

**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO
DOS GENES EF1A E PTI-1 NO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

Elisângela Rosa Cordeiro

Uberlândia/2006

**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO
DOS GENES EF1A E PTI-1 NO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

**Aluna: Elisângela Rosa Cordeiro
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

**Uberlândia-MG/
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

C794m Cordeiro, Elisângela Rosa, 1972-

Modulação da expressão dos genes EF1A e PTI-1 no
câncer de
próstata / Elisângela Rosa Cordeiro. - 2006.

99 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Próstata - Câncer - Teses. I. Goulart, Luiz Ricardo, 1962-
. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:

616.65-006.6

Palavras chave: genes EF1A e PTI-1, expressão gênica, RT_PCR , câncer de próstata.

**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES EF1A E PTI-1 NO CÂNCER DE PRÓSTATA

Elisângela Rosa Cordeiro

Comissão Examinadora

PRESIDENTE: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart
EXAMINADORES: Dr.^a. Etel Rodrigues Pereira Gimba
Dr.^a Ana Graci Brito Madurro
Dr.^a.Ana Maria Bonetti
Dr. Danielo Garcia de Freitas

Uberlândia-MG

2006

DEDICATÓRIA

À MINHA FILHINHA ANA CECÍLIA, PELOS SORRISOS QUE MUITO ME AJUDARAM A CONCLUIR ESSE TRABALHO E AO MEU MARIDO RONALDO PELA COMPREENSÃO, APOIO E RESIGNAÇÃO DURANTE O DESENVOLVER DESSE TRABALHO.

AOS MEUS PAIS E IRMÃS PELO INCENTIVO, APOIO E AJUDA QUE FORAM DE SUMA IMPORTÂNCIA PARA QUE EU CONSEGUISSE VENCER MAIS ESSA ETAPA.

AGRADECIMENTOS

O meu muito obrigada ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pela compreensão e apoio nas horas de dificuldade, pela firmeza e objetividade quando foi preciso, por ter acreditado na minha força de vontade e me conceder a oportunidade de concluir mais um trabalho nesta área.

Aos colegas Carlos Prudêncio, Guilherme Rocha, Fausto E. Caparelli, Juliana Franco, Karina Marangoni, Alexandra Cardoso, Ana Paula Freschi, Andréia Capaneli, Rone Cardoso pelos momentos de discussão, descontração e amizade e um muito obrigada especial para o recente colega José Geraldo pela ajuda e disponibilidade.

O meu muito obrigada à Paula Cristina Faria pela amizade, disponibilidade e ajuda não só durante esse trabalho, mas ao longo do tempo de convivência de bancada.

A todas as “estagiárias”, Sílvia, Luciana, Tatiana, Patrícia e Flávia pelo incentivo e apoio.

A todos os colegas e amigos de bancada do Grupo de Câncer de Próstata, Adriana Neves, Ana Paula, Carolina, Fabiana, Isabela, Thaíse e Whashinton que foram fundamentais no desenvolver deste trabalho, fazendo do mesmo uma lição de que o trabalho em grupo é mais produtivo e, quando feito entre pessoas às quais podem-se chamar de AMIGOS, ele só produz bons resultados. Muito obrigada.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMO GERAL.....	01
INTRODUÇÃO GERAL.....	02
PRÓSTATA :ANTOMIA E PATOLOGIAS.....	03
EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PRÓSTATA.....	07
FATORES DE RISCO.....	08
BIOLOGIA MOLECULAR DO CÂNCER DE PRÓSTATA.....	09
OS GENES EF1A (FATOR DE ELONGAÇÃO 1 A) E PTI-1 (PROSTATE TUMOR INDUCING GENE-1).....	13
A TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR).....	20
RT-PCR SEMI QUANTITATIVA.....	21
REFERÊNCIAS GERAIS.....	22
CAPÍTULO ÚNICO.....	40
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
1-INTRODUÇÃO.....	43
2- OBJETIVOS.....	46
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1- Obtenção das amostras.....	47
3.2- Extração das amostras de RNA.....	48

3.3- RT-PCR semiquantitativo e qualitativo	48
3.3.1-Transcrição Rversa (RT) e amplificação do gene da beta 2 microglobulina.....	48
3.3.2- Desenho dos iniciadores.....	49
3.3.3- RT-PCR semi-quantitativa para a região de EF1A.....	49
3.3.4- RT-PCR qualitativo para a região 5' UTR.....	50
3.3.5- RT-PCR semi-nested para a região de Fusão.....	50
3.4-Análise do gene PTI-1 em relação ao gene DD3.....	51
3.5- LIS-SSPC (Low Ionic Strenght Single Stranded conformation Polymorphism).....	51
3.6- Leitura densitométrica para a estimativa dos níveis relativos de expressão gênica.....	52
3.7 Análise estatística.....	52
3.8 Bioinformática.....	53
4-RESULTADOS.....	54
4.1- Análise dos níveis de expressão do gene EF1A.....	54
4.2- Análise de LIS-SSCP.....	60
4.3- Análise da RT-PCR qualitativa para as regiões 5' UTR e Fusão...	60
4.4 Determinação da estrutura predita do gene PTI-1 por análise de bioinformática.....	68
5-DISCUSSÃO.....	70
6-CONCLUSÕES	78
7-REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS.....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Caracterização estrutural do gene PTI-1 em relação ao EF1A e ao *Mycoplasma hyopneumoniae*. * Iniciadores para regiões 5' UTR, Fusão e EF1A. Alinhamento das seqüências da região codificante do EF1A (E) em relação ao PTI-1 (P) (acesso no NCBI: gil62897653|dbj|BAD96766.1 e gil927065|gb|AAC09385.1, respectivamente). A figura mostra a seqüência modificada do PTI-1 em relação à seqüência do EF1A. Os 6 aminoácidos originais da proteína eEF1A, que sofrem modificações no PTI-1, estão representados em vermelho 45
- Figura 2- Géis representativos da RT-PCR semi-quantitativa dos genes B2M e EF1A em sangue periférico, de acordo com o grupo estudado. (A)-Padrão de amplificação da B2M; (B): Linha 1- Padrão de amplificação da B2M e Linha 2- Padrão de amplificação do *EF1A* obtido para o grupo CN (C): Linha 1- Padrão de amplificação da B2M e Linha 2- Padrão de amplificação do *EF1A* obtido para o grupo HPB e (D): Linha 1-Padrão de amplificação da B2M e Linha 2- Padrão de amplificação do *EF1A* obtido para o grupo CaP..... 55
- Figura 3-Níveis médios da expressão relativa de transcritos do gene EF1A em (A) sangue periférico de pacientes com CaP, HPB e do controle negativo (CN) e (B) tecido de pacientes com CaP e HPB, obtidos por RT-PCR semi-quantitativa, curva de tendência e porcentagens observadas por classe de expressão..... 56
- Figura 4-Análise da expressão relativa do gene EF1A, obtida por RT_PCR semi-quantitativa, dos pacientes do grupo CaP em relação à classificação TNM e curva de tendência observada..... 59
- Figura 5-Gel de LIS-SSCP representativo do padrão de migração eletroforética do produto, obtido por RT-PCR semi-quantitativa, do gene EF1A..... 60
- Figura 6-Gel representativo de RT-PCR qualitativo para detecção da região 5' UTR em amostras de sangue periférico e tecido dos grupos HPB e CaP..... 61

- Figura 7- Gel representativo da RT-PCR semi-nested para detecção da região de fusão em amostras de sangue e tecido de pacientes HPB e CaP..... 61
- Figura 8- Análise dos níveis relativos de expressão do gene EF1A, obtidos por RT-PCR semi-quantitativa, em relação à presença dos haplótipos do gene PTI-1, presença ou ausências das regiões 5'UTR e fusão em (A) sangue periférico e (B) em tecido prostático de acordo com cada grupo estudado..... 65
- Figura 9-Análise dos níveis relativos de expressão do gene EF1A, obtidos por RT-PCR semi-quantitativa em relação aos modelos (NN+NP+PN e PP e NN+PN e PP+NP) adotados para os haplótipos do gene PTI-1, regiões 5' UTR e fusão em sangue (A) e tecido (B) de acordo com os grupos estudados..... 66
- Figura 10- Análise dos níveis relativos de expressão do gene EF1A no grupo CaP, obtidos por RT-PCR semi-quantitativa em relação ao modelo (NN+NP+PN e PP) adotado para os haplótipos do gene PTI-1, regiões 5' UTR e fusão em sangue em sangue periférico, associado ao estadiamento TNM..... 67
- Figura 11-Estrutura tridimensional das moléculas do **A**- Gene EF1A, **B** gene PTI-1 e **C** sobreposição das imagens. As setas azuis indicam a região exclusiva do Gene EF1A, a qual corresponde ao domínio I que é perdido na molécula do PTI-1. As setas em vermelho mostram uma região na extremidade carboxi terminal da molécula, que provavelmente, devido a sua conformação, confere instabilidade para a mesma..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Genes atualmente pesquisados no câncer de próstata.....	12
Tabela 2- Caracterização dos pacientes, pertencentes aos grupos CaP, HPB e CN, selecionados para o estudo, em amostras de sangue periférico e tecido de acordo com os dados clínicos e histopatológicos.....	48
Tabela 3- Distribuição dos pacientes, CaP, HPB e CN, por intervalo médio de expressão relativa do gene EF1A em sangue periférico e tecido, com número de pacientes e respectivas porcentagens observadas para cada intervalo de classe	57
Tabela 4 - Distribuição dos pacientes dos grupos CaP, HPB e CN, em sangue periférico e tecido, de acordo com a presença do transcrito do gene <i>PTI-1</i> , regiões 5'UTR e fusão, obtida por RT-PCR qualitativa, em números e porcentagem.....	62
Tabela 5-Estimativa para aplicação da RT-PCR qualitativa para detecção dos transcritos gênicos do gene <i>PTI-1</i> , regiões 5'UTR e fusão, no diagnóstico clínico do CaP.....	63
Tabela 6- Distribuição dos indivíduos, de acordo com o grupo de estudo, em sangue periférico e tecido, e cálculo dos níveis relativos médios de expressão do mRNA do gene EF1A.em relação aos haplótipos do gene <i>PTI-1</i> , presença ou ausência das regiões 5'UTR e fusão.....	64
Tabela 7–Distribuição dos indivíduos dos grupos CaP e HPB, em sangue periférico, de acordo com a presença dos transcritos do gene <i>PTI-1</i> , regiões 5' UTR ou fusão, em relação à detecção dos transcritos gênicos do DD3 obtida por RT-PCR semi-quantitativa.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

C° - Grau Celsius
CaP –Cancer de próstata
CN- controle negativo
cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
DEPC- dietilpirocarbonato
EF1A- fator de elongação 1A
DHT- diidrotestosterona
dNTPs – desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA- ácido etilendiaminotetracético sal dissódico
g- gramas
HPB- hiperplasia prostática benigna
IOD- densidade ótica integrada
KDA – quilo Dalton
M-molar
Min- minuto
ml- mililitros
mg- miligrama
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mM- milimolar
MMLV-RT Murine Maloney Leukemias vírus reverse transcriptase
NaCl- Cloreto de sódio
pb- pares de base
PCR- Polymerase Chain Reaction
pmoles- picos moles
PSA –antígeno prostático específico.
PTI-1- prostate tumor-inducing-gene 1
RNA – ácido ribonucleico
mRNA- ácido ribonucleico mensageiro
tRNA- ácido ribonucleico transportador
rpm- rotações por minutos.
RT- transcrição reversa
RTU- ressecção transuretral
s – segundo
TAq- Thermus aquaticus
TBE- tampão Tris/ borato/ Edta
TNM- tumor- node- metastático
µg- micrograma
µl-microlitro
µm- micromolar
UV –ultravioleta
USTR- ultra sonografia transretal.

