract. In: Walsh, P. C., Retik, A. B., Stamey, T. A. & Vaughan, E. D. *Campbell's Urology*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992: 54.

Tanagho, E. A. Anatomia do trato genitourinário. In: Tanagho, E. A. & McAninch, J. W. *Smith – Urologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 1994: 7-8.

Tang, Y.W., Procop, G.W. & Persing, D.H. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin. Chem.*, **43**, 2021-2038 (1997).

Taylor, J.A., Hirvonen, A., Watson, M., Pittman, G., Mohler, J.L. & Bell, D.A. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res.*, **56**, 4108-4110 (1996).

Thomas, M., Pim, D. & Banks, L., The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, **18**, 7690-7700 (1999a).

Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L. & Matlaszewski, G., Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1092-1100 (1999b).

Ting, Y. & Manos, M. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Skinsky, J.J. & White, T.J., *PCR protocols: A guide to methods and Applications*. San Diego: Academic Press, Inc, 1990: 356-367.

Tong, D., Kucera, E., Stimpfl, M., Kölbl, H., Leodolter, S. & Zeillinger, R., Detection of p53 polymorphism at codon 72 by PCR and allele-specific oligonucleotide hybridization on microtiter plates. *Clinical Chemistry*, **46**, 124-126 (2000).

Tu, H., Jacobs, S.C., Megner, W.J. & Kyprianou, N., Rare incidence of human papillomavirus types 16 and 18 in primary and metastatic human prostate cancer. *Urol.*, **44**, 726-731 (1994).

Verhaegh, G.W., Bokhoven, A.V., Smit, F., Schaleken, J.A. & Bussemakers, M.J., Isolation and characterization of the promoter of the human of the human prostate cancer-specific DD3 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 37496-37503 (2001).

Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinänen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J & Kallioniemi, O.P., In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat. Genet.*, **9**, 401-406 (1995).

Vogelstein, B. & Kinzler, K.W., p53 function and dysfunction. *Cells*, **70**, 523-526 (1992).

Walsh, P.C., Benign Prostatic Hyperplasia. In: Walsh, P.C., Retik, A.B., Stamey, T.A. & Vaughan, E.D. *Campbell's Urology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 1007-1027.

Walsh, P.C. & Worthington, J.F., eds. *Doenças da próstata – uma guia para os homens e para as mulheres que os amam*. São Paulo: Martins Fontes, 1998: 26-27.

Wang, Y.Z. & Wong, Y.C., Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer: a review. *Urol. Oncol.*, **3**, 41-46 (1997).

Wertz, I.E., Deitch, A.D., Gumerlock, P.H., Gandour-Edwards, R., Chi, S.G. & de Vere White, R.W., Correlation of genetic and immuno-detection of TP53 mutations in malignant and benign prostate tissues. *Hum. Pathol.*, **27**, 573-580 (1996).

Wideroff, L., Schottenfeld, D., Carey, T.E., Beals, T., Fu, G., Sakr, W., Sarkar, F., Schork, A., Grossman, H.B. & Shaw, M.W., Human papillomavirus DNA in malignant and hyperplastic prostate tissue of black and white males. *The Prostate*, **28**, 117-123 (1996).

Zur Hausen, H., Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.*, **49**, 4677-4681 (1989).

Zur Hausen, H., Viruses in human cancers. *Science*, **254**, 1167-1173 (1991).

Zur Hausen, H., Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomaviruses types. *Current Top. Microbiol. and Immunol.*, **186**, 131-145 (1994).

Zur Hausen, H., Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1288**, F55-F78 (1996).

CAPÍTULO 1
ANÁLISE MOLECULAR DO HPV
E DO POLIMORFISMO Arg72Pro DO
GENE TP53 NO CÂNCER DE
PRÓSTATA

INTRODUÇÃO

A próstata pode ser acometida por diferentes patologias, como o câncer de próstata (CaP), a hiperplasia prostática benigna (HPB) bem como as neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIPs).

A alta freqüência dessas patologias, principalmente CaP e HPB, em homens com idade superior a 50 anos, justificam a grande quantidade de pesquisas relacionadas à estas afecções.

No contexto geral, o câncer de próstata ocupa o quinto lugar, com 20.820 casos e o segundo entre as malignidades que acometem os homens (24,94/100.000). Nas regiões do Brasil este tipo de câncer é o segundo mais incidente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, ficando com a primeira posição no Nordeste, a terceira no Sul e a quarta no Norte (Kligerman, 2001).

A etiologia do câncer de próstata ainda é desconhecida, embora vários fatores têm sido sugeridos como possíveis associados a esta malignidade, como dietas ricas em gorduras (Srougi, 1999), o fumo, a exposição à radiação, a obesidade, a altura, o peso ao nascer, a presença HPB, o consumo de álcool, os níveis de atividade física (Stamey & McNeal, 1992), a presença de NIP (Downing *et al.*, 2001), as práticas sexuais, ou mesmo, a presença de agentes infecciosos (Stamey & McNeal, 1992) e de alterações genéticas (Moyret Lalle *et al.*, 1995).

A possibilidade de se encontrar fatores associados a carcinogênese da próstata poderia auxiliar a detecção, o prognóstico, e o tratamento desta doença tão complexa e heterogênea.

Hoje, o papilomavírus humano (HPV) está sendo fortemente correlacionado ao desenvolvimento de tumores humanos, tanto

benignos (verrugas cutâneas e mucosas) quanto malignos (carcinoma cutâneos e anogenitais) (Zur Hausen, 1994).

São conhecidos atualmente 230 tipos de papilomavírus, sendo que mais de 90 infectam os homens (De Villiers, 1996) e aproximadamente, 40, infectam o trato anogenital. Esses vírus são divididos em tipos de alto risco (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, dentre outros) freqüentemente associados aos tumores e os tipos de baixo risco (6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66 e MM8) não associados ao câncer (Gravitt *et al.*, 1998).

Os HPVs são vírus não envelopados e constituídos por fita dupla de DNA circular com tamanho aproximado de 8 Kb. Esses vírus codificam proteínas iniciais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), envolvidas no controle da replicação e transcrição e proteínas tardias (L1 e L2) que compõem o capsídeo viral (Howeley, 1996).

As proteínas E6 e E7, instituídas como oncoproteínas, tem importante papel na carcinogênese cervical por se associarem, respectivamente, às proteínas celulares p53 e Rb (retinoblastoma) (Zur Hausen, 1994).

O surgimento das técnicas de biologia molecular como a hibridação e a PCR, permitiram grandes avanços na associação de infecções pelo HPV com diferentes tipos de tumores.

Desde então, vários autores relatam a presença do HPV em lesões uretrais (McNicol & Dodd, 1991), penianas (Castellsaqué *et al.*, 1997) bem como na urina (Nakazawa *et al.*, 1991), em células espermáticas e líquidos seminais (Lai *et al.*, 1996), dando subsídios à verificação da infecção por estes vírus em tecidos prostáticos.

A identificação de um agente infeccioso associado às patologias da próstata, principalmente ao câncer, poderia ser uma importante descoberta, juntamente com a possibilidade dessa

glândula atuar como reservatório desses agentes, participando, então, da transmissão desses vírus por meio do contato sexual (Strickler *et al.*, 1998) ou mesmo via ejaculação (Serfling *et al.*, 1992).

Estudos prévios relatam taxas de prevalência do DNA do HPV em amostras provenientes da próstata, que variam de 0 a 100% (Strickler *et al.*, 1998; McNicol & Dodd, 1990).

O gene supressor de tumor P53 codifica para uma fosfoproteína (Hainaut *et al.*, 1997) de 393 aminóácidos (Levine, 1997), 53 KDa (Reisman *et al.*, 1988), que atua como fator de transcrição (Koshand, 1993; Levine, 1997; Hainaut *et al.*, 1997) no ciclo celular, regiões conhecidas como *checkpoints* (Paulovich *et al.*, 1997; Meek, 1999), na integridade do DNA e na sobrevivência de células expostas à agentes que danificam o material genético, atuando desta forma, como inibidora da carcinogênese (Hainaut *et al.*, 1997).

Um polimorfismo existente no códon 72 do gene P53 (Thomas *et al.*, 1999) tem sido amplamente correlacionado às neoplasias associadas ou não ao HPV. Storey *et al.* (1998) sugeriram que os indivíduos homozigotos para o alelo arginina são aproximadamente 7 vezes mais suscetíveis à carcinogênese cervical associada ao HPV. Isto se deve à habilidade da oncoproteína E6 dos HPVs de alto risco, 16 e 18, degradarem mais rapidamente a forma homozigota para alelo arginina do gene TP53, permitindo o aumento das taxas de mutação e instabilidade cromossômica.

Esta descoberta possibilitou estudos similares em tumores de bexiga (Soulitzis *et al.*, 2002), esôfago (Kawaguchi *et al.*, 2000), pele (Dokianakis *et al.*, 2000) e vários outros trabalhos com colo de

útero (Szarka *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2000), entretanto estes mostraram dados controversos.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar a prevalência do HPV nos pacientes com câncer de próstata; 2) analisar a frequência do polimorfismo Arg72Pro do gene TP53 para determinar o efeito deste, no desenvolvimento do câncer de próstata; 3) associar o polimorfismo Arg72Pro com a presença do HPV em amostras apresentando câncer de próstata.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes

As amostras dos pacientes utilizadas neste trabalho foram coletas no período de 2000 a 2002, pelos médicos e residentes do serviço de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento (Anexo 1), autorizando o uso das amostras na pesquisa.

Foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular da UFU 36 amostras de tecidos prostáticos de pacientes com idade média de 69 anos. Dessas, 21 apresentaram resultados histopatológicos para adenocarcinoma, 4 para neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de alto grau e 11 para hiperplasia prostática benigna (HPB). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Patologia da UFU.

Estas amostras de tecidos prostáticos foram analisadas para o polimorfismo Arg72Pro do gene P53 e para a presença do HPV. As amostras provenientes de prostatectomia radical (incluindo todos adenocarcinomas, NIP e 2 amostras de HPB) foram agrupadas diferentemente das obtidas por ressecção transuretral (9 HPBs), visto que o papilomavírus coloniza o meato uretral, podendo infectar a parte prostática da uretra.

Para verificar a perda de heterozigosidade (LOH) do gene TP53, analisou-se 26 amostras de sangue periférico desses pacientes (14 CaP, 8 HPB e 4 NIP).

Foram ainda analisadas para este polimorfismo, 30 amostras aleatórias de sangue periférico de homens da população, escolhidas aleatoriamente.

Após os procedimentos cirúrgicos, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular da UFU, onde foram estocados à -80°C para posterior extração do DNA.

Métodos

Extração do DNA

Os DNAs das amostras de tecido e sangue, foram extraídos segundo os protocolos (Anexo 2 e Anexo 3) otimizados no Laboratório de Genética Molecular, UFU. Os cuidados necessários foram tomados para não contaminar as amostras.

Posteriormente, a qualidade do material extraído foi verificada em gel de agarose 0,8%, submetido a 100 volts, por 40 minutos em tampão TBE 0,5X (50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA, pH 8,0), corado com 0,5 mg/ml de brometo de etídio.

Em seguida, o gel foi analisado e fotografado pelo sistema ImageMaster Video Documentation System - VDS (Pharmacia).

Após a extração, os DNAs foram estocados a -20°C para posterior análise.

Amplificação Gênica para o exon 4 do gene P53

Os DNAs extraídos foram amplificados para o exon 4 do gene TP53 para analisar o polimorfismo Arg72Pro.

As condições das reações foram: 1 μl de DNA, 0,2 mM dNTPs (Amersham Pharmacia), 1,0 U Taq DNA polimerase (Phonetría), 1X do tampão da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,1% Triton X-100; 1,5 mM MgCl_2), 5 pmoles dos *primers*, sendo o volume completado para 20 μl com água milli-Q.

O par de *primer* para o exon 4 foi desenhado utilizando o *Software Primer Designer*, versão 2.0 e do *Software Oligo Tech*, versão 1.0, sendo o *sense* (5'-ACCATCTACAGTCCCCCTT-3') e o *anti-sense* (5'-ACCGTGCAAGTCACAGAC-3'). O fragmento esperado após a amplificação é 264 pb.

As reações ocorreram no termociclador (MJ Research – PTC 100) com desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos e 35 ciclos com desnaturação por 30 segundos a 95° C, anelamento a 58° C e extensão a 72° C por 50 segundo. Posteriormente, foram submetidas à extensão final a 72° C por 10 minutos.

Após a reação de amplificação, 10 µl dos produtos foram analisados em gel de agarose 1,5% submetido a 100 volts por 40 minutos em tampão TBE 0,5X (50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA, pH 8,0), corado com 0,5 mg/ml de brometo de etídio.

Posteriormente o gel foi analisado no ImageMaster Video Documentation System - VDS (Pharmacia) para verificação dos fragmentos e registro fotográfico.

Em seguida, os produtos amplificados dos DNAs dos tecidos e dos sangues foram analisados pela técnica de LIS-SSCP.

LIS-SSCP

Foram testadas diferentes condições para otimização dessa técnica, como a concentração (8% a 20%), a temperatura (4° C e 25° C), a voltagem (150 volts e 500 volts) e o tempo (2 h a 24 h) de corrida do gel, tendo estabelecido as condições relacionadas abaixo.

Foram adicionados de 2 a 3 µl dos produtos amplificados em 20 µl de tampão de LIS (10% de sacarose, 0,01% de azul de

bromofenol, e 0,01% de xileno cianol). Estas soluções foram aquecidas a 95° C por 10 minutos, sendo imediatamente colocadas em gelo por mais 10 minutos.

Em seguida 8 µl dos produtos desnaturados foram aplicados em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1 (30%).

A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X (100 mM de Tris, 100 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA, pH 8,0) por 15 horas a 150 volts.

Após a eletroforese o gel foi corado pelo método do nitrato de prata - carbonato de sódio (Anexo 4).

Como os *primers* utilizados não foram específicos para os polimorfismos existentes, uma das bandas que apresentou perfil de homozigidade foi purificada, clonada e encaminhada para o sequenciamento, para confirmar o alelo e permitir a análise da frequência desse polimorfismo nas amostras estudadas.

Purificação e Clonagem

O produto amplificado do homozigoto selecionado foi aplicado em gel de agarose (mesmas condições descritas anteriormente) e recortado para posterior purificação (Anexo 5).

Após a purificação, o fragmento foi clonado, utilizando o *Kit TOPO TA cloning* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante (Anexo 6).

Os plasmídeos provenientes da clonagem foram extraídos (Anexo 7) e encaminhados para realizar o sequenciamento.

Sequenciamento

As amostras foram submetidas ao sequenciamento automático, utilizando o kit ABI PRISM *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. Estas foram carregadas em gel desnaturante de poliacrilamida em um sequenciador automatizado de DNA ABI 377 (Applied Biosystems).