Resumo geral

A descoberta de marcadores moleculares que possam melhorar o diagnóstico clínico e as perspectivas de cura não só do câncer de próstata como de várias outras doenças tem se tornado o objetivo central da biologia molecular. Nosso trabalho teve por objetivo rever o papel do gene EF1A e do seu homólogo PTI-1 no câncer de próstata. Para tal, foram analisadas amostras de sangue periférico e tecido de peça cirúrgica provenientes de pacientes diagnosticados com hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP) e amostras de sangue de um grupo de homens jovens, considerados controle negativo (CN). Observamos que o gene EF1A tem níveis relativos de expressão maiores no grupo de pacientes do grupo Cap do que nos grupos de HPB e CN. Em sangue periférico, níveis relativos de expressão do EF1A maiores do 1,5, conferem uma razão de chances 10,56 vezes maior de o indivíduo apresentar CaP em relação aos com menores níveis de expressão. No tecido essa chance é de 4,6 vezes para níveis de expressão com média entre 1 e 1,5. A presença do transcrito do gene PTI-1, região 5' UTR, faz com que os indivíduos tenham uma chance 1,94 vezes maior de desenvolver CaP. A associação do biomarcador DD3 ao gene PTI-1 faz com que a chance de desenvolver CaP seja de 3,14 vezes maior quando esses dois genes são detectados simultaneamente. Embora tenhamos que melhorar a eficiência dos testes com os genes EF1A e PTI-1 para a aplicação clínica, possivelmente eles terão uma contribuição significativa, associados a outros biomarcadores, como por exemplo, o DD3, para o diagnóstico do CaP.

Palavras-chave: genes EF1A e PTI-1, expressão gênica, RT_PCR , câncer de próstata

Introdução Geral

PRÓSTATA: ANATOMIA E PATOLOGIAS

A próstata humana é um órgão constituído por 30% de tecido fibromuscular e 70% de tecido glandular, ela tem formato esférico, 3,8 cm de comprimento em média e localiza-se na pelve verdadeira, abaixo da bexiga urinária, circundando a parte posterior da uretra. É a maior glândula acessória do sistema genital masculino (SMITH,1979, GOSLING *et al.*,1992; VAN DE GRAFF,2003).

A próstata é dividida, anatomicamente, em cinco zonas: 1)- zona fibromuscular anterior que contém 30% do volume da próstata, 2)-zona periférica, considerada a maior subdivisão anatômica, contém 75% de tecido glandular da próstata, 3)-zona central, que contém 25% de tecido glandular, 4)- zona pré-prostática, que tem função de esfíncter durante a ejaculação para impedir o refluxo do líquido seminal para a bexiga e 5)-zona de transição, que representa pelo menos 5% da massa glandular normal da próstata e circunda a uretra, é o local de ocorrência da hiperplasia prostática benigna (HPB) (COFFEY, 1992; WALSH & WORTHINGTON, 1998).

A próstata é uma glândula acessória ao aparelho seminal. Seu produto de secreção, o líquido prostático, um importante constituinte do sêmen, atinge a luz da uretra através dos canais prostáticos e ativa também a movimentação dos espermatozóides (ERHART, 1992).

A próstata é regulada, principalmente, por hormônios sexuais chamados androgênios, que provêm dos testículos, sendo a testosterona o mais importante deles. Após ser liberada pelos testículos, a testosterona circula pelo sangue, entra nas células da próstata por difusão e é transformada, no citoplasma, em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5-alfa-redutase. A DHT se liga a um receptor específico e é transportada ao núcleo celular, onde favorece a síntese de DNA e RNA (COFFEY, 1992; SROUGI, 1997; WALSH & WORTHINGTON, 1998).

Algumas patologias clinicamente importantes podem afetar a próstata nos homens adultos, como as prostatites, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata. Essas apresentam grande significado clínico não só pelas suas

conseqüências mas também, pela alta freqüência com que se manifestam (SROUGI & CURI, 1998).

A prostatite é uma doença prostática freqüente em homens adultos, sendo rara em adolescentes. Ocorre em formas distintas ou síndromes, as quais têm causas, características clínicas e seqüelas diferentes. As formas mais comuns são: prostatites bacterianas agudas e crônicas, prostatites não bacterianas e prostatodinia (próstata dolorida). O tratamento clínico do paciente torna-se possível a partir do diagnóstico e de estratégia terapêutica específica (MEARES, 1992; WALSH & WORTHINGTON, 1998).

A hiperplasia prostática benigna (HPB) caracteriza-se por um aumento notório do componente acinar prostático em relação aos componentes intersticial e capsular, acarretando por conseqüência, um aumento volumétrico da próstata. Esse aumento benigno ocorre sempre após os 35 anos de idade, sendo responsável por vários sintomas do trato urinário inferior em homens (STAMEY & NCNEIL, 1992; CATALONA, ANTENOR, *et al.*, 2002; CATALONA 2004).

O tamanho da próstata aos 35 anos é de cerca de 15 gramas. Contudo, a glândula pode dobrar de peso a cada década. Depois dos 70 anos de idade, o crescimento tende a cessar ou se faz mais lentamente (SROUGI & CURY, 1998). Como conseqüência do crescimento prostático, ocorre um bloqueio do canal uretral, causando no paciente certos transtornos urinários sob a forma de enfraquecimento progressivo do jato urinário, gotejamento de urina após cada micção e aumento do número de micções, principalmente durante a noite (SROUGI, 2003). A HPB é uma das principais doenças urológicas; atinge grande parcela dos homens, podendo ocorrer em até 90% daqueles com idade superior a 80 anos (DAMIÃO & CARRERETE, 2003).

Como várias outras formas de câncer, o câncer de próstata é uma doença multi-focal e multi-causal envolvendo o acúmulo de múltiplas alterações genéticas. Ele corresponde a uma alteração do balanço entre proliferação e morte celular. Durante os estágios iniciais do crescimento do câncer, as células respondem aos mesmos fatores regulatórios (hormônio dependente), embora as taxas de proliferação celular sejam maiores do que as de morte celular. A disfunção no

processo regulatório associada a mutações genéticas reflete graus de respostas anormais dos fatores de crescimento, gerando um processo que leva a formação de células malignas, com crescimento promovido por via autócrina que passa a não responder ao controle androgênico (hormônio independente) (GRIFFITHS & MORTON, 1999).

Mais de 95% das neoplasias da próstata são representadas pelos adenocarcinomas e o restante compreende casos de sarcomas, carcinoma epidermóide e carcinoma de células transicionais. Aproximadamente, 70% dos adenocarcinomas se desenvolvem na zona periférica, menos de 5% na zona central e mais de 25% originam-se na zona de transição (STAMEY & NCNEAL, 1992; SROUGI, 1998; BOSTWICK, 1999; JARMULOWICZ, 1999).

Os pacientes com câncer de próstata apresentam os sintomas semelhantes aos da HPB (dificuldade de urinar, micção freqüente ou urgente, fluxo interrompido ou fraco, hesitação, gotejamento), além de sangue na urina ou sêmen, forte dor nas costas, na pelve, nos quadris ou nas coxas, ereções menos firmes ou impotência e, também diminuição da quantidade de fluido seminal ejaculado (WALSH, 1992; SROUGI & CURY, 1998; WALSH & WORTHINGTON, 1998).

Não há dúvidas de que a história familiar é um importante fator de risco embora 90% dos CaP sejam atribuídos a fatores ambientais (esporádicos) e apenas 10% a fatores hereditários (ALBRIGHT & EELES, 1995; CHAN *et al.*, 1998; RUITER *et al.*, 1999).

O câncer de próstata é uma patologia que pode ser detectada precocemente através de métodos diagnósticos de triagem. De acordo com a Sociedade Americana de Cancerologia, para a detecção precoce do câncer em indivíduos sem sintomas preconiza-se o toque retal e o PSA (antígeno prostático específico) sérico anuais a partir de 50 anos de idade. Estes exames, além do baixo custo, possuem boa sensibilidade e especificidade. Inclusive, estudos recentes sugerem que a triagem de homens em idade acima de 50 anos através do toque retal e do PSA diminuiu a incidência de doença tardia com influência nas taxas de mortalidade (SMART, 1997; MERRILL & STEPHENSON, 2000), na medida em que o câncer de próstata pode ser curável, desde que diagnosticado precocemente (MIRANDA *et al.*, 2004).

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

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

A evolução dos pacientes com adenocarcinoma da próstata está intimamente relacionada com a extensão da neoplasia. Recentemente, a União Internacional Contra o Câncer (UICC) propôs a utilização de Sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) em adenocarcinoma da próstata, de modo a padronizar a classificação dos pacientes com a doença e permitir estudos comparativos mais precisos (STAMEY & NcNEAL, 1992, SROUGI, 1998).

O sistema de graduação histopatológico mais utilizado é o proposto por Gleason (1996), que valoriza, principalmente, o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático. Nesse sistema, os tumores são classificados em 5 graus, denominando-se grau 1 as lesões mais diferenciadas e grau 5 as mais indiferenciadas. Como os adenocarcinomas da próstata apresentam mais de um padrão histológico, o diagnóstico final na escala de Gleason é dado pela soma dos graus do padrão primário, predominante, e do padrão secundário, segunda maior área representada (STAMEY & NcNEAL, 1992; ISAACS, 1997; SROUGI, 1998).

Epidemiologia do câncer de próstata:

Nas últimas décadas, o câncer de próstata tem emergido como uma das doenças mais comuns entre os homens idosos. O câncer de próstata é a segunda principal causa de mortalidade por câncer em homens nos Estados Unidos com uma taxa de 26 mortes por 100.000 (GREENLEE, 2001). No Brasil, assim como no EUA, o câncer de próstata é o segundo mais diagnosticado depois do câncer de pele não melanoma e a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo de pulmão (GRIFFITS & MORTON, 1999; CHANG *et al.*, 2001; INCA, 2006). De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA), para 2006, estima-se a ocorrência de 47.280 casos novos para este tipo de câncer.

A região sudeste apresenta alta incidência desse tipo de tumor em homens, sendo que em Minas Gerais ele ocupa o segundo lugar em casos diagnosticados, a taxa estimada para a ocorrência de câncer de próstata, em 2006, no estado é de 49.06 casos por 100.000. O aumento observado nas taxas de incidência pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida do brasileiro. Na maioria dos casos, o tumor apresenta um crescimento lento, de longo tempo de duplicação, levando cerca de 15 anos para atingir 1 cm³ e acometendo homens acima de 50 anos de idade (INCA, 2006).

A incidência do CaP varia de acordo com a raça e localização geográfica. Os países escandinavos e o Canadá apresentam a maior incidência mundial de câncer de próstata, ao passo que nos países orientais a frequência é até 25 vezes menor (HERING, 2003). Segundo as estatísticas americanas, a incidência em negros é maior do que em brancos (proporção 2:1). De acordo com Thomas e colaboradores (2002 apud HERING, 2003), quanto à incidência de CaP em homens jovens, os negros têm 60% mais essa patologia do que os homens brancos. Esse tipo de câncer manifesta-se também de forma mais agressiva em negros, com uma chance de morrer pelo mal duas vezes maior do que a observada em brancos (SROUGI, 1998).

Fatores de risco

O câncer de próstata é uma doença multifatorial, com componentes genéticos envolvidos em sua etiologia (NWOSU *et al.*, 2001). A idade, a etnia e a história familiar da doença estão entre os fatores de risco mais amplamente associados ao CaP (PIENTA & ESPER, 1993; ALLEN *et al.*, 2004).

Embora 90% dos cânceres de próstata sejam atribuídos a fatores ambientais e apenas 10% a fatores hereditários (ALBRIGH & EELES, 1995; CHAN *et al.*, 1998; RUITER *et al.*, 1999), os antecedentes familiares têm particular importância, pois elevam o risco em três vezes ou mais para os descendentes de pacientes com CaP (CUSSENOT & VALERI, 2001). O risco ainda aumenta se a idade de aparecimento for precoce e se o acometimento familiar for múltiplo (CARTER *et al.*, 1992; MACHADO, CINTRA, 2003).

A idade é um forte fator de risco para o CaP. Em homens americanos com idade de 75 a 79 anos o risco de desenvolver a doença é 130 vezes maior do que em homens com idade entre 45-49 anos. Um grande número de alterações genéticas têm sido detectadas em tecidos com câncer prostático, sugerindo que danos cumulativos no DNA com a idade, podem explicar, parcialmente, essa tendência (CHAN *et al.*, 1998).

A etnia também é um importante fator de risco bem estabelecido para a incidência e mortalidade desse tipo de câncer. Negros apresentam um risco 60% maior de desenvolver o CaP e uma mortalidade duas vezes maior que a população caucasiana da mesma idade (MACHADO; CINTRA, 2003).

Quanto aos fatores ambientais, existem muitas relações possíveis, entre as quais com substâncias químicas utilizadas na indústria de fertilizantes, ferro, cromo, cádmio, borracha e chumbo, embora não seja comprovada a correlação entre esses fatores e uma maior incidência do câncer de próstata (WALSH & WORTHINGTON, 1998).

Um grande progresso tem sido observado na relação de fatores nutricionais e hormonais com o câncer de próstata (CHAN *et al.*, 1998).

Allen e colaboradores (2004) sugerem que a ocidentalização, ou melhor, a adoção do estilo de vida ocidental, principalmente no que se refere a uma dieta rica em gordura saturada proveniente da carne animal, pode ser um fator importante no desenvolvimento do câncer de próstata.

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

A Biologia Molecular e Câncer de Próstata

O câncer de próstata é uma doença originada por modificações genéticas que inativam genes supressores de tumor e ou ativam proto-oncogenes (PORKKA & VISAKORPI, 2004). Essas alterações desorganizam a homeostase tissular, pois podem causar um aumento desgovernado da divisão celular, ou resultarem na diminuição da apoptose causando o aparecimento dos tumores (GATTAS, 2003).

A origem do tumor prostático foi atribuída por um longo período de tempo como sendo determinada apenas pela estimulação hormonal da testosterona, porém atualmente é sabido que o desenvolvimento tumoral é dirigido geneticamente, sendo em 10% dos casos por transmissão hereditária e os demais por alterações genéticas esporádicas (GATTAS, 2003)

Muitos esforços têm sido destinados ao melhor entendimento dos complexos mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese e progressão do CaP (GIMBA &

BARCINSKI, 2003). Os métodos que têm sido usados para caracterizar as aberrações genéticas encontradas nessa doença incluem estudos familiares designados a mapear *loci* hereditários, estudos cromossomais para a identificação de anomalias que possam localizar oncogenes ou supressores de tumor e intensos estudos de expressão gênica (LI & NELSON, 2001, KARAN *et al.*, 2003).

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

A busca por novos marcadores moleculares para o diagnóstico do câncer de próstata também se deve ao fato de que o PSA, marcador sérico mais amplamente utilizado, vem apresentando limitações (STAMEY *et al.*, 2004; MIKOLAJCZYK *et al.*, 2004). Em muitos casos, o PSA leva a resultados falsos negativos e falsos positivos (GIMBA & BARCINSKI, 2003).

Vários estudos têm demonstrado a expressão de diversos genes no câncer de próstata comparado a tecidos normais e hiperplásicos. Outros demonstram os polimorfismos genéticos associados ao CaP. Atualmente, um grande número de marcadores moleculares têm sido pesquisados. A tabela 1 traz um sumário desses marcadores e dos seus respectivos estudos.

Apesar do conhecimento emergente das alterações genéticas envolvidas no CaP, ainda não foi possível entender, claramente, os mecanismos moleculares dessa doença. Ainda não foi desenvolvido um modelo para o CaP similar ao descrito para o câncer de coloretal (FEARON, VOGELSTEIN 1990). Parece que a predisposição ao do câncer de próstata genético é extremamente complicada. É provável que nenhum dos genes com alta penetrância para a predisposição ao câncer de próstata contribua com uma fração similar no desenvolvimento da doença como por exemplo os genes BRCA1 e a BRCA2 no câncer de mama. Pelo menos, os genes atualmente conhecidos de suscetibilidade (ELAC2, RNASEL, e MSR1) parecem contribuir somente para uma fração pequena de carcinomas de próstata.

Portanto, não sendo úteis em aconselhamento genético. Por outro lado, o significado dos polimorfismos de baixa penetrância, que explicam provavelmente a fração principal do risco herdado, é ainda mais obscuro. Pouco se sabe sobre a etiologia do câncer de próstata. Em geral, os estudos epidemiológicos tradicionais não puderam identificar os principais fatores de risco ambientais. É concebível que somente combinando as análises de genótipos e da exposição ambiental, os fatores etiológicos do câncer de próstata sejam revelados (PORKKA & VISAKORPI, 2004).

Encontrar marcadores mais sensíveis ou genes com potencial oncogênico irão nos prover de ferramentas mais eficientes no diagnóstico e cura do câncer de próstata (YU *et al.*, 2006)

Tabela 1- Genes atualmente pesquisados no câncer de próstata

Nome do Gene	Localização	Citação
<u>EEF1A1L14</u> (PTI-1)		Shen R, <i>et al.</i> , 1995
<u>HPC1</u>	1q24-q25	Dunsmuir WD, <i>et al.</i> 1998;
<u>PRCA1</u>	1q24-q25	Carter BS, <i>et al.</i> , 1992
<u>PCAP</u>	1q42.2-1q43	Gibbs M, <i>et al.</i> , 1999
<u>SRD5A2</u>	2p23	Jaffe JM, <i>et al.</i> , 2000
<u>BIN1</u>	2q14	Ge K, <i>et al.</i> , 2000
<u>CTNNB1</u>	3p22-p21.3	Voeller HJ, <i>et al.</i> , 1998
<u>TGM4</u>	3p22-p21.33	An G, <i>et al.</i> , 1999
<u>ACPP</u>	3q21-q23	Dattoli M, <i>et al.</i> , 1999
<u>FGF2</u>	4q25-q27	Dorkin TJ, <i>et al.</i> , 1999
<u>FGF1</u>	5q31	Dorkin TJ, <i>et al.</i> , 1999
<u>SPARC</u>	5q31.3-q32	S Thomas R, <i>et al.</i> , 2000
<u>VEGF</u>	6p12	Duque JL, <i>et al.</i> , 1999
<u>CDKN1A</u> ,	6p21.2	Aaltomaa S, <i>et al.</i> , 1999
<u>IL6</u>	7p21	Drachenberg DE, <i>et al.</i> , 1999
<u>CYP3A4</u>	7q22.1	Rebbeck TR, <i>et al.</i> , 1998
<u>CAV1</u>	7q31.1	Thompson TC., 1998-99
<u>PDGFRL</u>	8p22-p21.3	Komiya A, <i>et al.</i> , 1997
<u>PSCA</u>	8q24.2	Reiter RE, <i>et al.</i> , 1998
<u>MSMB</u>)	10q11.2	Sakai H, <i>et al.</i> , 1999
<u>PTEN</u>	10q23.3	Wang SI, <i>et al.</i> , 1998
<u>FGF8</u>	10q24	Dorkin TJ, <i>et al.</i> , 1999
<u>CYP17</u>	10q24.3	Lunn RM, <i>et al.</i> , 1999
<u>MXI1</u>	10q25	Prochownik EV, <i>et al.</i> , 1998
<u>MKI67</u>	10q25-qter	Matsuura H, <i>et al.</i> , 2000
<u>KAI1</u>	11p11.2	Bouras T, Frauman AG, 1999
<u>POV1</u>	11p11.2-11p11.1	Cole KA, <i>et al.</i> , 1998
<u>CDKN1B</u>	12p13	Macri E, <i>et al.</i> , 1998-99
<u>IGF1</u>	12q22-q24.1	Baffa R, <i>et al.</i> , 2000
<u>TP53</u>	17p13.1	Koivisto PA, Rantala I 1999
<u>ERBB2</u>	17q11.2-q12	Mark HF, <i>et al.</i> , 1999
<u>PI5</u>)	18q21.3	Zhang M, <i>et al.</i> , 1997
<u>KLK3</u>	19q13	Abrahamsson PA, <i>et al.</i> , 1997
<u>KLK2</u>	19q13	Magklara A, <i>et al.</i> , 2000
<u>BGP1</u>	19q13.2	Luo W, <i>et al.</i> , 1999
<u>ETS2</u>	21q22.3	Sementchenko VI, <i>et al.</i> , 1998
<u>TMPRSS2</u>	21q22.3	Vaarala MH, <i>et al.</i> , 2001
<u>AR</u>	Xq11.2-q12	Koivisto PA, Rantala I 1999
<u>HPCX</u>	Xq27-q28	Lange EM., <i>et al.</i> , 1999
<u>SRY</u>	Yp11.3	Perinchery G, <i>et al.</i> , 2000

Os genes do EF1A (Fator de Elongação 1 A) e do PTI-1(prostate tumor-inducing-gene 1):

Várias anormalidades genéticas acumulam-se durante os multi-estágios da carcinogênese. As mudanças incluem alterações estruturais como mutações de ponto, amplificação e deleção, assim como alterações funcionais de alta e baixa expressão (SUGIMURA, 1992; OHNAMI *et al.*, 1999).

O aumento nas taxas de síntese de ácidos nucléicos e proteínas é uma característica típica das células em proliferação comparada aquelas em estado de quiescência. A natureza e a taxa de síntese de moléculas estão sobre controle regulatório, o qual é uma resposta às necessidades metabólicas ou biossintéticas internas ou à demanda ambiental extracelular. Tem sido bem documentado que conseqüências da ativação oncogênica levam a uma desregulação (desequilíbrio) de várias vias metabólicas, possivelmente incluindo um aumento global das taxas de síntese protéica (ROSENDALWALD, 1996; GOPALKRISHNAN, 1999).

O aumento inadequado nas taxas de expressão de proteínas, especialmente moléculas regulatórias com propriedades de crescimento, é um fator significativo para o processo de transformação celular, incluindo a progressão para um fenótipo mais oncogênico. Caso ocorra perda da fidelidade de tradução quando já existe uma desregulação anterior, uma forma mais agressiva de oncogênese ou um aumento da taxa de formação de tumor pode ocorrer (GOPALKRISHNAN, 1999).

Modificações na maquinaria traducional das células, incluindo mudanças nos fatores de iniciação e elongação de eucariotos, resultam em suscetibilidade à transformação e aquisição de propriedades transformantes e oncogênicas em células alvo específicas (RIIS *et al.*, 1990; SONENBERG, 1993).

Mudanças na expressão da eEF1A, uma proteína de transferência nucleotídica que liga GTP e tRNA aminoacil, e resulta no seu pareamento códon dependente no sitio A do ribossomo, conferem susceptibilidade à carcinogênese (TATSUKA *et al.*, 1992).

Em eucariotos o fator de elongação 1A cataliza o primeiro passo do ciclo de elongação (Kaziro, 1991). Ele transporta o tRNA aminoacil (aa-tRNA) do sítio A do ribossomo, o qual contém a cadeia polipeptídica crescente como peptidil-tRNA para o sítio P. O aa-tRNA é transportado no ribossomo como um complexo ternário eEF1A-GTP-aa-tRNA. Após a hidrólise do GTP, o complexo eEF1a-GDP é liberado do ribossomo. Este evento permite o posicionamento correto do aa-tRNA no sítio A do ribossomo em resposta ao pareamento códon-anticódon. O segundo passo do ciclo de elongação envolve a regeneração da forma ligante-GDP inativa do EF1A para a forma ligante-GTP ativa por meio de uma reação de transferência catalisada pelo fator de transferência 1B α (eEF1B α).

Após a formação de um novo peptídeo ligante catalisada pela peptidil-transferase ribossomal, um peptidil-tRNA está presente no sítio A do ribossomo e um tRNA deacetilado no sítio P (ribossomo em estado pré-translocação). No terceiro passo do ciclo de elongação, translocação, o peptidil-tRNA move-se do sítio A para o sítio P do ribossomo. A reação é catalisada pelo fator de elongação 2 (EF-G em bactéria). Ambos EF1A/EF-Tu e EF2/EF-G pertencem à classe de proteínas ligantes de GTP (DEVER *et al.*, 1987), caracterizada como uma chave molecular que permite a mudança de uma conformação ativa ligada ao GTP para uma conformação inativa ligada a GDP. Após hidrólise do GTP, o complexo eEF2-GDP libera o ribossomo, assim finalizando a reação de translocação. Ao completar o ciclo de elongação a maquinaria está pronta para começar um novo ciclo (LAMBERTI *et al.*, 2004).

O EF1A é análogo ao fator de elongação Tu de bactérias (EF-Tu), membro da superfamília de proteínas GTPase. Uma função primária do EF-Tu / EF1A é o processo cinético de correção de leitura que resulta na apropriada interação códon-anticódon. A expressão o EF-Tu/ EF1A depende das condições fisiológicas da célula. Durante o envelhecimento em ratos e em fibroblastos humanos os níveis do EF1A diminuem, porém em *Drosophila melanogaster*, se constitutivamente expresso, ocorre aumento na expectativa de vida (SHEPHERD *et al.*, 1989 e LAMBERTI *et al.*, 2004).

Em humanos, duas distintas isoformas do eEF1A são conhecidas, eEF1A1 e eEF1A2, codificadas por dois diferentes genes que estão localizados nos cromossomos 6q14 e 20q13.3, respectivamente (LUND *et al.*, 1996). Essas

isoformas apresentam um padrão muito distinto de expressão. eEF1A1 é expressa em todos os tecidos exceto em músculo esquelético diferenciado, enquanto eEF1A2 é predominantemente expressa em músculo esquelético. Em adição, eEF1A2 pode ser encontrada em células totalmente diferenciadas como o cérebro e coração (KNUDSEN *et al.*, 1993).