Amplificação Para Detecção do DNA do HPV

Após a verificação da integridade do DNA extraído dos tecidos prostáticos (amplificação do exon 4 do gene TP53), foram realizadas reações com os *primers*, degenerados e modificados, MYM09 e MYM11, para o genoma do HPV. Estes *primers*, desenvolvidos pelo Laboratório Biogenetics Tecnologia Molecular Ltda (Uberlândia-MG), foram baseados nos já existentes MY09/MY11 e GP05+/GP06+, descritos por Manos *et al.*, em 1989 e Jacobs *et al.*, em 1997, respectivamente. As seqüências dos mesmos não serão identificadas, pois estão em processo de patenteamento.

As reações de tipagem e detecção viral (Vieira GS, 2001) com algumas modificações, foram realizadas no Laboratório Biogenetics.

Uma quantidade de 2 μ l do DNA foi utilizada em volume final de 30 μ l de reação. As condições para estas foram: 0,2 mM de dNTPs (Amershan Pharmacia), 1,5 U de taq DNA polimerase (Phoneutria), 1X do tampão da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,1% Triton X-100; 1,5 mM MgCl₂), 2 mM de MgCl₂ (Phoneutria), 30 pmoles do *primer* MYM11 e 20 pmol do MYM09, sendo o volume final completado com água milli-Q.

Para evitar qualquer problema de contaminação, as reações foram preparadas em sala isolada e em seguida encaminhadas a uma outra sala para adicionar o material genético. Estas foram, então, levadas ao termociclador (MJ Research PTC-100) programado para 36 ciclos contendo os passos de desnaturação a 95° C, anelamento a 56° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto. Após os 36 ciclos as reações foram submetidas à extensão final de 5 minutos a 72° C.

Após a realização da reação de detecção foram feitas as reações específicas, por meio da *PCR-nested*, para tipagem do HPV.

PCR-*nested* para Tipagem do HPV

O preparo das reações de tipagem e detecção ocorreu ao mesmo tempo ou em dias diferentes para evitar contaminação, uma vez que a manipulação do material genético aconteceria neste intervalo.

Para cada amostra foram feitos cinco PCR multiplex, contendo no total 32 pares de *primers*, capazes de detectar 32 tipos diferentes de HPV.

As condições das reações foram: 0,2 mM de dNTPs (Amershan Pharmacia), 1x tampão da Taq DNA polimerase (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,1% Triton X-100; 1,5 mM MgCl₂), 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria), 10 pmoles de cada par de *primer* - Gibco (em processo de patenteamento), 1X Tampão *Enhancer* (Invitrogen), 2 µl do produto amplificado da reação de detecção, completando o volume para 30 µl com água milli-Q.

A manipulação do produto amplificado foi feita na sala destinada à *PCR-nested*, ligando-se o fluxo de exaustão e

mantendo-se sempre o cuidado entre a manipulação de uma amostra e outra, para evitar contaminação.

A temperatura de anelamento dos *primers* para o *Multiplex 1* foi 53° C, enquanto que a dos outros *Multiplex* foi 56° C. Os programas consistiram de 36 ciclos com temperatura de desnaturação de 95° C por 30 segundos, temperatura de anelamento dos *primers* indicada anteriormente por 30 segundos e extensão dos *primers* pela enzima Taq DNA polimerase a 72° C por 1 minuto. Após os 36 ciclos, as reações foram submetidas à extensão final a 72° C por 5 minutos.

Em seguida, 15 µl dos produtos amplificados foram analisados, em gel de agarose 1,5% submetido a 120 volts por 1 hora em TBE 0,5X (50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA, pH 8,0), corado com 0,5 mg/ml de brometo de etídio.

Posteriormente o gel foi encaminhado ao ImageMaster Video Documentation System - VDS (Pharmacia) para verificação dos produtos amplificados e registro fotográfico.

Os marcadores de 25 pb ou 50 pb (Gibco) foram utilizados para diferenciar os fragmentos relacionados a cada tipos virais (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Tamanho dos fragmentos esperados (em pares de bases - pb) específicos para 32 tipos de HPV.

MULTIPLEX1		MULTIPLEX2		MULTIPLEX3		MULTIPLEX4		MULTIPLEX5	
TIPO	FRAG (pb)	TIPO	FRAG (pb)	TIPO	FRAG (pb)	TIPO	FRAG (pb)	TIPO	FRAG (pb)
31	317	26	285	MM7	305	33	316	06	303
67	288	62	249	55	279	11	291	66	285
51	231	68	239	43	244	56	270	35	276
58	176	59	219	57	235	39	238	18	237
		34	170	44	206	54	213	70	208
		64	110	30	172	45	193	52	192
						61	175	16	175
						53	127	MM8	83

As amostras que apresentaram fragmentos específicos aos tipos relacionados na tabela acima foram confirmadas por meio de restrição enzimática.

Restrições Enzimáticas

Com intuito de confirmar as seqüências detectadas no gel de agarose pelo tamanho, em pares de bases, foram feitas restrições enzimáticas.

Para um dos fragmentos identificado (*multiplex 4*) foram feitas restrições com duas enzimas Ddel e RsaI (Gibco), que deveriam gerar fragmentos de 196 pb, 42 pb e 133 pb, 105 pb, respectivamente. Já para o outro fragmento detectado (*multiplex 5*) utilizou-se a enzima PstI (Gibco), sendo esperados fragmentos de 96 pb e 79 pb.

As reações para restrição enzimática consistiram de 20 U de enzima, 1X do tampão da mesma, 5 a 7 µl do produto amplificado

(PCR-nested), completando volume final para 10 μ l com água milli-Q. A restrição ocorreu a 37° C por 12 horas no termociclador (Perkin-Elmer).

Posteriormente, 7 μ l do produto da restrição, foram verificados, por eletroforese, em gel 8% não desnaturante de acrilamida-bis 29:1 (30%), que foi submetido a uma corrente de 6 mA por 4 horas.

Para analisar o tamanho esperado dos fragmentos, foram utilizados marcadores de peso molecular de 25 e 50 pb.

Após a eletroforese o gel foi corado com nitrato de prata (Anexo 8).

Análise Estatística

O Teste t , com nível de significância de 5%, foi utilizado para analisar diferenças da prevalência do HPV entre os métodos cirúrgicos utilizados para obtenção dos tecidos prostáticos e entre as amostras benignas e malignas da próstata.

A análise do χ^2 com correção de Yates e intervalo de confiança de 95% foi utilizada para verificar diferenças da frequência do polimorfismo Arg72Pro entre os grupos de indivíduos com HPB e CaP e também entre o CaP e a população.

RESULTADOS

A amplificação do exon 4 foi verificada em todas as amostras estudadas, servindo como controle da qualidade do material utilizado na pesquisa (Figura 1.1a e 1.1b).

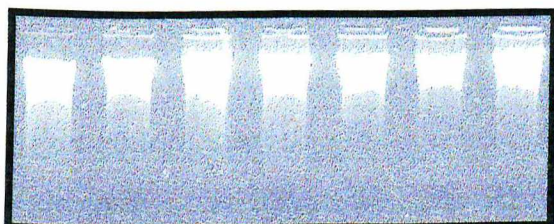


Figura 1.1a. Perfil eletroforético apresentando a qualidade dos DNAs extraídos.

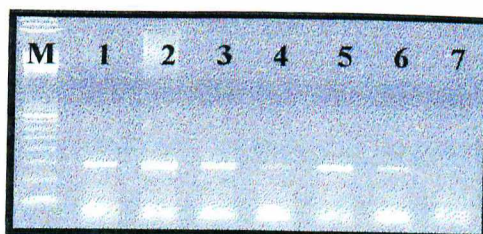


Figura 1.1b. Amplificação do Exon 4 do gene TP53. Colunas 1-6: amplificação exon 4 do gene TP53; M = marcador molecular 100 pb; Coluna 7: controle negativo (sem DNA).

O sequenciamento do homocigoto selecionado pela técnica de LIS-SSCP identificou o alelo arginina (Figura 1.2). Assim, a frequência do polimorfismo do códon 72 foi analisada para os tecidos (HBP, NIP e CaP) e sangue dos pacientes com patologias prostáticas e para a população.

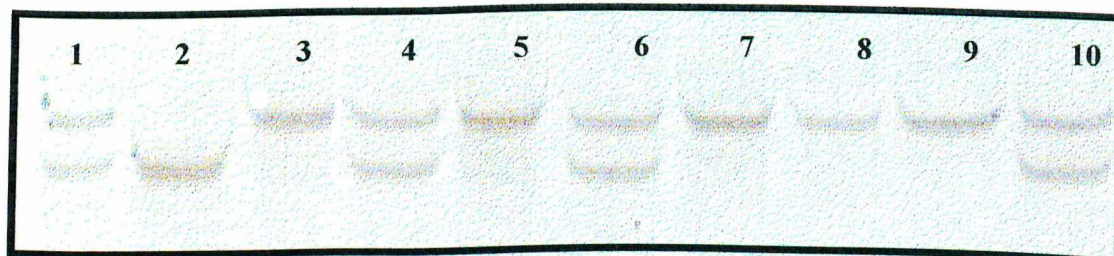


Figura 1.2. Perfil eletroforético do exon 4 por LIS-SSCP em gel 8% de acrilamida-bis (49:1), mostrando o polimorfismo Arg72Pro. Colunas 1, 4, 6 e 10: indivíduos heterocigotos; Coluna 2: indivíduos homocigotos para alelo prolina; e Colunas 3, 5, 7, 8 e 9: indivíduos homocigotos para alelo arginina.

O genótipo Arg/Arg foi encontrado em 18 (50%) dos 36 tecidos apresentando patologias da próstata. Enquanto os genótipos Arg/Pro e Pro/Pro foram observados em 15 (41,66%) e 3 (8,33%) amostras, respectivamente (Tabela 1.2). Não houve diferenças das freqüências do polimorfismo Arg72Pro entre os tecidos com HPB e CaP ($p=0,36$; intervalo de confiança 95%).

As freqüências obtidas nos sangues de alguns dos pacientes com patologias prostáticas também não diferiram significativamente, sendo que o grupo com HPB não diferiu do grupo CaP ($p=0,72$; intervalo de confiança 95%), nem este da freqüência encontrada na população ($p=0,08$; intervalo de confiança 95%) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Freqüência do polimorfismo Arg72Pro nas biópsias e nos sangues dos grupos de pacientes estudados.

Genótipos	Biópsias			População
	HPB	NIP	CaP	
Arg/Arg	63,64% (7)	75% (3)	38,10% (8)	-
Arg/Pro	27,27% (3)	25% (1)	52,38% (11)	-
Pro/Pro	9,09% (1)	0	9,52% (2)	-
Total	100% (11)	100% (4)	100% (21)	-
Genótipos	Sangues			
	Arg/Arg	25% (2)	50% (2)	14,28% (2)
Arg/Pro	62,5% (5)	50% (2)	78,57% (11)	43,33% (13)
Pro/Pro	12,5% (1)	0	7,14% (1)	10% (3)
Total	100% (8)	100% (4)	100% (14)	100% (30)

HPB = hiperplasia prostática benigna; NIP = neoplasia intraepitelial protática; CaP = câncer de próstata.

O grupo NIP não foi considerado nas análises devido ao pequeno número de indivíduos analisados.

A Figura 1.3 mostra a freqüência dos polimorfismos nos sangues dos grupos analisados.

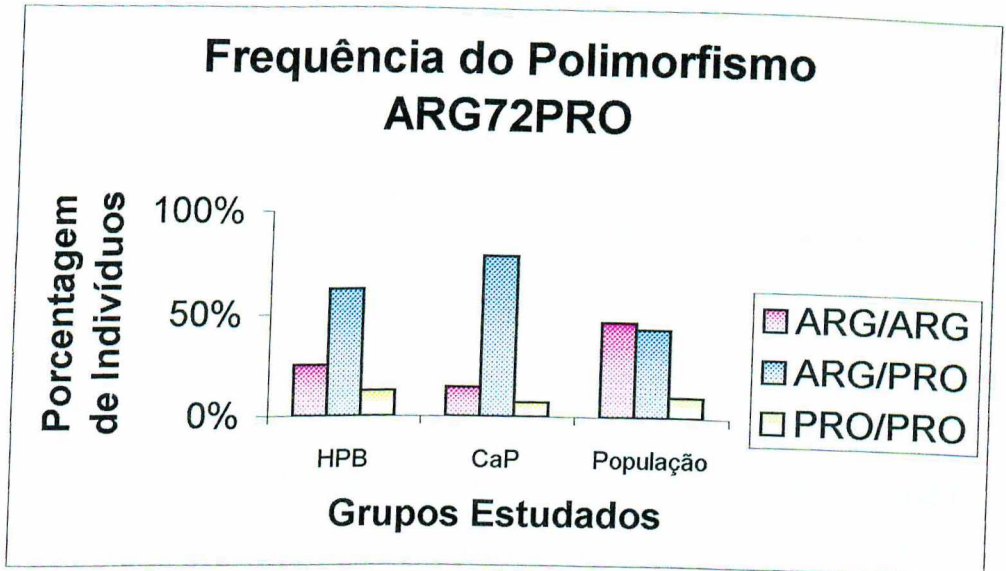


Figura 1.3. Polimorfismo do códon 72 do gene TP53 no sangue periférico, analisado pela técnica de PCR-LIS-SSCP. Em rosa, freqüência do alelo Arg/Arg, em azul; freqüência do alelo Arg/Pro; e em amarelo, freqüência do alelo Pro/Pro. CaP: câncer de próstata; HPB: hiperplasia prostática benigna.

Foram analisadas 26 amostras de sangue periférico de pacientes com patologias prostáticas. Dentre estas, 9 (34,61%) apresentaram perda de heterozigidade, ou seja, perderam o alelo Pro, ficando Arg/Arg. Desses indivíduos 5 pertenciam ao grupo do câncer, 3 ao grupo das HPBs e 1 ao grupo das NIPs.

A LOH nos pacientes com CaP foi relacionada ao estadiamento do tumor (Tabela 1.3). Os resultados encontrados indicam que este evento ocorre inicialmente no câncer de próstata, ou seja, nos estadiamentos de tumores localizados pT1 e pT2 e com invasão local pT3.

Tabela 1.3. Frequência de LOH nos diversos estadiamentos do câncer de próstata.

Número de Pacientes	Estadiamento	LOH (%)
2	pT1*	1 (50%)
3	pT2*	2 (66,66%)
6	pT3*	2 (33%)
1	pT4*	0

* Anexo 9; **2 pacientes não tinham dados do estadiamento do tumor.

Dentre os 36 pacientes analisados para a infecção pelo HPV, por meio da PCR e PCR-*nested*, apenas 2 (5,55%) apresentaram fragmentos compatíveis com os tamanhos esperados (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Prevalência do HPV em Patologias da Próstata.

Pacientes	Patologias Analisadas		
	HPB	NIP	CaP
HPV +	1 (9,09%)	0	1 (4,76%)
HPV -	10 (90,90%)	4 (100%)	20 (95,24%)

Um dos fragmentos identificado, proveniente do grupo de HPB, apresentou 238 pb (*multiplex 4*), sugerindo presença do HPV tipo 39 e o outro, proveniente das amostras de pacientes com câncer, apresentou o fragmento de 175 pb (*multiplex 5*), sugerindo a presença do HPV tipo 16 (Figura 1.4), ambos tipos de alto risco.