Além do papel central na tradução, o EF1A desempenha outras funções na célula eucariótica. Ele forma complexo com outros componentes celulares como a tubulina e a actina, cuja função ainda é obscura; e também está envolvido em vários processos celulares, incluindo embriogênese, senescência, transformação oncogênica e proliferação e organização do citoesqueleto (GANGWANI *et al.*, 1998). Alterações na expressão do EF1A têm sido relacionadas a fenótipos transformados em vários estudos independentes e em diferentes organismos (GOPALKRISHNAN, 1999; LAMBERTI *et al.*, 2004).

Achados que sugerem a relação entre apoptose e EF1A tem sido acumulados. Em *Trypanosoma cruzi*, a localização nuclear do EF1 α tem sido observada em parasitas em processo de apoptose. (BILLAUT *et al.*, 1996). EF1 δ liga-se com o Tat do HIV, o qual é conhecido por induzir apoptose, e interrompe a tradução do mRNA a célula hospedeira (XIAO *et al.*, 1998). Em adição, vários sinais, incluindo stress oxidativo e deprivação nutricional que levam a apoptose, regulam a expressão de ambos p53 e EF1A.

Em uma linhagem de células eritroleucêmicas somente uma forma mutante do p53, sensível à temperatura, sofre apoptose a 32° C, mas não a 37° C (KATO *et al.*, 1997). Usando essas células, genes regulados positivamente para o p53 foram isolados por *differential display*. Um dos genes com nível de expressão duas vezes maior a 32° C do que a 37°C foi identificado como o gene EF1A. Em adição, um elemento p53 responsivo, RRRCWWGYYY, o qual confere a capacidade para a indução pelo p53 em alguns genes, é conservado no gene EF1A de humanos, rato, e rã. Quando as células eritroleucêmicas descritas, são transfectadas com um plasmídeo contendo o elemento p53 responsivo e o gene da luciferase, a atividade da luciferase aumenta aproximadamente duas vezes na temperatura de 32° C. Como o EF1A tem atividade de enrijecimento dos microtúbulos e esses se tornam distorcidos a 32° C, especula-se que o

enrijecimento dos microtúbulos resultante da regulação positiva do EF1a pelo p53 seja uma das causas de apoptose. (KATO *et al.*, 1997, KATO, 1999).

Em fibroblastos 3T3 de camundongos, o aumento de expressão do EF1A confere suscetibilidade a apoptose induzida por deprivação de soro. Além disso, a supressão da expressão do EF1A por RNA EF1A antissense previne a indução de apoptose por deprivação de soro. Baseado nesses achados está sendo sugerido que quando o EF1A é abundante as células estão em modo proapoptótico e contrariamente, quando o EF1A é escasso, as células estão em modo antiapoptótico.(DUTTAROY *et al.*, 1998).

O mRNA do EF1A é altamente expresso em tumores humanos de pâncreas, cólon, mama, pulmão e estômago (GRANT *et al.*, 1992). Ele também é altamente expresso em adenocarcinoma mamário em ratos. A distribuição intracelular da F-actina e do EF1A são grandemente correlacionadas, o que é uma evidência de que as estruturas citoesqueléticas contendo actina são importantes para auxiliar a motilidade celular requerida para a metástase (EDMONDS *et al.*, 1996). O EF1A tem alta expressão em carcinoma gastrointestinal, em adenoma e carcinoma do coloretal (MATHUR *et al.*,1998).

Em adição, a alta expressão do mRNA do EF1a tem sido correlacionada com aumento do potencial metastático em adenocarcinoma mamário, provavelmente, devido à sua interação com a actina citoesquelética, um efector de metástases (EDMONDS *et al.*,1996).

Tem sido demonstrado que a proteína do eEF1A é altamente expressa em células metastáticas da mama comparada às não metastáticas, e que eEF1A de células metastáticas tem a afinidade reduzida para a F-actina. Após estímulo com fatores de crescimento, ocorre um aumento paralelo da quantidade da F-actina e do eEF1A associados com o citoesqueleto. Dessa forma, tem sido proposto que a fraca associação do eEF1A com a actina pode estar relacionada ao processo metastático devido a uma alteração da organização da actina citoesquelética e tradução diferencial de mRNA associados com o citoesqueleto (EDMONDS *et al.*, 1996; LAMBERTI *et al.*, 2004).

A função do EF1A no processo de oncogênese tem sido investigada em carcinoma de próstata. Nestas células tumorais, um oncogene dominante foi identificado: o PTI-1 (prostate tumor-inducing gene 1). O PTI-1 foi originalmente

identificado por rápida expressão de clonagem e *differential display* (SHEN *et al.*,1995). A expressão do PTI-1 também ocorre em linhagens celulares de carcinoma de mama, cólon e pulmão, mas não em células normais (LAMBERTI *et al.*,2004).

Está sendo proposto que o PTI-1 representa uma nova classe de oncogenes cuja capacidade de transformar provavelmente afeta de alguma forma mecanismos que incluem: (I) infidelidade da tradução protéica, resultando em síntese de polipeptídeos mutantes devido a perda da função de correção de leitura durante a elongação da cadeia peptídica (ZAO-ZHONG *et al.*,1998), (II) sua associação com o citoesqueleto, bem como alterações no último, (III) interferência em uma ou em várias vias diferentes de transdução de sinal por meio de suas propriedades como G-proteína (GOPALKRISHNAM *et al.*, 1999).

O cDNA do PTI-1 consiste em 2123 bp contendo uma região não traduzida de 630 bp (5' UTR). A região 5' UTR apresenta 85% de identidade ao RNA ribossomal 23S de *Mycoplasma hyopneumoniae* e uma região com 1494 pb que tem 97,7% de identidade ao fator de elongação 1 A. O cDNA do PTI-1 potencialmente codifica uma proteína de 398 aminoácidos , a qual parece ser uma forma truncada e mutada da eEF1A (MANSILLA *et al.*, 2005).

Quando comparada à seqüência do eEF1A, a proteína do PTI-1 sofre deleção dos primeiros 67 aminoácidos da região de fusão, junção da extremidade N-terminal e introdução de três novos aminoácidos (M1, Q2, S3). O gene do PTI-1 também apresenta 6 mutações de ponto em aminoácidos específicos, ocorrendo a substituição de um aminoácido de carga positiva para um hidrofóbico (Arg / Gly) e também de um contendo grupo hidroxil para outro com grupo não-hidroxil (Ser / Gly) (MANSILLA *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2006).

EF1A contém três domínios ligantes de GTP cujas seqüências são: Gly-x-x-x-x-Gly-Lys, Asp-x-Pro-Gly e Asn-Lys-x-Asp. O PTI-1 perde o primeiro domínio ligante de GTP, Gly-x-x-x-x-Gly-Lys, mas retêm os outros dois num contexto idêntico ao do EF1A. Das 6 mutações que ocorrem no PTI-1, três ocorrem no domínio de ligação do tRNA (SHEN *et al.*,1995). Essas modificações podem antecipar o impacto observado na funcionalidade e em estruturas dimensionais dessa proteína mutante EF1A (GOPALKRISHNAN, 1999).

A presença inesperada de um elemento como o micoplasma na sequência de cDNA do PTI-1 reforça a questão se esse gene é um produto de contaminação cruzada ou se essa sequência é parte do genoma humano. Porém fragmentos específicos da região 5' UTR do PTI-1 são amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de DNA genômico humano proveniente de linhagens de células tumorais e de sangue de pacientes (SUN *et al.*, 1997; OHNAMI *et al.*, 1999). A localização cromossômica específica do gene do PTI-1 ainda permanece elusiva (MANSILLA *et al.*, 2005).

Estudos mostram que a função do PTI-1 está relacionada com a oncogenicidade (SU *et al.*, 1998). O EF1A está fisicamente associado e pode ser um elemento importante na formação do fuso mitótico (MARCHESI & NGO 1993), possivelmente, desempenhando uma função no controle do crescimento, na divisão celular e potencialmente aumentando a sobrevivência. O PTI-1 pode interromper a função do EF1A levando a fenótipos transformados para células cancerosas.

Existe uma dificuldade em afirmar com precisão quais as consequências da forma truncada, com perda de 67 aminoácidos, observada no PTI-1 comparada ao EF1A. Baseado nas informações de estrutura cristalográfica e mudanças conformacionais induzidas no EF-Tu, em procariotos e arqueobactérias, após ligação de GTP e tRNA aminoacil (BOURNE *et al.*, 1990; 1991) é certo que a perda de um domínio ligante de GTP no PTI-1 irá comprometer sua integridade estrutural e funcional. Para estimar suas propriedades oncogênicas, uma tentativa é postular que o PTI-1 provoca um aumento na taxa de síntese de polipeptídeos mutantes devido a perda de sua habilidade para mediar a correta incorporação de aminoácidos durante a elongação da cadeia peptídica. Esta perda de habilidade de correção de leitura também denominada de “infidelidade traducional”, poderia explicar as propriedades observadas no PTI-1 baseado na sua sequência de homologia ao EF1A. Porém, não há informações disponíveis a respeito de alterações na atividade das versões truncada dos fatores de elongação traducionais quanto a eficiência ou acurácia da síntese de peptídeos (GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999).

Alguns estudos assumem que uma molécula como o PTI-1 conserva no mínimo algum nível de atividade e é capaz de, mesmo com muito pouca

eficiência, mediar a incorporação de aminoácidos nas proteínas. Todavia, devido à forma truncada do domínio de ligação de GTP e o comprometimento da habilidade de correção de leitura, pode ocorrer um aumento no nível de aminoácidos incorporados de forma incorreta (SONG *et al.*, 1989; TAPIO & KURLAND, 1996). E mesmo se somente uma pequena fração dessa proteína mutante está ativa ou tem algum efeito na célula, a produção de um nível suficiente da forma mutante de uma molécula regulatória chave como a p53 pode ser adequada para disparar uma cadeia de eventos levando à transformação celular (ROSENDALWALD, 1996; GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999)

Outra possibilidade considerada é a de que o PTI-1 pode agir de uma maneira dominante subvertendo função do EF1A normal de um modo mais drástico. Isto pode resultar na síntese de grandes quantidades de vários polipeptídeos mutantes que em adição poderiam comprometer a sobrevivência celular, ou ainda contribuir para a formação de (uma inicialmente) uma pequena população de células altamente transformadas. Em adição ao N-terminal truncado, três das seis mutações nos aminoácidos do PTI-1 ocorrem no domínio de ligação do tRNA (SHEN *et al.*, 1995).

A oncogenicidade do PTI-1 foi demonstrada em recentes experimentos. Fenótipos de câncer em ratos nude atímicos induzidos por injeção de células da linhagem CREF-Trans 6 transfectadas com o gene PTI-1, foram revertidos por expressão antisense do PTI-1 (SU *et al.*, 1998). Interessantemente, somente o gene completo foi capaz de reverter o fenótipo oncogênico (MANSILLA *et al.*, 2005).

A proteína do PTI-1 assemelha-se muito à do fator de alongação 1 A (eEF1A), a qual, além do seu proeminente papel na tradução, parece estar envolvida em numerosos outros processos como sinal de transdução (YANG, BOSS, 1994), organização do citoesqueleto (SHIINA *et al.*, 1994; KURASAWA *et al.*, 1996), apoptose (RUEST *et al.*, 2002), câncer (GRANT *et al.*, 1992; EDMONDS *et al.*, 1996), infecção viral (CIMARELLI & LUBAN 1999) e diabetes (REYNET, KAHN, 2001) e assim pertencer à família de proteínas “moonlighting” (EJIRI, 2002).

Baseado na similaridade entre a proteína do PTI-1 e eEF1A, tem-se sugerido que o mecanismo de oncogenicidade do PTI-1 pode ser devido à

interrupção ou à interferência com propriedades de tradução do fator de alongação. Deste modo, o PTI-1 pode afetar a eficiência na correção resultando em infidelidade traducional, promovendo alterações na organização do citoesqueleto ou alteração nas vias de sinal de transdução (GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999).

No entanto, até o momento nenhum estudo demonstrou a presença da proteína do PTI-1 *in vivo*, embora todas as explicações da oncogenicidade do PTI-1 estejam baseadas nas características da proteína (GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999; MANSILLA *et al.*, 2005).