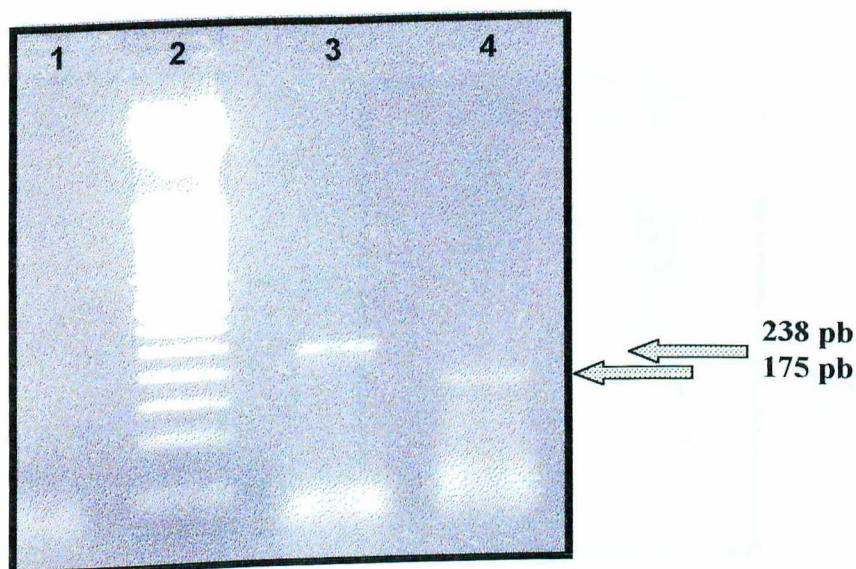


Figura 1.4. Padrão eletroforético, em gel de agarose 1,5%, das amostras positivas para HPV. Coluna 1: controle negativo da reação; coluna 2: marcador molecular de 25 pb, coluna 3: fragmento 238 pb, condizente com HPV tipo 39; coluna 4: fragmento condizente com HPV tipo 16.

Os fragmentos esperados após restrição foram visualizados, confirmando a presença dos HPVs 39 (Figura 1.5) e 16 (Figura 1.6).

Dentre as 27 amostras de pacientes, provenientes de prostatectomia radical, 1 (3,70%) diagnosticada como adenocarcinoma acinar usual, apresentou infecção para o tipo 16 do HPV. Enquanto que dos 9 pacientes obtidos por ressecção transuretral (RTU), 1 (11,11%) apresentou infecção para o HPV tipo 39.

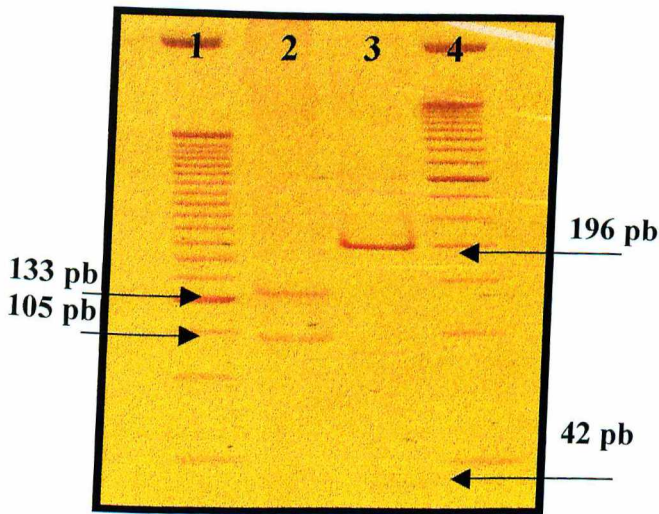


Figura 1.5. Gel 8% não desnaturante de acrilamida-bis 29:1, apresentando as restrições enzimáticas do HPV 39. Coluna 1: marcador molecular 25 pb; Coluna 2: restrição enzimática por RsaI; Coluna 3: restrição enzimática DdeI; Coluna 4: marcador de peso molecular 50 pb.

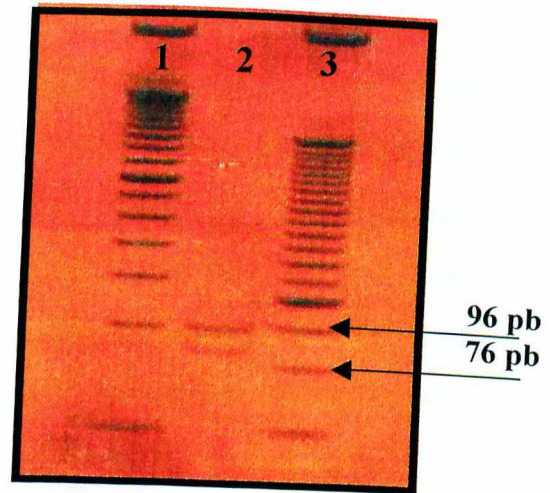


Figura 1.6. Gel 8% não desnaturante de acrilamida-bis 29:1, apresentando a restrição enzimática do HPV 16. Coluna 1: marcador 50 pb; Coluna 2: restrição enzimática por Pst I; Coluna 3: marcador de 25 pb.

O Teste *t*, com nível de significância de 5%, mostrou não haver diferenças significativas para a presença do HPV entre as amostras dos pacientes obtidas por RTU e prostatectomia radical, nem entre os tecidos malignos e benignos analisados.

Os pacientes positivos para a infecção do HPV apresentaram o genótipo homozigoto para arginina, entretanto, a baixa prevalência desta infecção não possibilitou associá-la ao polimorfismo Arg72Pro.

DISCUSSÃO

As associações relacionadas ao gene supressor de tumor P53 parecem ser importantes no desenvolvimento de muitos tumores. Dentro deste contexto o polimorfismo do códon 72 desse gene, balanceado e mantido pela seleção natural (Beckman *et al.*, 1994), tem sido associado ao maior risco de desenvolver doenças malignas associadas (Soulitzis *et al.*, 2002) ou não à infecção pelo HPV (Weston *et al.*, 1992).

Existem na literatura dois trabalhos que tentaram associar o polimorfismo do códon 72 ao risco de desenvolver câncer de próstata (Henner *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1995). Assim, Henner *et al.*, (2001) sugeriu que os indivíduos homozigotos para o alelo prolina, apresentam menores chances de desenvolver o câncer de próstata.

Enquanto Wu *et al.* (1995), não observaram diferenças significativas entre as amostras do CaP e do grupo controle, sendo as freqüências obtidas para o grupo do câncer de 42,9% de Arg/Arg, 50% de Arg/Pro e 7,1% de Pro/Pro.

O resultado do trabalho realizado apresentou freqüência para as amostras de sangue provenientes dos pacientes com adenocarcinoma de 14,28% para alelo Arg/Arg, 78,57% para Arg/Pro e 7,14% para Pro/Pro, não havendo também diferenças entre estas freqüências e a da população analisada ($p=0,08$, intervalo de confiança 95%).

Entretanto, estes resultados não são conclusivos devido à pequena quantidade de amostras analisadas, sendo necessário, portanto, para confirmar estes dados, maior número de análises.

As freqüências de indivíduos homozigotos para o alelo prolina mostram que a presença desse genótipo nos pacientes com câncer,

bem como na população é realmente baixa não sendo, portanto, relacionada ao menor risco de desenvolver câncer de próstata.

Apesar de não ter sido encontrada associação entre os diferentes genótipos e o desenvolvimento do câncer de próstata, alguns autores mostram que os alelos, prolina e arginina, são biológica e bioquimicamente diferentes (Thomas *et al.*, 1999), podendo participar de forma específica no processo de carcinogênese.

A perda de heterozigidade em 9 pacientes que perderam o alelo Pro, ficando Arg/Arg, pode estar favorecendo a progressão da carcinogênese nos indivíduos com câncer e o desenvolvimento desta nos pacientes com HPB e NIP.

Vários trabalhos têm sugerido a LOH como freqüente evento no câncer de próstata (Gao *et al.*, 1997; Macera *et al.*, 1999), sendo um dos múltiplos passos que ocorre anteriormente às mutações (Macera *et al.*, 1999).

Fan *et al.* (1994) analisando 17 indivíduos com câncer de próstata e heterozigotos para o codon 72, encontraram 7 (41,18%) com LOH, enquanto outros autores encontraram 11,11% e 38%, respectivamente (Messenkeil *et al.*, 1994; Brewster *et al.*, 1994). Neste trabalho a freqüência de LOH nos indivíduos apresentando câncer de próstata foi de 35,71%.

Apesar da quantidade de indivíduos analisados em cada estadiamento para LOH poder influenciar a real freqüência desta associação, pode-se perceber que este é um evento inicial no câncer de próstata, ocorrendo em tumores pT1 até pT3, auxiliando o processo de progressão tumoral.

O estudo de Storey *et al.* (1998), permitiu a investigação deste polimorfismo em diversos tumores associados à infecção do HPV,

entretanto, vários trabalhos não encontraram relação entre os indivíduos homozigotos para o alelo arginina e o maior risco de desenvolver a patologia associada (Yamashita *et al.*, 1999; Malcolm *et al.*, 2000; Tenti *et al.*, 2000).

A presença do HPV nos tecidos prostáticos analisados diferiu bastante da encontrada em amostras de esfregaços endocervicais (Zur Hausen, 1994), nas quais o HPV é considerado um forte cofator.

Apesar das amostras positivas para os HPVs 16 e 39 apresentarem o genótipo homozigoto para arginina, não se pode identificar associação entre o genótipo e a infecção por estes vírus no câncer de próstata, devido à baixa prevalência dos mesmos. Isto pode ser indicativo de que estes vírus não têm importante papel no desenvolvimento desta doença, mas podem agir em conjunto com outros carcinógenos, auxiliando o processo de carcinogênese (Soulitzis *et al.*, 2002).

Como o HPV é capaz de infectar o meato uretral, as amostras provenientes de RTU foram analisadas em um grupo separado das obtidas por prostatectomia radical. A presença do HPV 39 em 1 (11,11%) dentre 9 amostras obtidas por RTU, pode ser indicativo de infecção presente na uretra prostática, entretanto, foi encontrada a presença do HPV16 em uma amostra (3,70%) obtida por prostatectomia radical, indicando que estes vírus infectam a próstata.

Além do mais, Ibrahim *et al.*, (1992) relataram que nenhuma das amostras analisadas, que apresentou diagnóstico positivo para HPV, foi obtida pelo método transuretral, indicando que a contaminação via uretra é mínima.

Os resultados desse trabalho juntamente com os encontrados por vários outros autores (McNicol & Dodd, 1990; Effert *et al.*, 1992; Wideroff *et al.*, 1996; Strinckler *et al.*, 1998), mostram a grande discrepância existente em relação à presença do HPV em patologias da próstata (Tabela 1.5).

Acredita-se, que estas diferenças se devam à sensibilidade das metodologias utilizadas bem como à diferença das amostras dos tecidos obtidos para o rastreamento (Strickler *et al.*, 1998).

Alguns autores, utilizando *primers* para região E6 relataram alta prevalência do DNA do HPV em tecidos prostáticos benignos provenientes de RTU (McNicol & Dodd, 1990; McNicol & Dodd, 1991; Rotola *et al.*, 1992).

O uso dos *primers* para a região E6 pode ser justificado pelo processo de integração do vírus no genoma do hospedeiro, nos tecidos neoplásicos. Este processo pode levar a desintegração da região L1, podendo a detecção da mesma ficar prejudicada (Fuskushima, *et al.*, 1990), embora não haja consenso sobre isto.

Como foram analisados 25 tecidos malignos, se a integração tivesse ocorrido com danos na região L1, a não detecção da mesma poderia ocorrer. Entretanto, a detecção do HPV 16 foi possível em uma das amostras com câncer de próstata. Vários trabalhos utilizaram a região L1 e detectaram HPV na próstata (Ibrahim *et al.*, 1992; Tu *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1996).

Tabela 1.5. Pesquisas realizadas para detecção do HPV em amostras prostáticas (Tabela adaptada de Strickler *et al.*, 1998).

ESTUDOS	MÉTODOS DE DETECÇÃO	AMOSTRAS		PORCENTAGEM DE POSITIVOS PARA HPV	TIPOS HPV _s						
		No.	TIPO		6	6/11	16	18	16/18	39	X
McNicol & Dodd, 1990	PCR para E6 dos HPV 16 e 18, confirmação por hibridação	4	CaP	100%			4	3			
		15	HPB	93%			11		3		
		5	Normal	20%			1				
McNicol & Dodd, 1991	PCR para E6 dos HPV 16 e 18, confirmação por hibridação	27	CaP	52% (HPV16), 3,7% (18),			14	1			
		56	HPB	63% (16), 5,35% (18)			34	3			
		5	Normal	20% (16)			1				
Effert <i>et al.</i> , 1992	PCR-D para E6 dos HPV 16 e 18	30	CaP	0%							
Serfling <i>et al.</i> , 1992	Primer consenso para L1 (MY09, MY11)	30	CaP e HPB	0%							
Rotola <i>et al.</i> , 1992	PCR para E6 dos HPV 6/11 e 16	8	CaP	50% (HPV 16), 75% (18)	4	6					
		17	HPB								
Anwar <i>et al.</i> , 1992	PCR para E6 dos HPV 16, 18 e 33	68	CaP	41%			11	17			5
		10	HPB	0%							
		10	Normal	0%							
Ibrahim <i>et al.</i> , 1992	PCR L1 (MY09, MY11)	40	CaP	15%			6				
		12	HPB	0%							
		17	Normal	12%			2				
Sarkar <i>et al.</i> , 1993	PCR para E6/E7 dos HPV 6/11, 16 e 18 e Southern blot	23	CaP e NIP	13%			3				
Dood <i>et al.</i> , 1993	RT-PCR para RNAm de E6/E7 do HPV 16	7	CaP	43%			3				
		10	HPB	50%			5				
Tu <i>et al.</i> , 1994	PCR para L1 (MY09, MY11) e hibridação para HPV 16 e 18	43	CaP	2%			1				
		17	Metástase	6%				1			
		1	Normal	0%							
Moyret-Lalle <i>et al.</i> , 1995	PCR específica para E6 dos HPV 16 e 18	17	CaP	52,9%			9				
		22	HPB	31,8%			7				
Wideroff <i>et al.</i> , 1996	PCR para L1 com primer consenso e para E6 dos HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 45	56	CaP	L1(12,5%), E6(0%)							
		42	HPB	L1 (9,5%), E6(0%)							
Suzuki <i>et al.</i> , 1996	PCR para L1 com primer consenso	51	CaP	16%							
Terris & Peehl, 1997	PCR para L1 com primer consenso (HPV 6, 11, 16, 18 e 33) e para 2 pares de primers para a região E6 do HPV 16	172 tecidos de 41 pacientes	CaP (histologias normais e anormais)	L1 (0%) E6 126-pb(23.3%) E6 99-pb(10%)							

Cont. Tabela 1.5. Pesquisas realizadas para detecção do HPV em amostras prostáticas (Tabela adaptada de Strickler *et al.*, 1998).