A Transcrição Reversa (RT)

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

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

RT PCR Semi - quantitativa:

O uso seqüencial da transcrição reversa e da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) tem permitido avanços nas pesquisas em biologia molecular, por apresentar uma alta sensibilidade e ser uma técnica rápida para o estudo da expressão gênica (FAVRE *et al.*, 1997; DUMOULIN *et al.*, 2000).

A RT-PCR semi-quantitativa, desenvolvida por Chelly e colaboradores (1998), é uma metodologia rápida e eficaz para estimar quantidades relativas da expressão gênica em populações de RNAs mensageiros, utilizando-se um gene constitutivo como controle interno da reação para normalizar os níveis de expressão do gene de interesse e, outrossim, para monitorar a extensão da degradação nas amostras de RNA, caracterizando a qualidade do mesmo (FAVRE *et al.*, 1997; DUMOULIN *et al.*, 2000; REGITANO & COUTINHO, 2001).

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

Genes constitutivos como a $\beta 2$ microglobulina, as actinas e o gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) têm sido utilizados como controles internos para prover resultados semi-quantitativos (SIEBERT & LARRICK, 1992; IGAZ *et al.*, 1998).

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

REFERÊNCIAS GERAIS:

AALTOMAA, S., LIPPONEN, P. , ESKELINEN, M. , ALA-OPAS, M. , KOSMA, V.M., Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. **Prostate** 39: 8-15, 1999.

ABRAHAMSSON, P.A., LILJA, H., OESTERLING, J.E., Molecular forms of serum prostate-specific antigen. The clinical value of percent free prostate-specific antigen. **Urol. Clin. North. Am.** 24(2):353-65. [Review] 1997.

ALBRIGHT, L. C.; ELLES, R., Progress in prostate cancer. **Nat. Genet.** 9: 336-338, 1995.

ALLEN, N.E; SAUVAGET, C.; RODDAM, A.W.; APPLEBY, P.; NAGANO, J.; SUZUKI, G.; KEY, T. J.; KOYAMA,K. A prospective study of diet and prostate cancer in Japanese men. **Cancer Cause and Control.** 15:911-920, 2004.

AN, G., MEKA, C.S., BRIGHT, S.P., VELTRI, R.W., Human prostate-specific transglutaminase gene: promoter cloning, tissue-specific expression, and down-regulation in metastatic prostate cancer. **Urol.** 54 (6):1105-11, Dec 1999.

ARAGÃO, A. J., O exame físico na avaliação do câncer de próstata. In:WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V., **Guia Prático de Urologia.** São Paulo: Segmento 2003, 437-438, 2003.

BAFFA, R., REISS, K., EL-GABRY, E.A., SEDOR, J., MOY, M.L., SHUPP-BYRNE, D., STRUP, S.E., HAUCK, W.W., BASERGA, R., GOMELLA, L.G., Low serum insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a significant association with prostate cancer. **Tech. Urol.** 6(3):236-9, Sep 2000.

BILLAUT-MULOT, O.; FERNANDES-GOMES, R.; LOYENSM., AND QUASSI A.; Trypanosoma cruzi elongation factor 1 alpha: nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. **Gene** 174:19-24. 1996

BOSTWICK, D.G., Prostatic intraepithelial neoplasia. In: KAISARY, A.V.; MURPHY, G.P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. **Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment**. London: Martin Dunitz,. 3: 35-50, 1999.

BOURNE, H.R., SANDERS, D.A., McCORMICK, F., The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nat.** 348: 125-132, 1990

BOURNE, H.R., SANDERS, D.A., McCORMICK, F., The GTPase superfamily: a conserved structure and molecular mechanism. **Nat.** 349: 117-127, 1991.

BOURAS, T., FRAUMAN, A.G., Expression of the prostate cancer metastasis suppressor gene KAI1 in primary prostate cancers: a biphasic relationship with tumour grade. **J. Pathol.** 188(4):382-388, 1999.

CARTER, B.S.; BEATY, T.H.; STEINBERG, G.D.; CHILDS, B.; WALSH, P.C. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. **Proc. Natl. Acad. Science.** 89: 3367-3371, 1992.

CATALONA, W.J.; SMITH, D.S. Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical retropubic prostatectomy for prostate cancer intermediate-term results. **J. Urol.** 160: 2428-2434, 1998.

CATALONA, W.J.; ANTENOR, J. A. et al., Screening for prostate cancer in high risk population. **J. Urol.** 168: 1980-1984, 2002.

CAVALLIUS, J., RATTAN, S.I., CLARK, B.C.F., Changes in activity and amount of active elongation factor 1 alpha in aging and immortal human fibroblast cultures. **Exp. Gerontol.** 21: 149-157, 1986.

CHAN, J.M.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E. L., What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. **Sem. Cancer Biol.** 8: 263-273, 1998.

CHANG, G.T.G.; STEENBEEK, M.; SCHIPPERS, E.; BLOK, L. J.; VAN WEERDEN, W. M.; VAN ALEWIJK, D.C.J.G.; EUSSEN, B.H.J.; VAN STEENBRUGGE, G.J.; BRINKMANN, A.O., A novel gene on human chromosome 2p24 is differentially expressed between androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. **Eur. J. Cancer.**37: 2129-2134, 2001.

CIMARELLI, A.; LUBAN, J. Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. **J. Virol.** 73: 5388-5401, 1999.

CONDELLIS, J.; Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. **Trends Biochem. Sci.** 20: 169-170, 1995.

COFFEY, D. S., The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T.A.; VAUGHAN, E. D. **Campbell's Urol.** 1: 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 221-251, 1992.

COFFEY, D.S., Prostate cancer: an overview of an increasing dilemma. **Cancer** (Suppl.). 71: 880-886, 1993.

COLE, K.A., CHUAQUI, R.F., KATZ, K., PACK, S., ZHUANG, Z., COLE, C.E., LYNE, J.C., LINEHAN, W.M., LIOTTA, L.A., EMMERT-BUCK, M.R., cDNA sequencing and analysis of POV1 (PB39): a novel gene up-regulated in prostate cancer. **Genomics.** 51(2): 282-7, 1998.

CUSSENOT, O.; VALERI, A., Heterogeneity in genetic susceptibility to prostate cancer. **Eur. J. Int. Medicine** 12: 11-16, 2001.

DAMIÃO, R.; CARRERETE, F. B, Por que a próstata cresce? In: WROCLAWSKI, E.R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia**. São Paulo: Segmento, 4, 261-263, 2003.

DATTOLI, M., WALLNER, K., TRUE, L., SORACE, R., KOVAL, J., CASH, J, ACOSTA, R, BISWAS, M., BINDER, M., SULLIVAN, B, LASTARRIA, E., KIRWAN N, STEIN D. Prognostic role of serum prostatic acid phosphatase for 103Pd-based radiation for prostatic carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1;45(4):853-6, Nov 1999.

DEVER, T.E., GLYNIAS, M.J., MERRICK, W.C., GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. **Proc Natl Acad Sci USA** 84: 1814–1818, 1987.

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

DORKIN, T.J., ROBINSON, M.C., MARSH, C., NEAL, D.E., LEUNG, H.Y., AFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. **J Pathol**;189(4):564, Dec 1999.

DRACHENBERG, D.E., ELGAMAL, A.A., ROWBOTHAM. R, PETERSON M, MURPHY G.P., Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. **Prostate** 41(2):127-33, 1999

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

DUQUE, J.L., LOUGHLIN, K.R., ADAM, R.M., KANTOFF, P.W., ZURAKOWSKI, I. D., FREEMAN, M.R. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. **Urol.** 54(3):523-7, 1999.

DUNSMUIR, W.D., EDWARDS, S.M., LAKHANI, S.R., YOUNG, M., CORBISHLEY C, KIRBY, R.S., DEARNALEY, D.P., DOWE, A., ARDERN-JONES, A., KELLY, J, EELES, R.A., Allelic imbalance in familial and sporadic prostate cancer at the putative human prostate cancer susceptibility locus, HPC1. CRC/BPG UK Familial Prostate Cancer Study Collaborators. Cancer Research Campaign/British Prostate Group. **Br J Cancer** 78(11):1430-3, 1998

DUTTARROY, A.; BOURBEAU, D. ; WANG, X-L ; AND WANG, E, Apoptose rate can be accelerate or decelerated by overexpression of reduction of the reduction of the level of elongation factor 1 alpha. **Exp. Cell Res.** 238:168-176. 1998

EDMONDS, B.T., WYCKOFF, J., YEUNG, Y.G., WANG, Y., STANLEY, E.R, JONES, J., SEGALL, J., CONDEELIS, J Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. **J. Cell. Sci.** 109: 2705–2714., 1996.

EJIRI, S-L., Moolighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein RI-associated nuclear localization. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 66 (2006).

ERHAT, E.A., **Elementos de anatomia humana** . 8 ed. Ateneu. São Paulo, SP., 272, 1992.

FEARON, E.R., VOGELSTEIN, B., A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.** 61:759–67. 1990

FAVRE, N.; BORDMANN, G.; RUDIN, W,. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. **J. Immunol. Meth.** 204, 57-66. 1997.

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

GANGWANI, L., MIKRUT, M., GALCHEVA-GARGOVA, Z., DAVIS, R.J., Interaction of ZPR1 with translation elongation factor-1alpha in proliferating cells. **J. Cell. Biol.** 143: 1471–1484, 1998.

GATTÁS, N. Genética e câncer de próstata. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R.; ORTIZ, V. **Guia Prático de Urologia**. São Paulo: Segmento, 2003. 128, 433-434.

GE, K., MINHAS, F., DUHADAWAY, J., MAO, NC,, WILSON D, BUCCAFUSCA R, SAKAMURO D, NELSON P, MALKOWICZ SB, TOMASZEWSKI J, PRENDERGAST GC. Loss of heterozygosity and tumor suppressor activity of Bin1 in prostate carcinoma. **Int. J. Cancer** 86(2):155-6, 2000.

GIBBS, M., CHAKRABARTI, L., STANFORD, J.L., GOODE, EL., KOLB. S, SCHUSTER,E.F., BUCKLEY VA, SHOOK M, HOOD L, JARVIK GP, OSTRANDER E.A., Analysis of chromosome 1q42.2-43 in 152 families with high risk of prostate cancer. **Am. J. Hum. Genet.** 64(4):1087-95, Apr 1999.

GIMBA, E. R. P.; BARCINSKI, M. A. Molecular aspects of prostate câncer: implications for future directions. **International Braz. J. Urol.** 29:. 401-411, 2003.

GHOSSEIN, R,.A.; SCHER, H., I, GERALD, W.L.; KELLY, W. K.; CURLEY, T.; AMERSTERDAM. A; ZHANG, Z. F; ROSAI,J., Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic carcinoma: clinical implications. **J. Clin. Oncol.** .13:.1195-1200, 1995.

GIOVANNUCCI, E. Epidemiologic characteristics of prostate cancer. **Cancer**. 75: 1766-1777, 1995.

GLEASON, D.F., Histologic grading of prostate cancer: a perspective. **Hum. Pathol.** 23:273–279, 1992

GOPALKRISHNAM, R.V., SU, Z.Z., GOLDSTEIN, N.I., FISHER, P.B.) Translation infidelity and human cancer: role of PTI-1 oncogene. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 31: 151–162 -1999

GOSLING, J.A., HARRIS, P.F., HUMPHERSON, J.R., WHITMORE, I., WILLIAN, P.L.T., Pelve e períneo. In **Anatomia Humana**, ed. 5, Manole, São Paulo, SP, 516-517, 1992.

GRANT , A. G., FLOMEN, R. M., TIZARD , M. L., GRANT, D.A. Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma lambda gt 11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1 alpha in tumor cells. **Int. J. Cancer** 50: 740-745, 1992.

GREENLEE, R.T., MURRAY, T., BOLDEN, S., WINGO, P.A., Cancer statistics, 2000. **CA. Cancer J. Clin.** 50:7–33, 2000.

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

HENRIG, F.L., Epidemiologia de história natural. In: WROCLAWSKI, E. R.; BENDHACK, D. A.; DAMIÃO, R. ORTIZ,V. **Guia prático de Urologia**. São Paulo: Segmento, 2003:423-424.

IGAZ, P.; FEJÉR, G.; SZALAI, C.; TÓTH, S.; FALUS, A. Development of competitive mRNA PCR for the quantification of Interleukin-6-responsive junB oncogene expression. **Bio. Techniques** 24: 854-860, 1998.