ESTUDOS	MÉTODOS DE DETECÇÃO	AMOSTRAS No.	TIPO	PORCENTAGEM DE POSITIVOS PARA HPV	TIPOS DE HPV _s					
					6	6/11	16	18	16/18	39
Noda <i>et al.</i> , 1998	PCR utilizando a região entre LCR e E7 e PCR nested para E6-E7 dos HPV _s 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 e alguns não determinados	38	CaP	0%						
		71	HPB	4,22%			3			
Strickler <i>et al.</i> , 1998	PCR para 3 diferentes pares de primers: MY09/MY11, GP5+/GP6+ para L1 e WS66,67,154/WD72,76 para E6, que foram hibridados com sondas específicas para HPV 11, 16, 18, 51 e 61	63	CaP	MY09/MY11(0%)						
		61	HPB	E6 (0%) - para CaP e HPB						
		27	Microdissecção do tumor	MY09/MY11(0%) GP5+/GP6+0%) para microdissecção						
Serth <i>et al.</i> , 1999	PCR quantitativo competitivo para E6 do HPV 16	47	CaP	21%			10			
		37	HPB	3%			1			
Este trabalho, 2002	PCR <i>primers</i> consenso modificado e PCR <i>nested</i> com primers específicos para 32 tipos de HPV*	21	CaP	4,54%			1			
		4	NIP	0%						
		11	HPB	8,33%					1	

CaP= câncer de próstata; **HPB**= hiperplasia prostática benigna; **NIP**= neoplasia intraepitelial prostática; **HPV**= papilomavírus humano; **PCR**= reação em cadeia da polimerase.

Coincidentemente, Serfling *et al.* (1992) utilizaram como alvo a região L1 do capsídeo viral e não encontraram positividade para HPV e HV (*herpes viruses*), acreditando ser muito improvável a existência única da forma integrada do vírus.

O trabalho desenvolvido por Strickler *et al.* (1998), não encontrou presença do HPV na próstata, mesmo utilizando amostras de RTU e metodologias capazes de amplificar as regiões L1 e E6 do vírus, sendo rara a presença desses vírus e baixa, ou quase inexistente, a contaminação, via uretra, das amostras obtidas por RTU.

Portanto, a escolha do *primer* parece não influenciar a detecção desses agentes infecciosos, embora o uso das duas regiões poderia aumentar a confiabilidade dos trabalhos.

Ibrahim *et al.*, (1992) também utilizaram L1 para detecção do HPV, encontrando 12% de presença desses vírus em amostras parafinadas de tecidos malignos e benignos (HPB e normal). Não foi encontrada diferença na prevalência viral entre os tecidos, sugerindo que não existe forte associação entre o HPV e o desenvolvimento e manutenção do câncer de próstata.

Neste trabalho, também não houve diferenças significativas pelo teste *t* com nível de significância de 5%, entre a infecção pelo HPV e o tipo de tecido analisado, benigno ou maligno, sugerindo que estes vírus não estão apenas associados à lesões malignas, podendo estar presentes em tecidos normais, como ocorre no colo uterino, embora a prevalência viral nestes dois tecidos seja bastante.

O fato desse vírus poder associar-se a tecidos benignos favorece o uso da região L1 pois, geralmente, nestes tecidos estão presentes como epissomos, extra-cromossomais (Rotola *et al.*, 1992).

Noda *et al.* (1998), utilizando uma metodologia sensível, ou seja, uso de PCR para região LCR-E7 e posteriormente PCR *nested* para região compreendida entre E6 e E7 para os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 e alguns não determinados, encontrou 3 (4,20%) amostras positivas para HPV tipo 16 em 71 HPB analisados e nenhuma amostra positiva nas 38 amostras de câncer de próstata avaliadas.

No trabalho realizado, que também utilizou PCR-*nested* para 32 tipos virais, foi encontrada prevalência de 5,55% (2 amostras em

36 analisadas). Os resultados de Noda *et al.*, (1998), juntamente com os desse estudo, mostram que, mesmo utilizando metodologia altamente sensível como a PCR-*nested*, foi encontrada baixa taxa de infecção por HPV, sugerindo que estes vírus não são freqüentes na próstata e que não houve contaminação das amostras analisadas durante a realização da PCR-*nested*.

Não se sabe ao certo qual seria a implicação de se encontrar o DNA do HPV em amostras contendo doenças da próstata. Será que estes vírus estão neste local por acaso, ou o fato de aí se encontrarem sugere alguma implicação no desenvolvimento do câncer de próstata?

A presença do HPV 16 juntamente com o genótipo Arg/Arg em uma das amostras de câncer analisadas pode estar contribuindo como mecanismo de inativação da p53 na célula, permitindo aumento na taxa de proliferação celular, gerando instabilidades genéticas e possibilitando o acúmulo de mutações essenciais ao tumor.

Outra pergunta, muito importante, para compreender melhor o papel desses vírus nos tecidos onde são encontrados é "se estes vírus estão transcrevendo seu material, ou se estão integrados ao genoma do hospedeiro".

Dodd *et al.* (1993), analisaram por RT-PCR os transcritos para E6 e observaram que nem todas as amostras que apresentaram DNA do HPV tiveram seus transcritos detectados, sugerindo que a próstata serviria de reservatório para transmissão sexual destes vírus.

O processo de integração ao genoma pode contribuir, por mecanismos de *knockout* de um gene importante no controle da

proliferação celular, ou mesmo, por ativação de um proto-oncogene, para carcinogênese das células infectadas.

Entretanto, estas são hipóteses, que devem ser testadas para compreendermos melhor a presença do HPV na próstata. Embora tenha sido relatado que a transfecção de um plasmídeo, contendo HPV18, em células epiteliais prostáticas, não leva à conversão maligna, mesmo causando imortalização (Rhim *et al.*, 1994).

O fato é que existe sim, a presença do vírus em amostras prostáticas, justificada pela detecção desses vírus em amostras obtidas por prostatectomia radical, ou mesmo, pelas obtidas por RTU, pois a via de disseminação desses vírus parece ocorrer do sítio mais comum de infecção (genitália externa) para o trato urinário, alcançando a uretra e os rins (Rotola *et al.*, 1992), sendo, portanto, a provável via de disseminação desses vírus para próstata, pois uma vez na uretra prostática, podem infectar também os tecidos prostáticos.

Esse é o primeiro trabalho a utilizar essa metodologia para detecção e tipagem de HPV e a detectar o HPV 39 na próstata, sendo, também, o primeiro a tentar estabelecer associação entre o polimorfismo Arg72Pro do gene TP53 e a presença do HPV no câncer de próstata.

Devido à baixa prevalência desses vírus, fica difícil inferir que a próstata serviria de reservatório para transmissão sexual desses vírus, ou mesmo, como sítio de replicação viral.

Desta forma, a baixa prevalência da infecção pelo HPV bem como a não associação desta com o polimorfismo Arg72Pro sugere que estes não seriam mecanismos essenciais ao desenvolvimento do câncer de próstata. Entretanto, o evento de LOH pode estar

associado à progressão ou desenvolvimento deste tumor, sendo um evento precoce ou intermediário, porém não obrigatório.

Estudos mais detalhados e ampliados devem ser realizados para clarear o papel da infecção viral e do polimorfismo do códon 72 no câncer de próstata, buscando caminhos para compreender melhor os processos fisiológicos, que resultam da associação genótipo – ambiente, nestas afecção.

RESUMO

As patologias da próstata como CaP, HPB e NIP acometem a grande maioria dos homens em todo mundo. Apesar de amplamente distribuídas, a etiologia das mesmas ainda é desconhecida. Vários fatores, como os agentes infecciosos e genéticos, têm sido sugeridos. Dentro deste contexto, a infecção por HPV e o polimorfismo Arg72Pro têm sido implicados no desenvolvimento do câncer de próstata. Este trabalho teve como objetivos avaliar a presença do HPV e do polimorfismo Arg72Pro, bem como associá-los ao câncer de próstata. Foram analisadas 36 amostras de tecido prostático (CaP, NIP e HPB). Dessas, 27 foram obtidas por prostatectomia radical e 9 obtidas por RTU. Para a análise do polimorfismo Arg72Pro utilizou-se 30 amostras de sangue periférico de homens da população, bem como amostras de sangue de alguns dos pacientes com doenças da próstata para excluir perda de heterozigosidade (LOH). Este polimorfismo foi avaliado por meio da técnica de LIS-SSCP enquanto a tipagem do HPV foi realizada por meio da PCR-*nested*, capaz de detectar 32 tipos de vírus. Das 36 amostras avaliadas para presença do HPV, 2 (5,55%) apresentaram os HPVs 16 e 39. Não houve diferenças na prevalência viral entre as amostras malignas e benignas, nem entre os métodos cirúrgicos utilizados, pelo teste *t* com nível de significância de 5%. A associação entre o polimorfismo Arg72Pro e a presença do HPV não foi possível devido à baixa prevalência deste vírus. A análise do polimorfismo Arg72Pro entre as amostras com câncer e a população não mostrou diferenças estatísticas ($p=0,08$; intervalo de confiança 95%). Entretanto, houve LOH em 9 indivíduos favorecendo o alelo Arg, sendo 5 desses pacientes com CaP. Desta forma, a baixa prevalência do HPV bem como a não

associação destes com o polimorfismo Arg72Pro sugere que estes não seriam mecanismos essenciais para desenvolvimento de patologias da próstata. Entretanto, a LOH pode estar contribuindo na progressão da carcinogênese dos indivíduos do câncer e na maior probabilidade de desenvolver tumor, nos indivíduos HPB e NIP.

ABSTRACT

The prostate pathologies like PCa, BPH and PIN assault the great majority of men around the world. Although widely distributed, the etiology of the above is still unknown. A lot of factors, like the infectious and genetic agents, have been suggested. Within this context, the HPV infection and the Arg72Pro polymorphism have been implied on the development of the prostate cancer. This work had as objectives, to evaluate the HPV and the Arg72Pro polymorphism presence, as well as to associate them to the prostate cancer. 36 prostatic tissue samples (PCa, PIN, BPH) were analysed. Among those, 27 were obtained by radical prostatectomy e 9 by TUR. To analyze the Arg72Pro polymorphism, 30 samples of peripheral blood of the population men have been used, as well as blood samples of some of the patients with prostate diseases, to exclude the loss of heterozigosity (LOH). This polymorphism was evaluated by means of the LIS-SSCP technique, while the HPV typing was made by the *nested-PCR*, capable of detecting 32 types of viruses. From the 36 evaluated samples for the HPV presence, 2 (5,55%) presented the HPV 16 and 39. There was no difference for the viral prevalence among the malignant and benignant samples, nor among the utilized surgical methods, for the t test with a 5% significance level. The association between the Arg72Pro polymorphism and the HPV presence was not possible because of the low prevalence of this virus. The Arg72Pro polymorphism analysis among the cancerous samples and the population did not show statistical differences ($p=0,08$, 95% reliance interval). However, there were 9 individuals with LOH, favoring the Arg allele, being 5 of these individuals PCa patients. As so, the HPV low prevalence as well as the non association of these with the

Arg72Pro polymorphism suggests that these would not be the essential mechanisms to the development of prostate pathologies. However, the LOH could be contributing to the carcinogenesis progression of the individuals with cancer and to a higher possibility of a tumor development on the BPH and PIN individuals.

REFERÊNCIAS

- Anwar, K., Nakakuki, K., Shiraishi, T., Naiki, H., Yatani, R. & Inuzuka, M. Presence of ras oncogene mutations and human papillomavirus DNA in human prostate carcinomas. *Cancer Res.*, **52**, 5991-5996 (1992).
- Beckman, G., Birgander, R., Sjölander, A., Saha, N., Holmberg, P.A., Kivelä, A. & Beckman, L., Is p53 polymorphism maintained by natural selection?. *Hum. Hered.*, **44**, 266-270 (1994).
- Castellsagué, X., Ghaffari, A., Daniel, R.W., Bosh, F.X., Muñoz, N. & Shah, K.V., Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J. Inf. Dis.*, **176**, 353-361 (1997).
- De Villiers, E.-M., Papillomavirus detection and HPV typing. *Clin. Dermatol.*, **15**, 199-206 (1997).
- Dodd, J.G., Paraskevas, M. & McNicol, P.J., Detection of human papillomavirus 16 transcription in human prostate tissue. *The J. Urol.*, **149**, 400-402 (1993).
- Dokianakis, D.N., Koumantaki, E., Billiri, K. & Spandidos, D.A., P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in development of HPV-associated non-melanoma skin cancer in immunocompetent hosts. *Int. J. Mol. Medicine*, **5**, 405-409 (2000).
- Downing, S.R., Jackson, P. & Russell, P.J., Mutations within the tumour suppressor gene p53 are not confined to a late event in prostate cancer progression: a review of the evidence. *Urol. Oncol.*, **6**, 103-110 (2001).
- Effert, P.J., Frye, R.A., Neubauer, A., Liu, E.T. & Walther, P.J., Human papillomavirus types 16 and 18 are not involved in human prostate carcinogenesis: analysis of archival human prostate cancer specimens by differential polymerase chain reaction. *The J. Urol.*, **147**, 192-196 (1992).

Fukushima, M., Yamakawa, Y., Shimano, S., Hashimoto, M., Sawada, Y. & Fujinaga, K., The physical state of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*, **66**, 2155 (1990).

Gao, X., Porter, A.T. and Honn, K.V., Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. *Adv Exp Med Biol.*, **407**, 41-53 (1997).

Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Apple, R.J. & Wheeler, C.M., Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J. Clin. Microb.*, **36**, 3020-3027 (1998).

Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Hollstein, M., Greenblatt, M., Hovig, E., Harris, C.C. & Montesano, R., Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucl. Acid. Res.*, **25**, 151-157 (1997).

Henner, W.D., Evans, A.J., Hough, K.M., Harris, E.L., Lowe, B.A. & Beer, T.M., Association of codon 72 polymorphism of p53 with lower prostate cancer risk. *Prostate*, **49**, 263-266 (2001).

Howley, P.M. Papillomavirinae: the viruses & their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. & Howley, P.M., ed., *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1996: 2045-2076.

Ibrahim, G.K., Gravitt, P.E., Dittrich, K.L., Ibrahim, S.N., Melhus, O., Anderson, S.M. & Robertson, C.N., Detection of human papillomavirus in the prostate by polymerase chain reaction & in situ hybridization. *The J. Urol.*, **148**, 1822-1826 (1992).

Jacobs, M.V., Snijders, P.J., Vanden Brule, A.J., Helmerhorst, T.J., Meijer, C.J. & Walboomers, J.M., A general primer GP5+/GP6+ mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in genital scrapings. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 791-795 (1997).

Kawaguchi, H., Ohno, S., Araki, K., Miyazaki, M., Saeki, H., Watanabe, M., Tanaka, S., Sugimachi, K., p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Cancer Res.*, **60**, 2753-2755 (2000).

Kligerman, J., Estimativas sobre a incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2001. *Revista Brasileira de Cancerologia*, **47**, 111-114 (2001).

Koshland, D.E., Molecule of year. *Science*, **262**, 1953 (1993).

Lai, Y.M., Yang, F-P. & Pao, C.C., Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fert. and Ster*, **65**, 1026-1030 (1996).

Levine, A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331 (1997).

Macera, M.J., Godec, C.J., Sharma, N. & Verma, R.S., Loss of heterozygosity of the TP53 tumor suppressor gene and detection of point mutations by the non-isotopic RNase cleavage assay in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet.*, **108**, 42-47 (1999).

Malcolm, E.K., Baber, G.B., James, C.B. & Stoler, M.H., Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical risk. *Mod. Pathol.*, **13**, 373-378 (2000).

Manos, M.M., Ting, Y., Wright, D.K., Lewis, A.J., Broker, T.R. & Wolinsky, S.M., The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, **7**, 209-214 (1989).

Massenkeil, G., Oberhuber, H., Hailemariam, S., Sulser, T., Diener, P.A., Bannwart, F., Schafer, R. & Schwarte-waldhoff, I. P53 mutations and loss of heterozygosity on chromosome 8p, 16p, 17p, and 18q are confined to advanced prostate cancer. *Anticancer Res.*, **14**: 2785-90 (1994).

- McNicol, P.J. & Dodd, J.G., Detection of human papillomavirus DNA in prostate gland tissue by using the polymerase chain reaction amplification assay. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 409-412 (1990).
- McNicol, P.J. & Dodd, J.G., High prevalence of human papillomavirus in prostate tissues. *The J. Urol.*, **145**, 850-853 (1991).
- Meek, D.W., Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?. *Oncogene*, **18**, 7666-7675 (1999).
- Moyret-Lalle, C., Marçais, C., Jacquemier, J., Moles, J-P., Daver, A., Soret, J-Y., Jeanteur, P., Ozturk, M. & Theillet, C., *ras*, p53 and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int. J. Cancer*, **64**, 124-129 (1995).
- Nakazawa, A., Inoue, M., Fujita, M., Tanizawa, O. & Hakura, A., Detection of human papillomavirus type 16 in sexual partners of partners of patients having cervical cancer by polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1187-1190 (1991).
- Noda, T., Sasagawa, T., Dong, Y., Fuse, H., Namiki, M. & Inoue, M., Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method. *Urol. Res.*, **26**, 165-169 (1998).
- Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. & Hartwell, L.H., When checkpoints fail. *Cell*, **88**, 315-321 (1997).
- Reisman, D., Greenberg, M. & Rotter, V., Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5146-5150 (1988).
- Rhim, J.S., Webber, M.M., Bello, D., Lee, J.M., Arnstein, P., Chen, L-S. & Jay, G., Stepwise immortalization and transformation of adult human prostate epithelial cells by a combination of HPV-18 and v-Ki-ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11874-11878 (1994).

- Rotola, A., Monini, P., Di Luca, D., Savioli, A., Simone, R., Secchiero, P., Reggiani, A. & Cassai, E., Presence and physical state of HPV DNA in prostate and urinary-tract tissues. *Int. J. Cancer*, **52**, 359-365 (1992).
- Sarkar, F.H., Sakr, W.A., Li, Y.W., Sreepathi, P. & Crissman, J.D. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in human prostatic tissues by polymerase chain reaction (PCR). *Prostate*, **22**, 171-180 (1993).
- Serfling U., Ciancio, G., Zhu, W-Z., Leonardi, C. & Penneys, N.S., Human papillomavirus and herpes virus DNA are not detected in benign and malignant prostatic tissue using the polymerase chain reaction. *The J. Urol.*, **148**, 192-194 (1992).
- Serth, J., Panitz, F., Paeslack, U., Kuczk, M.A. & Jonas, U., Increased levels of human papillomavirus type 16 DNA in a subset of prostate cancers. *Cancer Res.*, **59**, 823-825 (1999).
- Soulitzis, N., Sourvinos, G., Dokianakis, D.N. & Spandidos, D.A., p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer letters*, **179**, 175-183 (2002).
- Srougi, M., Neoplasias urogenitais. In: Prado, F.C., Ramos, J. & Valle, J.R., Atualização terapêutica –manual prático de diagnóstico e tratamento. 19 ed. Editora Artes Médicas, Sao Paulo p. 1186 (1999)
- 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*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992: 1182-1184.
- Storey, A., Thomas, m., kalita, A., harwood, C., Gardio, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I.M., mathlasewski, G. & Banks, L., Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, **393**, 229-234 (1998).

- Strickler, H.D., Burk, R., Shah, K., Viscidi, R., Jackson, A., Pizza, G., Bertoni, F., Schiller, J.T., Manns, A., Metcalf, R., Qu, W. & Goedert, J.J., A multifaceted study of human papillomavirus and prostate carcinoma. *Am. Can. Society*, **82**, 1118-1125 (1998).
- Suzuki, H., Komiya, A., Aida, S., Ito, H., Yatani, R. & Shimazaki, J. Detection of human papillomavirus DNA and p53 mutations in human prostate cancer. *Prostate*, **28**, 318-324 (1996).
- Szarka, K., Veress, G., Juhász, A., Kónya, J., Sápy, T., Soós, G., Hernádi, Z. & Gergely, L., Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers. *Anticancer Res.*, **20**, 2161-2168 (2000).
- Tenti, P., Vesentini, N., Sapudo, M.R., Zappatore, R., Migliora, P., Carnevali, L. & Ranzani, G.N., p53 codon 72 polymorphism does not affect the risk of cervical cancer in patients from Northern Italy. *Cancer Epidemiol. Biomark. and Prevent.*, **9**, 435-438 (2000).
- Terris, M.K. & Peehl, D.M. Human papillomavirus detection by polymerase chain reaction in benign and malignant prostate tissue is dependent on the primer set utilized. *Urol.*, **50**, 150-156 (1997).
- Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L. & Matlaszewski, G., Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1092-1100 (1999b).
- Tong, D., Kucera, E., Stimpfl, M., Kölbl, H., Leodolter, S. & Zeillinger, R., Detection of p53 polymorphism at codon 72 by PCR and allele-specific oligonucleotide hybridization on microtiter plates. *Clinical Chemistry*, **46**, 124-126 (2000).
- Tu, H., Jacobs, S.C., Mergner, W.J. & Kyprianou, N., Rare incidence of human papillomavirus types 16 and 18 in primary and metastatic human prostate cancer. *Urol.*, **44**, 726-731 (1994).
- Vieira, G.S. Avanços moleculares na detecção e tipagem do HPV. Monografia apresentada para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Uberlândia, MG - junho 2001.

Wetson, A., Perrin, L.S., Forrester, K., Hoover, R.n., Trump, B.F., Harris, C.C. & Caporosone. Allelic frequency of a p53 polymorphism in human lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1, 481-483 (1992).

Wideroff, L., Schottenfeld, D., Carey, T.E., Beals, T., Fu, G., Sakr, W., Sarkar, F., Schork, A., Grossman, H.B. & Shaw, M.W., Human papillomavirus DNA in malignant and hyperplastic prostate tissue of black and white males. *The Prostate*, 28, 117-123 (1996).

Wu, W.J., Kakehi, Y., Habuchi, T., Kinoshita, H., Ogawa, O., Terachi, T., Huang, C.H., Chiang, C.P. & Yoshida, O., Allelic frequency of p53 gene codon 72 polymorphism in urologic cancers. *Jpn. J. Cancer Res.*, 86, 730-736 (1995).

Yamashita, T., Yaginuma, Y., Saitoh, Y., Kawai, K., Kurakane, T., Hayashi, H. & Ishikawa, M., Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis*, 20, 1733-1736 (1999).

Zur Hausen, H., Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 186, 131-156 (1994).

ANEXO 1.1**TERMO DE CONSENTIMENTO**

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

O projeto consiste no estudo da biologia molecular do câncer de próstata.

Para realização dos exames laboratoriais será necessário a coleta de 10 ml de sangue periférico e biópsias de tecidos normais e tumorais da próstata. Cabe ressaltar, que todo material utilizado será estéril e descartável, sendo as biópsias realizadas juntamente com os procedimentos rotineiros do centro cirúrgico do Hospital, 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 1.2

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA (TECIDO)

1. Ressuspender 100 mg de tecido em 800 μ l de Tampão TLN, à temperatura ambiente, macerando a amostra como homogeneizador elétrico;
2. Adicionar 50 μ l de SDS 10% e 20-40 μ l de Proteinase K. Incubar overnight ou, no mínimo, 2 horas à 65°;
3. Adicionar 300 μ l de Tampão saturado de NaCl. Homogeinizar e deixar por 15 minutos no freezer;
4. Centrifugar a 15.000 rpm por 15 minutos à 4°C;
5. Transferir 600 μ l do sobrenadante para um novo tubo;
6. Adicionar 800 μ l de Etanol Absoluto 100%;
7. Precipitar o *pellet* DNA a 15.000 rpm por 15 minutos, a 4°C;
8. Lavar *pellet* com etanol 70% e repetir o passo 4;
9. Retirar todo o Etanol e deixar secar o *pellet* por 1 hora, ressuspendendo-o em 150 μ l à 250 μ l de água milli-Q, sendo este passo dependente do tamanho do *pellet*;
10. Diluir o *pellet* em "banho-maria" a 60°C por 45 minutos.

TAMPÃO DE TLN:

400 mM NaCl
2 mM EDTA pH 8,0
Tris-HCl 10 mM pH 7,5

PROTEINASE K: 10 mg/ml

NaCl: 6 mM

ANEXO 1.3

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA (SANGUE)

1. Centrifugar o sangue total a 5.000 rpm por 40 min. para formar a camada de leucócitos entre o plasma e a parte sólida do sangue;
2. Remover uma alíquota de 500 μ l da camada de leucócitos, colocar em um tubo de 2,0 ml e adicionar 800-900 μ l de Tampão de Lise Celular gelado a cada amostra;
3. Vortexar cuidadosamente por 10 segundos 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 1,0 ml de Tampão de Lise Celular e repetir os passos 3 e 4 até o *pellet* adquirir cor creme;
6. Adicionar 400 μ l de Máster Mix a cada tubo e pipetar "up and down" até o *pellet* se desfazer. Se o *pellet* não desfizer facilmente, vortexar durante 15 segundos e adicionar 20 μ l de Proteinase K;
7. Incubar as amostras a 50° C durante 2 horas ou *overnight*. Vortexar o tubo a cada 30 minutos por 15 segundos para garantir a ressuspensão do *pellet*;
8. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletar alguns debris celulares;
9. Recolher o sobrenadante em tubo limpo e adicionar 200 μ l de cloreto de lítio 7,5 M ou NaCl saturado 7 M a cada uma das amostras. Vortexar por 5 segundos e colocar as amostras em gelo durante 10 min;
10. Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm para precipitar as proteínas e outros contaminantes;
11. Recolher o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 1,0 ml de etanol absoluto, misturar por inversão, até que os flocos de DNA se tornem visíveis;
12. Contrifugar os tubos a 13.000 rpm durante 10 min. para peletar o DNA precipitado. Adicionar 1,0 ml de etanol 70% sem desfazer o *pellet* DNA e centrifugue novamente;
13. Retirar o etanol em uma bomba de vácuo, deixar o *pellet* secar por no mínimo 30 minutos e ressuspender em 20 μ l de água milli-Q para o tubo que não se vê o *pellet* e 30 μ l para o tubo que se vê o *pellet*.

REAGENTES E SOLUÇÕES

TAMPÃO DE LISE CELULAR (Volume final = 400 ml)

Solução de Trabalho	Estoque	Preparo Solução de Trabalho
Sacarose 320 mM	100%	43,81g
Tris-HCl 10 mM pH 7,5	1M	4,0 ml
MgCl ₂ 5mM	1M	2,0 ml
Triton X-100	100%	4,0 ml
Água		Completar até 400ml

MÁSTER MIX* (Volume final = 200 ml)

Solução de Trabalho	Estoque	Preparo da Solução de Trabalho
Tris-HCl 10 mM pH 7,5	1,0 M	2,0 ml
EDTA 10 mM	0,5 M	4,0 ml
NaCl 10 mM	3,0 M	667 µl
SDS 0,5 %	10%	10,0 ml
Proteinase K	10 mg/ml	**
Água		Completar até 200 ml

* Pode ser armazenado à temperatura ambiente

** A proteinase K é adicionada na hora do uso, sendo 20 µl por amostra. Esta uma vez manipulada deve ser recongelada a - 20°C rapidamente.

ANEXO 1.4**COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA**

1. Retirar o gel da placa e coloca-lo em uma vasilha contendo ácido acético 10%;
2. Deixar o gel na solução por no mínimo 30 minutos;
3. Lavar 2 x o gel com água milli-Q por 2 minutos;
4. Retirar toda a água e acrescentar por 20 minutos a solução de nitrato de prata (0,2 mg para cada 100 ml de água e 150 µl de formaldeído);
5. Retirar a solução e lavar o gel 2 x por 30 segundos;
6. Acrescentar a solução carbonato de sódio gelada (3 g de carbonato de sódio, 150 µl de formaldeído e 20 µl de tiosulfato 10% para 100 ml);
7. Esperar até as banda aparecerem e parar a reação com ácido acético 10%;
8. Secar o gel em celofane para posterior análise.

ANEXO 1.5

PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS AMPLIFICADOS DA AGAROSE

1. Recortar do gel de agarose pelo menos 2 ampliações de um fragmento de boa qualidade;
2. Colocar estes fragmentos em microtubos (0,5 ml) furados com agulha na extremidade posterior e preenchidos com lã de vidro 0,5 mm;
3. Adicionar este tubo dentro de um microtubo (1,5 ml) e centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm;
4. Medir o volume do líquido após a centrifugação e acrescentar para cada 8 µl de líquido purificado 2 µl de acetato de sódio 7,5 M, completando o volume com etanol absoluto;
5. Deixar a solução à -20°C *overnight* para precipitar o produto;
6. Centrifugar 13.000 rpm por 15 minutos;
7. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com etanol 70%;
8. Deixar secar por pelo menos 1 hora e diluir o precipitado em 10 µl de água milli-Q.

ANEXO 1.6

CLONAGEM

CLONAGEM GÊNICA EM BACTÉRIA *E. coli* DH5 α – kit TOPO TA CLONING (Invitrogen)

1) Preparo de material para autoclavar

1. Placas de petri;
2. Meio LB sólido para estocar clones em placas de petri na geladeira;
3. Palitos;
4. Tubos de ensaio para crescer cultura de bactérias em meio LB líquido;
5. Meio LB líquido;
6. Glicerol 50X;
7. Microtubos de 1,5 ml novos;
8. Água ultrapura.

2) Preparo de meio

1. Utilizar 30 ml de meio LB (0,3 g de triptona; 0,15 g de extrato de levedura; 0,3 g de NaCl e 0,48 g de bacto-ágar) para cada placa de petri;
2. Após atingir a temperatura morna adicionar 50 μ g/ml de ampicilina ao meio com bacto-ágar e transferir para placa de petri. Após solidificação, as placas devem ser devidamente identificadas e estocadas com o meio para cima, evitando que a água evaporada caia no mesmo;
3. As mesmas condições devem ser utilizadas para meio LB líquido, exceto bacto-ágar.

3) Reação de ligação (kit *Topo TA Clonig* - Invitrogen)

1. 3 μ l do produto de PCR purificado
2. 1 μ l de plasmídeo ("*topo vector*")
3. 1 μ l solução salina
4. 1 μ l de água
5. 20 minutos a 22°C

4) Transformação

1. Acrescentar 2 μl do produto de ligação à 100 μl de bactéria competente (estocada a -80°C /descongelar a temperatura ambiente);
2. Colocar esta solução a 42°C por 30 segundos, e imediatamente transferi-la para gelo por mais 2 minutos;
3. Acrescentar 250 μl de meio LB líquido à bactéria transformada;
4. Incubar esta solução à 37°C por 1 hora, sob agitação de 180 rpm.