INNIS, M., A.; GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SKINSHY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press,; 3-12, 1990.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de Próstata**. Disponível em <http://www.inca.org.br/câncer/tipos/próstata>. Acesso em 02 jun. 2006. <http://www.inca.gov.br/estimativas/2006/conteúdo>.

ISAACS, J.T., Molecular markers for prostate cancer metastasis: developing diagnostic methods for predicting the aggressiveness of prostate cancer. **Am. J. Path.** 150: 1511-1521, 1997.

JAFFE, J.M., MALKOWICZ, S.B., WALKER., A.H., MACBRIDE, S., PESCHEL, R., TOMASZEWSKI, J., VAN ARSDALEN, K., WEIN, A.J., REBBECK, T.R. Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors. **Cancer Res.** 15;60(6):1626-30, Mar 2000.

JARMULOWICZ, M. R., The role of pathology in biopsy, diagnosis and management of prostate cancer. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. **Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment**. London: Martin Dunitz, 1999.

KAHNS, S., LUND, A., KRISTENSEN, P., C. R., KNUDSEN, B.F., CLARK, J .,CAVALLIUS, MERRICK, W.C., The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: cloning of DNA and characterization of the protein. **Nucleic Acids Res.** 26:1884-1890, 1998.

KARAN, D.; LIN, M. F.; JOHNSON, S. L.; BATRA, S. K. Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. **Int. J. Cancer**. 103: 285-293, 2003.

KATO, M.V.; SATO, H.; NAGAYOSHE, M. AND IKAWA, Y. Upregulation of the elongation factor 1 alpha gene by p53 in association with death of an erythroleukemic cell line. **Blood** 90: 1373-1378, 1997

KATO, M.V., The mechanism of death of an erythroleukemic cell line by p53: involvement of the microtubule and mitochondria. **Leuk. Lymphoma** 33:181-186. 1999

KAZIRO, Y., ITOH, H., KOZASA, T., NAKAFUKU, M., SATOH, T., Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. **Annu. Rev. Biochem.** 60: 349–400, 1991.

KNUDSEN S.M., FRAYDENBERG J, CLARK. B.F.C., LEFFERS, H., Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterization of a cDNA encoding a novel eEF1A and cell transformation 447 variant of human elongation-factor 1 alpha. **Eur. J. Biochem.** 215: 549–554. 1993.

KOIVISTO, P.A., RANTALA, I. Amplification of the androgen receptor gene is associated with P53 mutation in hormone-refractory recurrent prostate cancer. **J. Pathol.** 187(2):237-41, 1999.

KOMIYA, A., SUZUKI, H, UEDA, T., AIDA, S., ITO, N., SHIRAISHI, T., YATANI, R., EMI, M., YASUDA, K., SHIMAZAKI, J., ITO, H., PRLTS gene alterations in human prostate cancer. **Jpn. J. Cancer Res.** 88(4):389-93, 1997.

KRUMHOLTZ, J.D.; CARVALHAL, G.F. et al., "Prostate specific antigen cutoff of antigen cutoff OF 2.6 ng/ml for prostate cancer Screening is associated with favorable pathologic tumor features". **Urol.** 60:(3): 469-474, 2002.

LAMBERTI, A.; CARAGLIA, M.; LONGO, O.; MARRA, M.; ABBRUZZES, A.; AND ARCARI, . The Translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transducional and apoptosis: Review artigo. **Amino Acids** 26: 443-448- 2004.

LANGE, E.M, CHEN, H., BRIERLEY, K., PERRONE, E.E., BOCK, C.H., GILLANDERS, E., RAY, M.E., COONEY, K.A., Linkage analysis of 153 prostate cancer families over a 30-cM region containing the putative susceptibility locus HPCX. **Clin. Cancer Res.** 5 (12):4013-20, Dec 1999.

LI, P. E.; NELSON, P.S., Prostate câncer genomics. **Curr. Urol. Rep.** 2: 70-78, 2001.

LUND, A.;. KNUDSEN, S.M.; VISSING, H.; CLARK, B.F.C, TOMMERUP, N., Assigment of human factor elongation factor 1A. A genes : EEF1A elongation maps to chromosome 6q14, and EEFF 1A to 20q13.3. **Genomics** 36: 359-361, 1996.

LUNN, R.M., BELL, D.A., MOHLER, J.L., TAYLOR, J.A., Prostate cancer risk and polymorphism in 17 hydroxylase (CYP17) and steroid reductase (SRD5A2). **Carcinogenesis**. 20:1727-31 1999.

LUO, W., TAPOLSKY, M., EARLEY, K., WOOD, C.G., WILSON, D.R., LOGOTHETIS, C.J., LIN, S.H., Tumor-suppressive activity of CD66a in prostate cancer. **Cancer Gene Ther.** 6(4):313-21, 1999.

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

MACRI, E., LODA, M., Role of p27 in prostate carcinogenesis. [Review] **Cancer Metastasis Rev.**17(4):337-44. 1998-99

MAGKLARA, A., SCORILAS, A., STEPHAN, C., KRISTIANSEN, G.O., HAUPTMANN, S., JUNG, K., DIAMANDIS, E.P., Decreased concentrations of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in malignant versus nonmalignant prostatic tissue. **Urol.** 156(3):527-32, Sep 2000.

MANSILLA, F.; HANSEN, L.L.; JACKOBSEN, H.; KJELDGAARD, O.N.; CLARK, B.F.C.; KUNDSSEN, S.M., Deconstructing Pti-1: PTI-1 is a truncated, but not mutated, form of translation elongation factor 1A1, eEF1A1. **Biochem. Biof. Acta** :1727:116-124, 2005.

MARCHESI, V.T.& NGO. In vitro assembly of multi protein complexes containing alpha, beta e gamma tubulin, heat shock protein HSP70, and elongation factor 1 A. **Proc. Natl. Academic.** 90: 3020-3032

MARK, H.F., FELDMAN, D., DAS, S., KYE, H., MARK, S., SUN, C.L., SAMY, M., Fluorescence in situ hybridization study of HER-2/neu oncogene amplification in prostate cancer. **Exp. Mol. Pathol.** 66(2):170-8, 1999

MATHURS, S.; CLEARY, K.R.; INAMDAR, N.; KIM, Y.H, STECK, P.; AND FRAZIER, M.L. Overexpression of elongation factor 1 gama protein in colorectal carcinoma. **Cancer.**82, 816-821,1998.

MATSUURA, H., HAYASHI, N., KAWAMURA, J., SHIRAISHI, T., YATANI, R., Prognostic significance of Ki-67 expression in advanced prostate cancers in relation to disease progression after androgen ablation. **Eur Urol.** 37(2):212-7, Feb 2000

MEARES, E.M., JR. Prostatitis and related disorders. In WALSH, P.C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. **Campbell's Urol.** vol 1.6 ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, 807-822, 1992.

MERRILL, R.M., STEPHENSON, R.A., Trends in mortality rates in patents with prostate cancer during the era of prostate specif antigen screening. **J Urol**; 163:503-10. 2000.

MIRANDA, P. S.; CÔRTEZ, M.J., M E M WERNECK; CHAVES, P. C.; SANTAROSA, R.C., Practice of precocious diagnosis for prostate cancer among professors of the school of medicine, Minas Gerais Federal University- Brazil, **Rev. Assoc. Med. Bras.** 50: (3), 2004.

MIKOLAJCZYK, S. D.; SONG. Y.; WONG, J. R.; MATSON, R. S.; RITTENHOUSE, H, G. Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? **Clin. Biochem.** 37:519-528, 2004.

MULLIS, K.; FALOONA, F., Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. **Meth. Enzimol.** 55:335-350, 1987.

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

OHNAMI, S. ; MATSUMOTO, N.; NAKANO, M.; AOKI, K.; NAGASAKI, K.; SUGIMURA, T.; TERADA, M.; YOSIDA, T., Identification of genes showing differential expression in antisense K-ras-transduced pancreatic câncer cells with suppressed tumorigenicity. **Cancer Res.** 59, 1999.

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

PERINCHERY, G., SASAKI, M., ANGAN, A., KUMAR, V., CARROLL, P., DAHIYA, R., Deletion of Y-chromosome specific genes in human prostate cancer. **J Urol.** 163(4):1339-42, 2000.

PORKKA, K. P.; VISAKORPI, T., Molecular mechanisms of prostate cancer. **Eur. Urol.** 1-9, 2004.

PROCHOWNIK, E.V., EAGLE GROVE, L., DEUBLER, D., ZHU, X.L., STEPHENSON, R.A., ROHR, L.R., YIN, X., BROTHMAN, A.R., Commonly occurring loss and mutation of the MXI1 gene in prostate cancer. **Genes Chrom. Cancer.** 22(4):295-304, 1998.

REBBECK, T.R., JAFFE, J.M., WALKER, A.H., WEIN, A.J., MALKOWICZ, S.B., Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. **J. Natl. Cancer Inst.** 90(16):1225-9, 1998.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal.** 1ª ed. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 215, 2001.

REITER, R.E., GU, Z., WATABE, T., THOMAS, G., SZIGETI, K., DAVIS, E., WAHL, M., NISITANI, S., YAMASHIRO, J., L.E., BEAU, M.M., LODA, M., WITTE, O.N., Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95(4):1735-40 1998.

REYNET, C.; KAHN, C.R., Unbalanced expression of different subunits of elongation factor 1 in diabetic skeletal muscle. **Proc. Natl. Sci. USA.** 98: 3422-3427, 2001.

RIFFENBURG, R.; AMLING, C. L., Use of early PSA velocity to predict eventual abnormal PSA values in man at risk for prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases.** 6: 39-44, 2003.

RIIS, B., RATTAN, S.I.S., CLARK, B.F.C., MERRICK, W.C., Eukaryotic protein elongation factors. **TIBS** 15: 420–424, 1990.

ROSENDALWALD, I. B., Deregulation of protein synthesis as a mechanism of neoplastic transformation. **Bioessays** 18: 243-250, 1996.

RUEST, L-B.; MARCOTTE, R.; WANG, E., Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3 mediated apoptosis. **J. Biol. Chem.** 277: 5418-5425 -2002

RUITER, E.; VAN, D.E., KAA, C.; MILLER, G.; RUITER, D., DEBRUYNE, F.; SCHALKEN, J., Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. **Endocrine Rev.** 20: 22-45, 1999.

SAKAI, H., TSURUSAKI, T., KANDA, S., KOJI, T., XUAN, J.W., SAITO, Y., Prognostic significance of beta-microseminoprotein mRNA expression in prostate cancer. **Prostate** 38(4):278-84, Mar 1999

SEMENTCHENKO, V.I., SCHWEINFEST, C.W., PAPAS, T.S., WATSON, D.K., ETS2 function is required to maintain the transformed state of human prostate cancer cells. **Oncog.** 17(22):2883-8, 1998

SHEN, R., SU, Z.Z., C.A., OLSSON, FISHER, P.B., Identificação of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression e cloning and differential RNA display. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:6778-6782, 1995.

SHIINA, N.; GOTOH, Y.; KUBOMURA, N.; IWAMATSU, A.; NISHIDA, E., Microtubule severing by elongation factor 1 alpha. **Science** 266:282-285, 1994

SIEBERT, P.D.; LARRICK, J.W., Competitive PCR. **Nat.** 359:557-558, 1992.

SMART, C.R., The results of prostate carcinoma screening in the U.S. as reflected in the surveillance, epidemiology and end results program. **Cancer** 80:1835-44, 1997.

SMITH, D. R., **Urologia Geral.** 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 505, 1979.

SMITH, J.R., FREIJE, D., CARPTEN, J.D., GRONBERG, H., XU, J., ISAACS, S.D., BROWNSTEIN, M.J., BOVA, G.S., GUO, H., BUJNOVSZKY, P., NUSSKERN, D.R., DAMBER, J.E., BERGH, A., EMANUELSSON, M., KALLIONIEMI, O.P., WALKER-DANIELS, J., BAILEY-WILSON, J.E., BEATY, T.H., MEYERS, D.A., WALSH, P.C., COLLINS, F.S., TRENT, J.M., ISAACS, W.B., Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. **Science**. Nov 22;274(5291):1301, 1998.

SONENBERG, N., Translation factors as effectors of cell growth and tumorigenesis. **Current Opinion Cell Biol.** 5: 955–960, 1993.

SONG, J.M., PICOLOGLOU, S., GRANT, C.M., FIROOZAN, M., TUIITE, M.F., LIEBMAN, S., Elongation factor EF-1 alpha gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** 9: 4571-4575, 1989.