5) Plaqueamento

1. Acrescentar ao meio sólido 40 μl de X-gal (40 mg/ml) e 40 μl de IPTG (100 mM);
2. Plaquear 100 μl de bactéria transformada;
3. Vedar as placas com parafilme e estocar a 4°C .

6) Estocagem da bactéria em glicerol

1. Acrescentar 400 μl de 50 X glicerol em 850 μl de bactéria transformada;
2. Vortexizar bem esta solução e estoca-la a -80°C .

ANEXO 1.7**EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS**

1. Utilizar 3 ml de cultura e centrifugar por 1 minuto a 13.000 rpm;
2. Descartar o sobrenadante e adicionar no precipitado 100 µl de solução GET (50mM glicose, 25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0));
3. Ressuspender a solução no vórtex e adicionar 200 µl da solução II (SDS 1%, NaOH 0,2 N) – esta solução deve ser prepara na hora
4. Incubar as amostra em gelo por 20 minutos;
5. Adicionar 150 µl de acetato de potássio 3 M, misturar por inversão e deixar no gelo por 20 minutos;
6. Centrifugar por 15 minutos a 4°C e 13.000 rpm. Manter os tubos no gelo após centrifugação e transferir o sobrenadante para um novo tubo;
7. Adicionar 500 µl de isopropanol, centrifugar nas mesmas condições anteriores;
8. Descartar o sobrenadante e adicionar 600 µl de etanol 75%;
9. Centrifugar novamente e retirar todo o etanol, deixando secar por no mínimo 30 minutos;
10. Ressuspender o precipitado em 20 µl de água milli-Q e 2 µl de Rnase (10 mg/ml), deixando a 37°C por 15 minutos;
11. Aplicar de 2 a 3 µl dessa extração em gel de agarose 0,8%.

ANEXO 1.8

COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA e NaOH

1. Retirar cuidadosamente o gel da placa, colocando-o em um recipiente contendo a solução fixadora, esperar 10 minutos;
2. Colocar posteriormente, sem retirar a solução fixadora, a solução contendo nitrato de prata, deixar por 10 minutos;
3. Em seguida retirar solução da prata e lavar por 2 vezes com água destilada o gel;
4. Retirar toda a água, acrescentando a solução reveladora que deverá ficar em contato com o gel até aparecerem as bandas;
5. Após a revelação, colocar a solução fixadora para parar a reação por pelo menos 2 minutos;
6. Posteriormente, secar o gel em celofane.

Solução Fixadora

- 10% de etanol absoluto
- 0,5% de ácido acético
- H₂O milli-Q q.s.p.

Solução de Prata

- 0,4 g de nitrato de prata em 100 ml de solução fixadora

Solução Reveladora

- 3 g NaOH
- 0,3 ml de formaldeído
- completa para 100 ml com H₂O milli-Q

ANEXO 1.9

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

WHITMORE-JEWETT	TNM
<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>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>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>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>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>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>
D1 Metástases em linfonodos pélvicos	<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</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>

CAPÍTULO 2
MUTAÇÕES NO GENE TP53 SÃO
EVENTOS RAROS NO CÂNCER DE
PRÓSTATA

INTRODUÇÃO

As mutações no gene TP53 têm sido um dos eventos de alteração genética mais comum nos cânceres humanos (Incógnito *et al.*, 2000).

Este gene, supressor de tumor, codifica para uma fosfoproteína (Hainaut *et al.*, 1997) de 393 aminoácidos (Levine, 1997), 53 KDa (Reisman *et al.*, 1988) que atua como fator de transcrição (Koshland, 1993; Levine, 1997; Hainaut *et al.*, 1997), no ciclo celular, regiões conhecidas como *checkpoints* (Paulovich *et al.*, 1997; Meek, 1999), na integridade do mesmo e na sobrevivência de células expostas à agentes que danificam o material genético, atuando desta forma, como inibidora da carcinogênese (Hainaut *et al.*, 1997).

A habilidade da proteína mutante de não transativar genes auxilia a transformação celular (Raycroft *et al.*, 1990). Por isso este gene, “policia molecular” (Lane, 1992), é determinante no balanço final entre crescimento, diferenciação e morte celular indispensáveis ao desenvolvimento normal dos seres vivos (Almog & Rotter, 1997).

As células que apresentam mutações ou inativação da p53, por proteínas virais ou próprias do hospedeiro, são geneticamente mais instáveis, permitindo o acúmulo de mutações e rearranjos cromossômicos que irão aumentar e permitir rápida seleção de clones malignos (Lane, 1992).

Em aproximadamente 50% dos cânceres (Koshland, 1993; Harris, 1993; Almog & Rotter, 1997), ocorre a inativação da função da p53 por meio de vários mecanismos incluindo a deleção e, principalmente, a mutação de ponto (Hainaut *et al.*, 1997) *missense* (troca o sentido do aminoácido), a qual ocorre com frequência

superior a 90% (Harris, 1993; Hernandez-Boussard, *et al.*, 1999), sendo, portanto, o tipo mais freqüente de alteração (Vogelstein & Kinzler, 1992; Almog & Rotter, 1997).

As deleções e inserções são menos freqüentes representando 12,5% do total de mutações (Hernandez-Boussard, *et al.*, 1999). As mutações sem sentido (*nonsense*) geralmente produzem proteínas truncadas e não ocorrem na região de ligação ao DNA (May & May, 1999).

Já foram descritas, até 2002, mais de 16.000 mutações (IARC, 2002), que freqüentemente resultam em proteína mutante superexpressa, quando comparada aos níveis da proteína selvagem. Entretanto, existem mutações que levam tanto à ausência da proteína quanto à não modificação da quantidade da mesma (Borresen, *et al.*, 1991).

A maioria das mutações, que predispõem ao pior prognóstico (Koshland, 1993), acontece na região onde a proteína apresenta sítios de ligação ao DNA. A proliferação das células que possuem a p53 suprimida ou ausente (Hainaut *et al.*, 1997; Pfeifer, 1997) ocorre devido à perda da capacidade dessa proteína de se ligar aos sítios específicos e regular a transcrição de genes importantes ao controle do ciclo celular e da apoptose (Vogelstein & Kinzler, 1992).

Segundo o banco de dados do IARC (International Agency of Research on Cancer), aproximadamente 90% das mutações (Levine, 1997; Hainaut *et al.*, 1997) são encontradas nestas regiões, exons de 5 a 8, que apresentam os códons mais predispostos as mutações, conhecidos como *hotspots* (códons 175, 245, 248, 273 e 282) (Pfeifer, 1997).

Na tentativa de clarear os estudos epidemiológicos do câncer de próstata vários trabalhos têm avaliado o perfil do gene TP53,

buscando associá-lo como possível marcador de detecção, progressão e ou tratamento dessa malignidade.

Entretanto, os dados existentes na literatura são bastante controversos. Segundo Ruijter e colaboradores (1999), a frequência de mutações em câncer de próstata primário varia de 0 a 42%. Porém, vários outros autores acreditam que estas mutações representam um evento tardio na progressão do câncer de próstata, como o câncer metastático ou resistente a andrógeno (Effert *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1995; Roy-Burman *et al.*, 1997).

Existem relatos de mutações neste gene em amostras de próstata normal, com hiperplasia prostática benigna (HBP) e com neoplasia intraepitelial prostática (NIP), sugerindo que estas teriam maiores chances de desenvolver o câncer de próstata (Downing *et al.*, 2001).

A técnica de SSCP (Polimorfismo conformacional de fita simples) permite a detecção de mutações de ponto ou variações nas seqüências nucleotídicas, devido às mudanças conformacionais nas moléculas de DNA de fita simples, ocorrida durante a eletroforese em gel não desnaturante (Pooart *et al.*, 1999).

Esta técnica tem sido amplamente utilizada na detecção de mutações no gene TP53 (Heidenberg *et al.*, 1995; Mottaz *et al.*, 1997; Incógnito *et al.*, 2000). Entretanto, a instabilidade conformacional das fitas simples do DNA causam problemas na conformação da molécula, por isso Maruya *et al.* (1996), substituíram a solução de formamida por uma solução de baixa força iônica (LIS) capaz de garantir maior estabilidade às fitas simples, criando a técnica de LIS-SSCP.

Este trabalho teve como objetivo rastrear mutações no gene TP53, exons de 5 a 8, por meio da técnica de LIS-SSCP, no câncer de próstata.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes

As amostras dos pacientes utilizadas, neste trabalho, foram coletas no período de 2000 a 2002, pelos médicos e residentes do serviço de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento (Anexo 1), autorizando o uso das amostras na pesquisa.

Foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular da UFU 36 amostras de tecidos prostáticos de pacientes, com idade média de 69 anos. Dessas, 21 apresentaram resultados histopatológicos para adenocarcinoma, 11 para hiperplasia prostática benigna (HPB) e 4 para neoplasia intraepitelial prostática (NIP) de alto grau. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Patologia da UFU.

Para 17 amostras de adenocarcinoma e 4 de NIP, foram selecionadas, macroscopicamente, 2 regiões da glândula, denominadas A1 e A2. Entretanto, para as outras amostras (11 HPBs e 4 adenocarcinomas) apenas um região do tecido, B1, foi selecionada.

Após os procedimentos cirúrgicos, o material foi estocado à -80°C para posterior extração do DNA.

Utilizou-se 30 amostras de sangue periférico da população masculina para avaliar como a freqüência de possíveis mutações estariam distribuídas na população.

Métodos

Extração do DNA

Os DNAs das amostras dos tecidos e dos sangues, foram extraídos segundo os protocolos (Anexo 2 e Anexo 3) otimizados no Laboratório de Genética Molecular, UFU. Os cuidados necessários foram tomados para não contaminar as amostras.

Posteriormente, a qualidade do material extraído foi verificada em gel de agarose 0,8%, submetido a 100 volts, por 40 minutos em tampão TBE 0,5X (50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA, pH 8,0) e corado com 0,5 mg/ml de brometo de etídio. Em seguida, o gel foi analisado e fotografado pelo ImageMaster Video Documentation System - VDS (Pharmacia).

Após a extração os DNAs foram estocados a -20° C para posterior análise.

Amplificação dos exons do gene P53

Os DNAs extraídos das regiões A1 e A2 bem como os da região B1 e das amostras de sangue da população, foram amplificados para os exons de 5 a 8 do gene TP53.

As condições das reações foram: 1 μ l de DNA, 0,2 mM dNTPs (Amersham Pharmacia), 1,0 U Taq DNA polimerase (Phonectria), 5 pmoles de cada *primer* descrito por Tsuda & Hirohashi (1992), 1X do tampão da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,1% Triton X-100; 1,5 mM $MgCl_2$), sendo o volume completado para 20 μ l com água milli-Q.

As reações ocorreram no termociclador (MJ Research – PTC 100) por 35 ciclos com desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos e extensão final a 72° C por 10 minutos.

As condições dos programas para amplificar os exons do gene TP53 estão apresentadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Programas da PCR para os exons de 5 a 8 do gene TP53

EXONS	DESNATURAÇÃO	ANELAMENTO DOS <i>PRIMERS</i>	EXTENSÃO
7 e 8	95° C – 30"	58° C – 50"	72° C – 50"
5	95° C – 30"	60° C – 50"	72° C – 50"
6	95° C – 30"	62° C – 50"	72° C – 50"

Após as amplificações, 10 µl dos produtos foram analisados em gel de agarose 1,5% submetido a 100 volts por 40 minutos em tampão TBE 0,5X (50 mM de Tris, 50 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA, pH 8,0), corado com 0,5 mg/ml de brometo de etídio.

Posteriormente, o gel foi analisado ao ImageMaster Video Documentation System - VDS (Pharmacia) para analisar o resultado das amplificações e registro fotográfico.

Os fragmentos esperados para os exons 5, 6, 7 e 8 foram, respectivamente, 213 pb, 217 pb, 130 pb e 163 pb.

Em seguida, estes produtos amplificados foram submetidos à técnica de LIS-SSCP.

LIS-SSCP

Foram testadas diferentes condições para otimização dessa técnica, como a concentração (8% a 20%), a temperatura (4° C e 25° C), a voltagem (150 volts e 500 volts) e o tempo (2 h a 24 h) de corrida do gel, tendo estabelecido as condições relacionadas na Tabela 2.2.

Foram adicionados de 2 a 3 μ l dos produtos amplificados em 20 μ l de tampão de LIS (10% de sacarose, 0,01% de azul de bromofenol, e 0,01% de xileno cianol). Estas soluções foram aquecidas a 95° C por 10 minutos, sendo imediatamente colocadas em gelo pelos os mesmos 10 minutos.

Em seguida 8 μ l dos produtos desnaturados foram aplicados em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1 (30%).

Tabela 2.2. Condição da Eletroforese para os exons de 5 a 8 do gene TP53

EXON	VOLTAGEM	TEMPO	TEMPERATURA
5	150 volts	15 horas	25° C
6	500 volts	6 horas	4° C
7	150 volts	17 horas	25° C
8	150 volts	19 horas	25° C

A eletroforese ocorreu em tampão TBE 1X (100 mM de Tris, 100 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA, pH 8,0), sendo que os géis foram submetidos, após a aplicação das amostras, a uma pré-corrida de 500 volts por 10 minutos.

Após a eletroforese o gel foi corado pelo método do nitrato de prata - carbonato de sódio (Anexo 4).

A banda que apresentou migração diferencial foi purificada e clonada para realizar o sequenciamento.

Purificação e Clonagem

O produto amplificado que apresentou migração diferencial no LIS-SSCP foi aplicado em gel de agarose (mesmas condições descritas anteriormente) e recortado para posterior purificação (Anexo 5).

Após a purificação, o fragmento foi clonado com o *Kit TOPO TA cloning*, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen - Anexo 6).

Os plasmídeos provenientes da clonagem foram extraídos (Anexo 7) e encaminhados para realizar o sequenciamento.

RESULTADOS

A extração do DNA (Figura 2.1) e as amplificações para os exons de 5 a 8 (Figura 2.2) mostraram-se em ótimas condições, excluindo qualquer atribuição de resultados falso-positivos à qualidade do material utilizado na pesquisa.

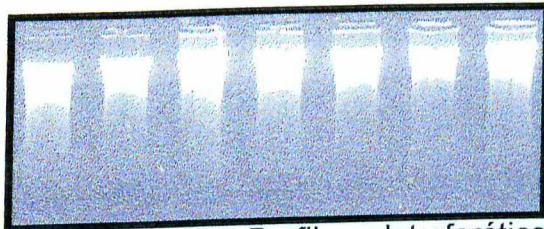


Figura 2.1. Perfil eletroforético apresentando a qualidade dos DNAs extraídos.