SROUGI, M., Câncer da Próstata. In: SCHOR, N.; SROUGI, M. **Nefrologia, Urologia, Clínica**. São Paulo: Sarvier. 40: 225-240, 1998.

SROUGI, M., **Próstata**: isso é com você. São Paulo: Publifolha, 125, 2003.

SROUGI, M.; CURY, J., Hiperplasia Benigna da Próstata. In: SCHOR, N., SROUGI, M. **Nefrologia, Urologia, Clínica**. São Paulo: Sarvier. 6: 501-506 , 1998.

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 Urol.** vol. 2. 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 29: 1159-1221, 1992.

STEENLAND, K.; RODRIGUEZ, C.; MONDUL, A.; CALLE, E. E.; THUN, M., Prostate cancer incidence and survival and relation to education (United States). **Cancer Causes and Control**. 15:939-945, 2004.

SU, Z., GOLDSTEIN, N. I., AND FISHER, P. B., Antisense inhibition of the *PTI-1* oncogene reverses cancer phenotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95: 1764–1769, 1998.

SUGIMURA, T., Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. **Science** (WashingtonDC), 258: 603–607, 1992.

SUN, Y., LIN, J., KATZ, A. E., AND FISHER, P. B., Human prostatic carcinoma oncogene *PTI-1* is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples. **Cancer Res.**, 57: 18–23, 1997.

TAPIO, S.; KURLAND, C.G, Mutant EF-Tur increases of missense error in vitro. **Mol. Gen. Genet.**205:186-188, 1986.

TATSUKA, M., MITSUI, H., WADA, M., NAGATA, A, NOJIMA, H., OKAYAMA, H. Elongation factor-1 alpha gene determines susceptibility to transformation. **Nat.** 359: 333-336, 1992.

THOMAS, R., TRUE, L.D., BASSUK, J.A., LANGE. P.H., VESSELLA, R.L., Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. **Clin Cancer Res** 6(3):1140-9, Mar 2000

THOMPSON, T.C., Metastasis-related genes in prostate cancer: the role of caveolin-1. [Review] **Cancer Metastasis Rev.** 17(4):439-42, 1998-99.

VAARALA, M.H., PORVARI, K., KYLLONEN, A., LUKKARINEN, O., VIHKO, P., The TMPRSS2 gene encoding transmembrane serine protease is overexpressed in a majority of prostate cancer patients: Detection of mutated TMPRSS2 form in a case of aggressive disease. **Int J Cancer.** 94(5):705-710, 2001.

VAN DE GRAFF, K. M. Sistema genital masculino. In: **Anatomia humana.** 6^a ed. São Paulo: Manole. 20:697-723, 2003.

VERES, G.; GIBBS, R. A.; SCHERER, S. E.; CASKEY, C., T. The molecular basis of the sparse for mouse mutation. **Science**. 237:415-417. 1987.

VOELLER, H.J., TRUICA, C.I., GELMANN, E.P., Beta-catenin mutations in human prostate cancer. **Cancer Res.**; 58(12):2520-3, 1998.

WALSH. P. C., Benign Prostatic Hyperplasia. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. **Campbell's Urol.** vol. 1. 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company.25:1007-1027, 1992.

WALSH, P. C.; WORTHINGTON, J. F. **Doenças de Próstata**: um guia para os homens e para as mulheres que os amam. São Paulo: Martins Fontes. 240, 1998.

WANG, S.I., PARSONS, R., ITTMANN, M., Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. **Clin Cancer Res** 4:811-5, 1998

WHITE, T. J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction. **Technical Focus**. 5:185-188,1989.

XIÃO, H., NEUVEUT, C.;BENKIRAME,M.;JEANG,K.T, Interation of tne second coding exon of Tat with human EF1 δ delimiates a mechamism for HIV-I mediated shutoff of host mRNA translation. **Biochem. Biophys. Res. Commum** 244:384-389, 1998.

YANG, W.; BOSS, W.F., Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by the protein activator PIK-A49. Activation requires phosphorylation of PIK-A49. **J. Biol. Chem**. 269: 3852-3857,1994.

YU, L.;WU, G.; WANG,L.; ZHANG,G., Transient reduction of PTI-1 Expression by short interfering RNAs inhibits the growth of humam prostate canxer cell lines. **J. Exp. Med**. 209:141-148. 2006

ZAO-ZHONG, S., GOLDSTEIN, N.I., FISHER, P.B., Antisense inhibition of the PTI-1 oncogene reverses cancer phenotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 1764–1769, 1998.

ZHANG, M., MAGIT, D., SAGER, R., Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94(11):5673-8, 1997

Capítulo único

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES EF1A E PTI-1 NO CÂNCER DE PRÓSTATA

Resumo

O câncer de próstata tem se tornado um sério problema de saúde pública para homens. É o segundo mais diagnosticado e mesmo com a melhoria das técnicas de detecção clínicas, histopatológicas e químicas, ainda são registrados altos índices de óbitos em consequência do diagnóstico tardio ou ineficiente da doença. Encontrar marcadores mais específicos para aumentar as chances de cura e detecção da doença tem sido o objetivo de numerosas pesquisas. Vários componentes envolvidos na síntese de proteínas em eucariotos têm sido relacionados com a transformação oncogênica. A alteração dos níveis de expressão do mRNA de fator 1 de alongação (EF1A) tem sido relacionada à diversos tipos de câncer. Uma forma mutada desse gene, o PTI-1, tem sido associada ao câncer de próstata (CaP). Esse gene tem uma região exclusiva de homologia ao *Mycoplasma hyopneumoniae*, 5'UTR, e uma região de fusão, a qual contém uma sequência inicial de homologia ao *M. hyopneumoniae* e outra homóloga ao EF1A. Ele foi originalmente descrito na linhagem celular LNCaP e sua expressão tem sido detectada em células tumorais e ausente em células normais. Nossa meta foi analisar o comportamento da expressão desses dois genes em amostras de sangue e tecido de pacientes com CaP, hiperplasia prostática benigna (HPB) e em sangue de homens jovens (CN) saudáveis. Verificamos que a expressão do EF1A tanto em sangue como em tecido foi mais alta em pacientes do grupo CaP. Os grupos foram subdivididos em intervalos de expressão $\leq 0,5$, $0,5 \geq 1$, $1 \leq 1,5$ e $>1,5$ para melhor caracterização. Em tecido os níveis relativos de expressão do EF1A foram estatisticamente correlacionados ao estadiamento TNM e apresentaram uma razão de chances de 4,6 vezes mais probabilidade de desenvolver CaP. No grupo HPB, 90% dos pacientes apresentou níveis de expressão inferiores a um. Em sangue periférico observamos que no intervalo de expressão menor que 0,5 há uma chance de o paciente ser portador de CaP de 3 vezes e no intervalo maior do que 1,5 essa chance é de 10,56 vezes. As regiões 5'UTR e de fusão, do gene PTI-1 embora, detectadas em maior proporção no grupo CaP foram detectadas em HPB e CN. A presença do PTI-1 associada aos níveis de expressão do EF1A nos levam a hipotetizar que esse gene modula a expressão do EF1A nos estágios iniciais e finais da doença fazendo com que haja um aumento dos níveis de EF1A para garantir a proliferação celular e avanço do tumor confinado ao órgão; quando ocorre a passagem para a fase de metástase o PTI-1 parece exercer um controle nos níveis do EF1A no sentido de diminuir os mesmos evitando que as células na circulação sanguínea venham a sofrer apoptose.

ABSTRACT:

Prostate cancer (PCa) has become a serious problem of public health for men. It is the second most diagnosed cancer, and even with the improvement of the clinical, histopathology and chemical techniques of detection, there is still a high mortality rate in consequence of the delayed or inefficient diagnosis of the illness. Finding more specific markers to increase the possibilities of cure and detection of the illness has been the objective of numerous researches. Several components involved on the protein synthesis in eukaryotes have been related with the oncogenic transformation. The alteration on the mRNA levels of the elongation factor 1 (EF1A) expression has been related to different types of cancer. A mutated form of this gene, PTI-1, has been associated with prostate cancer. This gene has an exclusive region of homology to *Mycoplasma hyopneumoniae*, 5'UTR, and a region of fusion, which contains sequences of homology to the *M. hyopneumoniae* and to the EF1A. It was originally described in the cellular lineage LNCaP, and its expression has been detected in tumoral cells while corresponding normal cells were negative. Our goal was to analyze the behavior of the expression of those two genes in samples of blood and of patients with PCa, benign prostatic hiperplasia (BPH) and in blood of young healthy men (control). We observed that the expression of EF1A in blood as in tissue was higher in patients of the PCa group. The groups had been subdivided in expression intervals ≤ 0.5 , $0.5 \geq 1.0$, $1.0 \leq 1.5$ and >1.5 for better characterization. The relative levels of expression of the EF1A in tissue were estatistically correlated with the TNM staging, and presented a risk 4.6 times higher of PCa occurrence. In the BPH group, 90% of the patients presented lower mRNA expression levels. In the peripheral blood, we have observed for the interval lower than 0.5 that the probability of being PCa is 3 times higher than in the 1.5 interval, with a risk 10.56 times higher. The 5' UTR and the fusion regions, although observed in high rates in the PCa group, it has also been observed in BPH and the control groups. Its presence associated with EF1A expression level leads us to hipothetize that this gene modulates the EF1A expression in initial and final periods of the illness, determining an increase of the EF1A levels in order to guarantee the cellular proliferation and advance of the tumor confined to the organ; when the passage to metastasis phase occurs, PTI-1 seems to exert a control on the levels of EF1A as to reduce them, thus preventing the cells in the circulation come to suffer apoptosis.

Key words: Prostate cancer, expression gene, EF1A and PTI-1 genes.

1-Introdução

A incidência e a mortalidade por câncer de próstata continuam aumentando e esta patologia pode tornar-se um dos principais problemas de saúde pública para homens. Mesmo com o progresso do diagnóstico e terapias locais, questões fundamentais permanecem em relação à etiologia, prevenção e tratamento do câncer de próstata (YU *et al.*, 2006). Apesar do rápido desenvolvimento da biologia molecular e celular, nosso conhecimento a respeito do adenocarcinoma prostático permanece significativamente menor em relação a outras neoplasias (WARE, 1994; YU *et al.*, 2006).

Além do câncer de próstata a hiperplasia prostática benigna também é uma patologia de grande relevância na clínica urológica, pois embora elas apresentem prognósticos distintos, sua diferenciação é muitas vezes difícil e conseqüentemente, são feitas biópsias desnecessárias (STAMEY, 2004).

A busca por novos marcadores moleculares para o diagnóstico do câncer de próstata também se deve ao fato de que o uso do PSA, marcador sérico mais amplamente utilizado, vem apresentando limitações (STAMEY *et al.*, 2004; MIKOLAJCZYK *et al.*, 2004), gerando, em muitos casos, resultados falso negativos e falso positivos (GIMBA & BARCINSKI, 2003).

Encontrar marcadores mais sensíveis ou genes com potencial oncogênico irá prover-nos de ferramentas mais eficientes no diagnóstico e cura do câncer de próstata (YU *et al.*, 2006).

Modificações na maquinaria traducional das células, incluindo mudanças nos fatores de iniciação e alongação de eucariotos, resultam em suscetibilidade à transformação e aquisição de propriedades transformantes e oncogênicas em células alvo específicas (RIIS *et al.*, 1990; SONENBERG, 1993).

Mudanças na expressão da eEF1A, uma proteína de transferência nucleotídica que liga GTP e tRNA aminoacil, e resulta no seu pareamento códon dependente no sitio A do ribossomo, conferem suscetibilidade a carcinogênese (TATSUKA *et al.*, 1992).