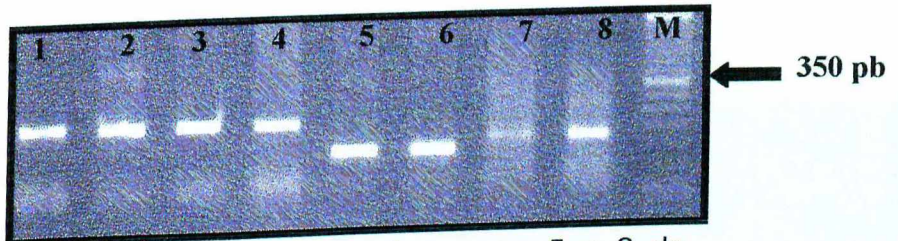


Figura 2.2. Amplificação dos exons 5 a 8 do gene TP53. M = marcador molecular 50 pb; Coluna 1 e 2: exon 5 (217 pb); Coluna 3 e 4: exon 6 (213 pb); Coluna 5 e 6: exon 7 (130 pb); e Coluna 7 e 8: exon 8 (160 pb).

Não foram detectadas, por meio da técnica de LIS-SSCP, mutações nos exons 7 e 8 (Figura 2.3 e 2.4) nas amostras apresentando câncer de próstata. As amostras da população juntamente com as provenientes dos HPBs e NIPs, também não demonstraram a presença de bandas diferenciais nestes exons.

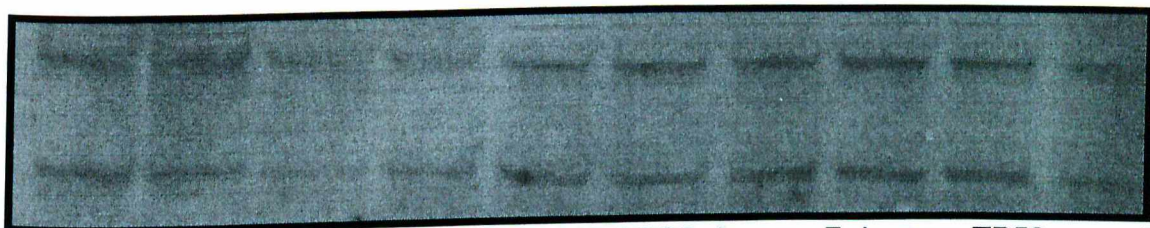


Figura 2.3. Perfil eletroforético da PCR-LIS-SSCP do exon 7 do gene TP53 em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1.

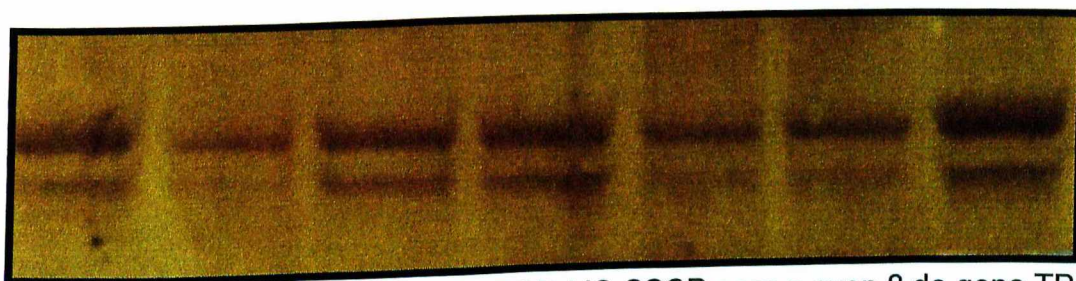


Figura 2.4. Perfil eletroforético da PCR-LIS-SSCP para o exon 8 do gene TP53 em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1.

O perfil eletroforético para exon 5 também não apresentou padrão diferencial nos grupos analisados (Figura 2.5).

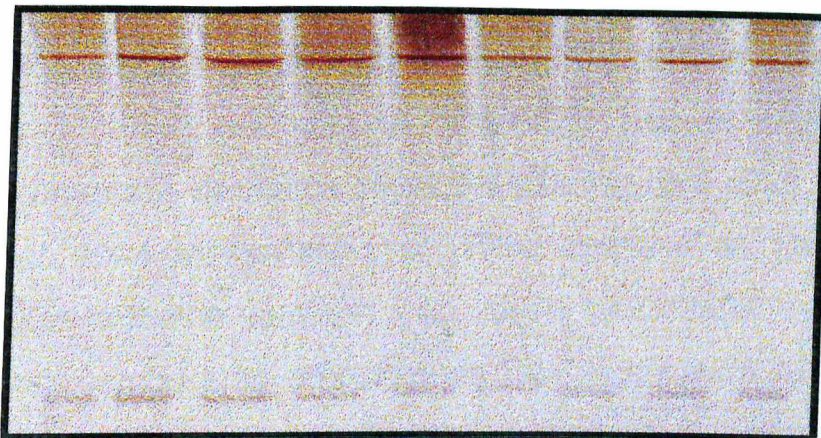


Figura 2.5. Perfil eletroforético do exon 5 do gene TP53 em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1.

Foi detectado um perfil eletroforético diferencial no exon 6 do gene p53 para uma das amostras de adenocarcinoma (Figura 2.6), entretanto o sequenciamento está em andamento.

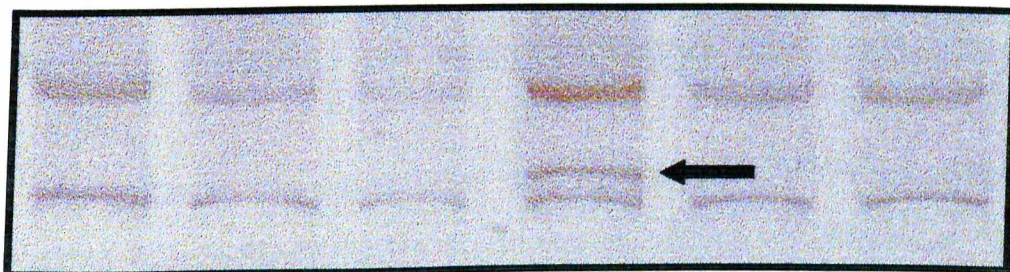


Figura 2.6. Perfil eletroforético do exon 6 do gene TP53 em gel 15% não desnaturante de acrilamida-bis 49:1. O polimorfismo encontrado está indicado pela seta.

DISCUSSÃO

A frequência de mutações em cânceres de próstata primários varia de 0-42% (Castagnaro *et al.*, 1993; Moyret Lalle *et al.*, 1995; Wertz *et al.*, 1996)

Vários autores analisando amostras de câncer de próstata localizados (T1 e T2), por meio da PCR-SSCP para os exons de 5-8, não encontraram nenhuma mutação (Castagnaro *et al.*, 1993 ; Ittmann *et al.*, 1994; Massenkeil *et al.*, 1994; Mottaz *et al.*, 1997).

Nesse trabalho também não foram detectadas mutações nesses exons, embora as amostras de CaP analisadas não terem sido apenas de tumores localizados e apenas 1 amostra com câncer metastático ter sido analisada. Entretanto, houve um perfil eletroforético diferencial para o exon 6 em um paciente com câncer de próstata, que está em processo de sequenciamento.

Alguns autores acreditam que a maioria das mutações do gene TP53 no CaP não se encontra nos exons de 5 a 8 (Downing *et al.*, 2001), entretanto, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer – IARC (IARC, 2002) mostra claramente que a maior frequência de mutações em adenocarcinomas prostáticos ocorre nesta região.

Acredita-se que os estudos de mutações do TP53 no câncer de próstata apresentem dados controversos devido à diferença nas amostras e técnicas utilizadas (Roy-Burman *et al.*, 1997; Downing *et al.*, 2001).

Alguns autores sugerem que a técnica de SSCP apresenta desvantagens como a possibilidade de não diferenciar a substituição de nucleotídeos em uma mesma posição, ou mesmo, a não detecção do alelo mutado, devido à diluição do mesmo pela

grande quantidade de alelos normais, provenientes de células do estroma e epiteliais da próstata (Gumerlock *et al.*, 1997).

Entretanto, vários são os trabalhos que detectaram mutações neste gene utilizando esta técnica (Wertz *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 1997).

Como neste trabalho foram utilizados fragmentos selecionados macroscopicamente, acredita-se que a diluição do possível alelo mutado possa ter ocorrido, entretanto, fica a dúvida e a necessidade de trabalhar com regiões específicas do tumor e não com uma região do mesmo, que pode não apresentar alterações, ou mesmo, apresentá-las em quantidades insuficientes à detecção.

Roy-Burman *et al.* (1997) apresentam dados interessantes a respeito da origem multifocal do câncer de próstata. Estes autores comprovam que diferentes regiões de um mesmo tumor apresentam variações no perfil de mutações relacionadas ao gene TP53, sugerindo que as amostras tumorais selecionadas para análise devem ser direcionadas, sendo sempre necessário análise de mais do que uma região.

Apesar de neste trabalho ter sido analisadas 2 regiões de quase todos os pacientes que apresentaram CaP, não foi possível a detecção de mutações.

Sabe-se que alguns tumores inativam p53 via amplificação do gene MDM2 ou translocação via mdm2 da p53 para o citoplasma, tornando-a inativa (Vogelstein & Kinzler, 1992; Levine, 1997; Lakin & Jackson, 1999). Portanto, nesses tumores, o TP53 não está mutado (Lane, 1992), uma vez que já se encontra inativado. Alguns autores encontraram 32,5% dos tumores analisados com superexpressão da mdm-2 (Osman *et al.*, 1999).

Outro mecanismo que poderia inativar p53 seria a interação desse gene com proteínas virais (Vogelstein & Kinzler, 1992), como a oncoproteína viral E6 do Papilomavírus Humano (HPV) tipos 16 e 18, que via proteína ligase E6-AP (Hengstermann *et al.*, 2001) leva à degradação da p53 no proteassomo dependente de ubiquitina (Thomas *et al.*, 1996; Scheffner *et al.*, 1990). Este mecanismo bloqueia o controle via p53 do ciclo celular e da apoptose, favorecendo a replicação viral (Lane, 1992; Tong *et al.*, 2000).

Assim, seria interessante avaliar se estes mecanismos poderiam estar inativando a atividade do gene TP53 nas amostras analisadas.

Os resultados obtidos mostram que as mutações no gene TP53 no câncer de próstata bem como nas NIPs e HPBs são raras e não podem ser associadas ao desenvolvimento das mesmas.

Este trabalho sugere que estudos mais detalhados, com relação às amostras a serem utilizadas na pesquisa, devem ser realizados, com intuito de clarear a relação das mutações do gene TP53 com as patologias da próstata e minimizar erros a respeito da diluição do alelo mutado.

RESUMO

As alterações no gene supressor de tumor P53 têm sido amplamente estudadas em diversos tipos de tumores humanos, visto que este gene desempenha papel importante no controle do ciclo celular e na apoptose. A mutação *missense* é considerada o evento mais freqüente representando 90% das alterações. Dados controversos existem entre essas alterações e o câncer de próstata. Este trabalho teve por objetivo rastrear mutações nos exons de 5 a 8 do gene TP53, por meio da PCR-LIS-SSCP, em amostras com patologias da próstata para tentar clarear a relação das alterações neste gene e o CaP. Foram analisados 36 tecidos, sendo 21 CaPs, 11 HPBs e 4 NIPs, além de uma população masculina constituída por 30 amostra de DNA de sangue periférico. Por meio da técnica de LIS-SSCP, otimizada especificamente para cada exon, não foram encontradas mutações nos exons 5, 7 e 8 analisados tanto para o grupo dos tecidos quanto para a população, entretanto foi identificado uma possível mutação no exon 6 em dos pacientes com câncer de próstata. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as mutações no gene TP53 são raras em patologias prostáticas, incluindo o câncer de próstata.

ABSTRACT

The alterations on the tumor suppressor gene P53 have been widely studied in various kinds of human tumors, for this gene performs an important role on the cell cycle control and apoptosis. The missense mutation is considered the most frequent event representing 90% of the alterations. Controversial data exist among these alterations and the prostate cancer. This work had as an objective to track for mutations on the exons 5 to 8 of the TP53 gene, by means of the PCR-LIS-SSCP, in prostate pathologies samples, to try to clear the relationship of the alterations on this gene and the PCa. 36 tissues were analyzed, seeing that 21 were PCas, 11 BPHs and 4 PINs, besides a male population of 30 DNA peripheral blood samples. By means of the LIS-SSCP technique, specifically optimized for each exon, there were not found mutations in the 5, 7 and 8 exons for the tissue group as well as for the population, however a possible mutation on the exon 6 in one patient having prostate cancer was identified. The obtained results on this work suggest that the TP53 gene mutations are rare on prostatic pathologies, including the prostate cancer.

REFERÊNCIAS

- Almog, N. & Rotter, V., Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1333**, F1-F27 (1997).
- Borresen, A-L., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Malkin, D. Lystad, S., Andersen, T.I., Nesland, J.M., Isselbacher, K.J. & Friend, S.H., Constant denaturant gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8405-8409 (1991).
- Byrne, R.L., Horne, C.H.W., Berger, D., Chang, H., Kleinszanto, A.J., Goodraw, T., Wood, M., Obara, T., Health, C.W. & Lynch, H. The expression of waf-1, p53 and bcl-2 in prostatic adenocarcinoma. *Br. J. Urol.*, **79**, 190-195 (1997).
- Castagnaro, M., Yandell, D.W., Dockhorn Doworniczak, B., Wolfe, H.J. & Poremba, C., Androgen receptor gene mutations and p53 gene analysis in advanced prostate cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol*, **77**, 119-123 (1993).
- Downing, S.R., Jackson, P. & Russell, P.J., Mutations within the tumour suppressor gene p53 are not confined to a late event in prostate cancer progression: a review of the evidence. *Urol. Oncol.*, **6**, 103-110 (2001).
- Effert, P.J., McCoy, R.H., Walther, P.J. & Liu, E.T., p53 gene alterations in human prostate carcinoma. *J. Urol.*, **150**, 257-261 (1993).
- Gumerlock, P.H., Chi, S.G., Shi, X.B., Voeller, H.J., Jacobson, J.W., Gelman, E.P. & deVere White, R.W., p53 abnormalities in primary prostate cancer: single-strand conformation polymorphism analysis of complementary DNA in comparison with genomic DNA. The cooperative prostate network. *J. Natl. Cancer Inst.*, **89**, 66-71 (1997).
- Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Hollstein, M., Greenblatt, M., Hovig, E., Harris, C.C. & Montesano, R., Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucl. Acid. Res.*, **25**, 151-157 (1997).

Hall, M.C., Navone, N.M., Troncoso, P., Pollack, A., Zagars, G.K., Von Eschenbach, A.C., Conti, C.J. & Chung, L.W., Frequency and characterization of p53 mutations in clinically localized prostate cancer. *Urol.*, **45**, 470-475 (1995).

Harris, C.C., p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science*, **262**, 1980-1981 (1993).

Heidenberg, H.R., Sesterhenn, I.A., Gaddipati, J.P., Weghorst, C.M., Ruzard, G.S., Moul, J.W. & Srivastava, S., Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer. *J. Urol.*, **154**, 414-421 (1995).

Hengstermann, A., Linares, L.K., Ciechanover, A., Whitaker, N.J. & Scheffner, M., Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *PNAS*, **98**, 1218-1223 (2001).

Hernandez-Boussard, T., Montesano, R. & Hainaut, P., Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database. *Genet. Analysis: Biomol. Engineering*, **14**, 229-233 (1999).

Incógnito, L.S., Cazares, L.H., Schellhammer, P.F., Kuban, D.A., Van Dyk, E.O., Moriarty, R.P., Wright, G.L. & Somers, K.D., Overexpression of p53 in prostate carcinoma is associated with improved overall survival but not predictive of response to radiotherapy. *Int. J. Oncol.*, **17**, 761-769 (2000).

International Agency of Research on Cancer. **IARC TP53 mutation database**. Disponível em: <<http://www.p53.fr>>. Acessado em: 20 jan. 2002.

Ittmann, M., Wiczorek, R., Heller, P., Dave, A., Provet, J. & Kralowski, J. Alterations in the p53 and MDM-2 genes are infrequent in clinically localized, stage B prostate adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.*, **145**, 287-293 (1994).

Koshland, D.E., Molecule of year. *Science*, **262**, 1953 (1993).

- Lakin, N. & Jackson, S., Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, **18**, 7644-7655 (1999).
- Lane, D.P., p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16 (1992).
- Levine, A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331 (1997).
- Maruya, E., Saji, H. & Yokoyama, S., PCR-LIS-SSCP (Low Ionic strength Single-stranded conformation polymorphism) – A simple method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1, -DQB1, and – DPB1. *Genome Methods*, **6**, 51-57 (1996).
- Massenkeil, G., Oberhuber, H., Hailemariam, S., Sulser, T., Diener, P.A., Bannwart, F., Schafer, R. & Schwarte-Waldhoff, I. p53 mutations and loss of heterozygosity on chromosomes 8p, 16q, 17p, and 18q are confined to advanced prostate cancer. *Anticancer Res.*, **14**, 2789-2794 (1994).
- May, P. & May, E., Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, **18**, 7621-7636 (1999).
- Meek, D.W., Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?. *Oncogene*, **18**, 7666-7675 (1999).
- Mottaz, A.E., Markwalder, R., Fey, M.F., Klima, I., Merz, V.W., Thalmann, G.N., Ball, R.K. & Studer, U.E., Abnormal p53 expression is rare in clinically localized human prostate cancer: comparison between immunohistochemical and molecular detection of p53 mutations. *Prostate*, **31**, 209-215 (1997).
- Moyret Lalle, C., Marcais, C., Jacquemier, J., Moles, J.P., Daver, A., Soret, J.Y., Jeanteur, P., Ozturk, M. & Theillet, C., Ras, p53 and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int. J. Cancer*, **64**, 124-129 (1995).
- Osman, I., Dobnjak, M., Fazzari, M., Ferrara, J., Scher, H.I. & Condorn-Cardo, C., Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact on tumor progression. *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2082-2088 (1999).

Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. & Hartwell, L.H., When checkpoints fail. *Cell*, **88**, 315-321 (1997).

Pfeifer, G.P. & Holmquist, G.P., Mutagenesis in the P53 gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1333**, M1-M8 (1997).

Pooart, J., Limpaboon, T. & Lulitanond, V., Improved nonisotopic PCR-SSCP for screening of p53 mutations. *Clin. Biochem.*, **32**, 233-235 (1999).

Raycroft, L., Wu, H. & Lozano, G., Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of p53 anti-oncogene. *Science*, **249**, 1049-1051 (1990).

Reisman, D., Greenberg, M. & Rotter, V., Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5146-5150 (1988).

Roy-Burman, P., Zheng, J. & Miller, G.J., Molecular heterogeneity in prostate cancer can mutation unravel tumorigenesis?. *Mol. Med. Today*, 476-482 (1997).

Ruijter, E., Van de kaa, C., Miller, G., Ruiter, D., Debruyne, F. & Schalken, J., Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocrine Review*, **20**, 22-45 (1999).

Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. & Howley, P.M., The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 e 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129-1136 (1990).

Thomas, M., Matlasshewski, G., Pim, D. & Lawrence, B., Induction of apoptosis by p53 is independent of its oligomeric state and can be abolished by HPV-18 E6 through ubiquitin mediated degradation. *Oncogene*, **13**, 265-273 (1996)

Tong, D., Kucera, E., Stimpfl, M., Kölbl, H., Leodolter, S. & Zeillinger, R., Detection of p53 polymorphism at codon 72 by PCR and allele-specific oligonucleotide hybridization on microtiter plates. *Clinical Chemistry*, **46**, 124-126 (2000).

Tsuda, H. & Hirohashi, S. Frequent occurrence of p53 gene mutations in uterine cancers at advanced clinical stage and with aggressive histological phenotypes. *Jpn J Cancer Res.*, **83**, 1184-1191 (1992).

Vogelstein, B. & Kinzler, K.W., p53 function and dysfunction. *Cells*, **70**, 523-526 (1992).

Wertz, I.E., Deitch, A.D., Gumerlock, P.H., Gandour-Edwards, R., Chi, S.G. & de Vere White, R.W., Correlation of genetic and immuno-detection of TP53 mutations in malignant and benign prostate tissues. *Hum. Pathol.*, **27**, 573-580 (1996).

ANEXO 2.1**TERMO DE CONSENTIMENTO**

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

O projeto consiste no estudo da biologia molecular do câncer de próstata.

Para realização dos exames laboratoriais será necessário a coleta de 10 ml de sangue periférico, e biópsias de tecidos normais e tumorais da próstata. Cabe ressaltar, que todo material utilizado será estéril e descartável, sendo as biópsias realizadas juntamente com os procedimentos rotineiros do centro cirúrgico do Hospital, 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 2.2

PROTÓCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA (TECIDO)

1. Ressuspender 100 mg de tecido em 800 μ l de Tampão TLN, à temperatura ambiente, macerando a amostra como homogeneizador elétrico;
2. Adicionar 50 μ l de SDS 10% e 20-40 μ l de Proteinase K. Incubar overnight ou, no mínimo, 2 horas à 65°;
3. Adicionar 300 μ l de Tampão saturado de NaCl. Homogeinizar e deixar por 15 minutos no freezer;
4. Centrifugar a 15.000 rpm por 15 minutos à 4°C;
5. Transferir 600 μ l do sobrenadante para um novo tubo;
6. Adicionar 800 μ l de Etanol Absoluto 100%;
7. Precipitar o *pellet* DNA a 15.000 rpm por 15 minutos, a 4°C;
8. Lavar *pellet* com etanol 70% e repetir o passo 4;
9. Retirar todo o Etanol e deixar secar o pellet por 1 hora, ressuspendendo-o em 150 μ l à 250 μ l de água milli-Q, sendo este passo dependente do tamanho do *pellet*;
10. Diluir o *pellet* em "banho-maria" a 60°C por 45 minutos.

TAMPÃO DE TLN:

400 mM NaCl

2 mM EDTA pH 8,0

Tris-HCl 10 mM pH 7,5

PROTEINASE K: 10 mg/ml

NaCl: 6 mM

ANEXO 2.3

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA (SANGUE)

1. Centrifugar o sangue total a 5.000 rpm por 40 min. para formar a camada de leucócitos entre o plasma e a parte sólida do sangue;
2. Remover uma alíquota de 500 μ l da camada de leucócitos, colocar em um tubo de 2,0 ml e adicionar 800-900 μ l de Tampão de Lise Celular gelado a cada amostra;
3. Vortexar cuidadosamente por 10 segundos 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 1,0 ml de Tampão de Lise Celular e repetir os passos 3 e 4 até o *pellet* adquirir cor creme;
6. Adicionar 400 μ l de Máster Mix a cada tubo e pipetar "up and down" até o *pellet* se desfazer. Se o *pellet* não desfizer facilmente, vortexar durante 15 segundos e adicionar 20 μ l de Proteinase K;
7. Incubar as amostras a 50° C durante 2 horas ou *overnight*. Vortexar o tubo a cada 30 minutos por 15 segundos para garantir a ressuspensão do *pellet*;
8. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletar alguns debris celulares;
9. Recolher o sobrenadante em tubo limpo e adicionar 200 μ l de cloreto de lítio 7,5 M ou NaCl saturado 7 M a cada uma das amostras. Vortexar por 5 segundos e colocar as amostras em gelo durante 10 min;
10. Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm para precipitar as proteínas e outros contaminantes;
11. Recolher o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 1,0 ml de etanol absoluto, misturar por inversão, até que os flocos de DNA se tornem visíveis;
12. Contrifugar os tubos a 13.000 rpm durante 10 min. para peletar o DNA precipitado. Adicionar 1,0 ml de etanol 70% sem desfazer o *pellet* DNA e centrifugue novamente;
13. Retirar o etanol em uma bomba de vácuo, deixar o *pellet* secar por no mínimo 30 minutos e ressuspender em 20 μ l de água milli-Q para o tubo que não se vê o *pellet* e 30 μ l para o tubo que se vê o *pellet*.

REAGENTES E SOLUÇÕES

TAMPÃO DE LISE CELULAR (Volume final = 400 ml)

Solução de Trabalho	Estoque	Preparo Solução de Trabalho
Sacarose 320 mM	100%	43,81g
Tris-HCl 10 mM pH 7,5	1M	4,0 ml
MgCl ₂ 5mM	1M	2,0 ml
Triton X-100	100%	4,0 ml
Água		Completar até 400ml

MÁSTER MIX* (Volume final = 200 ml)

Solução de Trabalho	Estoque	Preparo da Solução de Trabalho
Tris-HCl 10 mM pH 7,5	1,0 M	2,0 ml
EDTA 10 mM	0,5 M	4,0 ml
NaCl 10 mM	3,0 M	667 µl
SDS 0,5 %	10%	10,0 ml
Proteinase K	10 mg/ml	**
Água		Completar até 200 ml

* Pode ser armazenado à temperatura ambiente

** A proteinase K é adicionada na hora do uso, sendo 20 µl por amostra. Esta uma vez manipulada deve ser recongelada a - 20°C rapidamente.

ANEXO 2.4**COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA**

1. Retirar o gel da placa e coloca-lo em uma vasilha contendo ácido acético 10%;
2. Deixar o gel na solução por, no mínimo, 30 minutos;
3. Lavar 2 x o gel com água milli-Q por 2 minutos;
4. Retirar toda a água e acrescentar por 20 minutos a solução de nitrato de prata (0,2 mg para cada 100 ml de água e 150 µl de formaldeído);
5. Retirar a solução e lavar o gel 2 x por 30 segundos;
6. Acrescentar a solução carbonato de sódio gelada (3 g de carbonato de sódio, 150 µl de formaldeído e 20 µl de tiosulfato 10% para 100 ml);
7. Esperar até as banda aparecerem e parar a reação com ácido acético 10%;
8. Secar o gel em celofane para posterior análise.

ANEXO 2.5

PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS AMPLIFICADOS DA AGAROSE

1. Recortar do gel de agarose pelo menos 2 ampliações de um fragmento de boa qualidade;
2. Colocar estes fragmentos em microtubos (0,5 ml) furados com agulha na extremidade posterior e preenchidos com lã de vidro 0,5 mm;
3. Adicionar este tubo dentro de um microtubo (1,5 ml) e centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm;
4. Medir o volume do líquido após a centrifugação e acrescentar para cada 8 µl de líquido purificado 2 µl de acetato de sódio 7,5 M, completando o volume com etanol absoluto;
5. Deixar a solução à -20°C *overnight* para precipitar o produto;
6. Centrifugar 13.000 rpm por 15 minutos;
7. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com etanol 70%;
8. Deixar secar por pelo menos 1 hora e diluir o precipitado em 10 µl de água milli-Q.

ANEXO 2.6

CLONAGEM

CLONAGEM GÊNICA EM BACTÉRIA *E. coli* DH5 α – kit TOPO TA CLONING (Invitrogen)

1) Preparo de material para autoclavar

1. Placas de petri;
2. Meio LB sólido para estocar clones em placas de petri na geladeira;
3. Palitos;
4. Tubos de ensaio para crescer cultura de bactérias em meio LB líquido;
5. Meio LB líquido;
6. Glicerol 50X;
7. Microtubos de 1,5 ml novos;
8. Água ultrapura.

2) Preparo de meio

1. Utilizar 30 ml de meio LB (0,3 g de triptona; 0,15 g de extrato de levedura; 0,3 g de NaCl e 0,48 g de bacto-ágar) para cada placa de petri;
2. Após atingir a temperatura morna adicionar 50 μ g/ml de ampicilina ao meio com bacto-ágar e transferir para placa de petri. Após solidificação, as placas devem ser devidamente identificadas e estocadas com o meio para cima, evitando que a água evaporada caia no mesmo;
3. As mesmas condições devem ser utilizadas para meio LB líquido, exceto bacto-ágar.

3) Reação de ligação (kit *Topo TA Clonig* - Invitrogen)

1. 3 μ l do produto de PCR purificado
2. 1 μ l de plasmídeo ("*topo vector*")
3. 1 μ l solução salina
4. 1 μ l de água
5. 20 minutos a 22°C

4) Transformação

1. Acrescentar 2 μl do produto de ligação à 100 μl de bactéria competente (estocada a -80°C /descongelar a temperatura ambiente);
2. Colocar esta solução a 42°C por 30 segundos, e imediatamente transferi-la para gelo por mais 2 minutos;
3. Acrescentar 250 μl de meio LB líquido à bactéria transformada;
4. Incubar esta solução à 37°C por 1 hora, sob agitação de 180 rpm.

5) Plaqueamento

1. Acrescentar ao meio sólido 40 μl de X-gal (40 mg/ml) e 40 μl de IPTG (100 mM);
2. Plaquear 100 μl de bactéria transformada;
3. Vedar as placas com parafilme e estocar a 4°C .

6) Estocagem da bactéria em glicerol

1. Acrescentar 400 μl de 50 X glicerol em 850 μl de bactéria transformada;
2. Vortexizar bem esta solução e estoca-la a -80°C .

ANEXO 2.7**EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS**

1. Utilizar 3 ml de cultura e centrifugar por 1 minuto a 13.000 rpm;
2. Descartar o sobrenadante e adicionar no precipitado 100 µl de solução GET (50mM glicose, 25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0);
3. Ressuspender a solução no vórtex e adicionar 200 µl da solução II (SDS 1%, NaOH 0,2 N) – esta solução deve ser prepara na hora
4. Incubar as amostra em gelo por 20 minutos;
5. Adicionar 150 µl de acetato de potássio 3 M, misturar por inversão e deixar no gelo por 20 minutos;
6. Centrifugar por 15 minutos a 4°C e 13.000 rpm. Manter os tubos no gelo após centrifugação e transferir o sobrenadante para um novo tubo;
7. Adicionar 500 µl de isopropanol, centrifugar nas mesmas condições anteriores;
8. Descartar o sobrenadante e adicionar 600 µl de etanol 75%;
9. Centrifugar novamente e retirar todo o etanol, deixando secar por no mínimo 30 minutos;
10. Ressuspender o precipitado em 20 µl de água milli-Q e 2 µl de Rnase (10 mg/ml), deixando a 37°C por 15 minutos;
11. Aplicar de 2 a 3 µl dessa extração em gel de agarose 0,8