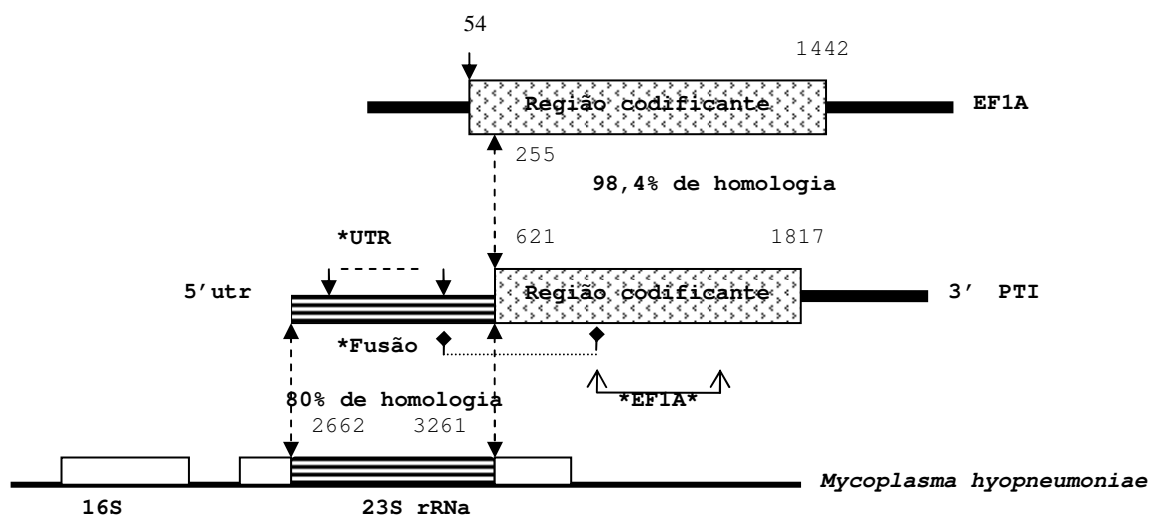
A função do EF1A no processo de oncogênese tem sido investigada em carcinoma de próstata. Nestas células tumorais, um oncogene dominante, o PTI-1

(prostate tumor- inducing gene 1), foi identificado por rápida expressão de clonagem e *differential display* (SHEN *et al.*, 1995). A expressão do PTI-1 também ocorre em linhagens celulares de carcinoma de mama, cólon e pulmão, mas não em células normais (LAMBERTI *et al.*, 2004).

O cDNA do PTI-1 consiste em 2123bp contendo uma região não traduzida de 630 bp (5' UTR). A região 5' UTR apresenta 85% de identidade ao RNA ribossomal 23S de *Mycoplasma hyopneumoniae* e uma região com 1494 pb que tem 97,7% de identidade ao fator de alongação 1 A (figura 1). O cDNA do PTI-1 potencialmente codifica uma proteína de 398 aminoácidos, a qual parece ser uma forma truncada e mutada da eEF1A (MANSILLA *et al.*, 2005).

Baseado na similaridade entre a proteína do PTI-1 e eEF1A, tem sido sugerido que o mecanismo de oncogenicidade do PTI-1 pode ser devido à interrupção ou à interferência com propriedades de tradução do fator de alongação. Deste modo, o PTI-1 pode afetar a eficiência na correção resultando em infidelidade tradicional, promovendo alterações na organização do citoesqueleto ou alteração nas vias de sinal de transdução (GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999).

Estudos com análises, independentes dos genes EF1A e PTI-1 associados ao câncer de próstata têm sido relatados geralmente em culturas celulares (SHEN *et al.*, 1995, GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999) e em amostras populacionais extremamente reduzidas de câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna e indivíduos normais (SUN *et al.*, 1997, GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999, MANSILLA *et al.*, 2005), sendo que nenhum fez uma avaliação clínica deste marcador. Portanto, este é o primeiro trabalho que investiga a aplicação clínica de ambos os genes e busca um melhor entendimento dos mecanismos que envolvem os mesmos no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata.



*Iniciadores	Sense	Anti-sense
5' UTR	5'cactatccacaagtccat 3'	5'cagacaccgatagtagaactag 3'
Fusão	5'ctgagaggtccctgtaatcat 3'	5'ggatggacttgtggatagtg 3'
EF1A	5'atgattacagggacctctcaggc 3'	5'tgaaccaaggcatgttagctc 3'

(E) KGSFKYAWVLDKLKAERERGITIDISLWKFETSKYYVTIIDAPGHRDFIK
(P) MQSERGITIDISLWKFETSKYYVTIIDAPGHRDFIQ
(E) NMITGTSQADCAVLIVAAGVGEFEAGISKNGQTREHALLAYTLGVKQLIV
(P) NMITGTSQADCAVLIVAAGVGEFEAGISKNGQTREHALLAYTLGVKQLIV
(E) GVNKMDSTEPPYSQKRYEEIAKEVSTYIKKIGYNPDTVAFVPISGWNGDN
(P) GVNKMDSTEPPYSQKRYEEIVKEVSTYIKKIGYNPDTVAFVPISGWNGDN
(E) MLEPSANMPWFKGWKVTTRKDGNASGTTLLEALDCILPPTTRPTDKPLRLPL
(P) MLEPSANMPWFKGWKVTTRKDGNASGTTLLEALDCILPPTTRPTDKPLGLPL
(E) QDVYKIGGIGTVPVGRVETGVLKPGMVVTFAPVNVTTTEVKSVEMHHEALS
(P) QDVYKIGGIGTVPVGRVETGVLKPGMVVTFGPVNVTTTEVKSVEMHHEALG
(E) EALPGDNVGFNVKNVSVKDVRRGNVAGDSKNDPPMEAAGFTAQVILNHP
(P) EALPGDNVGFNVKNVSVKDVRRGNVAGDSKNDPPMEAAGFPAQVILNHP
(E) GQISAGYAPVLDCHTAHIACKFAELKEKIDRRSGKKLEDGPKFLKSGDAA
(P) GQISAGYAPVLDCHTAHIACKFAELKEKIDRRSGKKLEDGPKFLKSGDAA
(E) IVDMPGKPMCVESFSDYPPLGRFAVRDMRQTVAVGVKAVDKKAAGAGK
(P) IVDMPGKPMCVESFSDYPPLGCFAVRDMRQTVAVGVKAVDKKAAGAGK
(E) VTKSAOKAOKAK

Figura 1- Caracterização estrutural do gene PTI-1 em relação ao EF1A e ao *Mycoplasma hyopneumoniae*. * Iniciadores para regiões 5' UTR, Fusão e EF1A. Alinhamento das seqüências da região codificante do EF1A (E) em relação ao PTI-1 (P) (acesso no NCBI: gi|62897653|dbj|BAD96766.1 e gi|927065|gb|AAC09385.1, respectivamente). A figura mostra a seqüência modificada do PTI-1 em relação à seqüência do EF1A. Os 6 aminoácidos originais da proteína eEF1A, que sofrem modificações no PTI-1, estão representados em vermelho.

2-Objetivos:

Este trabalho teve por objetivo principal detectar e quantificar os produtos de transcrição dos genes PTI-1 e EF1A em amostras de peças cirúrgicas e sangue periférico de pacientes com CaP, HPB e CN (controle negativo) para reavaliar o comportamento desses genes, no desenvolvimento do CaP, na população.

Os objetivos secundários foram: estimar o valor da aplicação clínica da RT-PCR para detecção do CaP usando os genes EF1A e PTI-1 e buscar um melhor entendimento dos mecanismos que envolvem esses no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata por meio da análise de modelos da estrutura protéica dos mesmos.

3-Material e Métodos:

3.1-Obtenção de amostras:

As amostras de sangue e tecido foram coletadas pela equipe médica do Setor de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período de 2002 a 2005. Os pacientes assinaram Termo de Consentimento (anexo I), concordando em participar da pesquisa, anteriormente aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia.

A caracterização e separação dos grupos foram feitas de acordo com dados clínicos e histopatológicos dos pacientes apresentados na tabela 1. Foram selecionadas amostras de tecido de 70 pacientes com idade média de 66,8 anos $\pm$ 9,9 ($\pm$ desvio padrão), as quais foram divididas em 2 grupos: adenocarcinoma prostático (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB), de acordo com caracterização clínica e histopatológica. O grupo CaP foi formado por 40 amostras, das quais 36 foram obtidas de prostatectomia radical (RAD) e 4 de ressecção transuretral (RTU). As amostras do grupo de HPB provieram de 2 RAD, 22 de RTU, 4 de punção e 2 de prostatectomia aberta. O tecido foi coletado em solução fisiológica e posteriormente armazenado em freezer a -80°C até o momento da extração.

As amostras de sangue foram coletadas de 163 pacientes com idade média de 67.64 ± 8.54 , destes 86 diagnosticados com HPB (65 punções, 20 RTU, 1 RAD) e 77 com CaP (35 punções, 6 RTU e 36 RAD). Foram analisadas 126 amostras de sangue de homens jovens, submetidos a exames de rotina e sem diagnóstico de doença prostática, com idade média de $23,3 \pm 4,5$ ($\pm$ desvio padrão), considerados controles negativos. Todas as amostras de sangue foram coletadas em tubo VacutainerTM e armazenadas a 4°C .

Tabela 2- Caracterização dos pacientes, pertencentes aos grupos CaP, HPB, selecionados para o estudo, em amostras de sangue periférico e tecido, quanto ao número amostral, idade e nível médio de PSA.

	sangue		tecido	
N	CaP 77	HPB 86	CaP 40	HPB 30
Idade (anos)	67.1 ± 9.3	67.71 ± 8.15	65 ± 9.1	69.12 ± 10.52
PSA (ng/ml)	17.74 ± 21.1	10.63 ± 9.93	12.95 ± 14.9	7.04 ± 5.15

3.2-Extração das amostras de RNA

As amostras de tecido e sangue foram processadas de acordo com o protocolo de Chomczynski (1987) com algumas modificações (anexo II). O RNA isolado foi tratado com DNase I de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen) e quantificado espectrofotometricamente com leituras a 260/280nm e qualificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo.

3.3- RT-PCR semiquantitativo e qualitativo.

3.3.1-Transcrição Reversa (RT) e amplificação do gene da beta 2 microglobulina.

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 2 µg de RNA total, 20 U de inibidor de Rnase (Invitrogen), 40 U de *Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (MMLV-RT), tampão 1x da MMLV-RT, 200 µmolar de dNTPs (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), 0,5 µg de iniciador hexâmero e água DEPC, totalizando um volume final de 20µl.

A reação foi incubada a 37°C por 1 hora e aquecida a 95°C por 5 minutos. O produto da transcrição reversa (cDNA) foi amplificado por PCR, utilizando-se um par de iniciadores para o gene constitutivo da beta 2 microglobulina (B2M- F: 5'agc aga gaa tgg aaa gtc aaa 3' e B2M- R: 5' tgt tga tgt tgg ata aga gaa 3') (BUSSEMARKERS *et al.*, 1999).

Esse gene foi escolhido para a normalização das reações de amplificação e para validar e qualificar o RNA de cada amostra.

3.3.2-Desenho dos iniciadores:

Para análise dos genes *PTI-1* e *EF1A* foram desenhados iniciadores por meio do software *Primer Design*, versão 2.0 e do software *Oligo Tech*, versão 1.0. Os iniciadores foram desenhados em regiões homólogas aos genes *EF1A* e *PTI-1* (figura 1).

O primeiro par de iniciadores corresponde à região 5'UTR do gene, local que apresenta 80% de homologia ao RNA ribossômico 23S do *Mycoplasma hyopneumoniae*, produzindo um fragmento de 360 pb.

O segundo par de iniciadores flanqueia uma região de fusão entre fragmentos 3' e 5' dos genes *PTI-1* e *EF1A* respectivamente e amplifica um fragmento de 312 pb.

O terceiro par de iniciadores amplifica um fragmento de 362 pb localizado numa região do *EF1A* que apresenta 97,07% de homologia ao gene *PTI-1*.

3.3.3-RT-PCR semi-quantitativa para a região EF1A

No processo de otimização, reações de PCR foram feitas juntas e separadamente para cada gene, para verificar o nível de competição entre os iniciadores da *B2M* e do *EF1A*. Também foram feitas amplificações dos genes com 20, 25, 28, 30 e 32 ciclos para determinação do número ideal de ciclos da PCR, com o intuito de garantir que a amplificação estivesse em fase exponencial.

As reações de PCR para análise dessa região foram feitas em duplicata com 2µL de cDNA, 1U de Taq DNA polimerase Platinum, tampão da Taq 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs e 10 pmoles de cada iniciador EF1A (figura 1). Elas foram incubadas a 95° C por 5 minutos e por 28 ciclos a 94° C 40 s, 61° C 40 s, 72° C 40 s, e uma extensão final a 72° C por 10 minutos.

O gene da *B2M* foi amplificado, separadamente, para cada amostra. A condição de reação foi: 2µL de cDNA, 1U de Taq DNA polimerase Platinum,

tampão da Taq 1X, 2,0 mM de $MgCl_2$, 200 μM de dNTPs e 5 pmoles de cada iniciador. As reações foram incubadas a 95°C por 5 minutos e por 28 ciclos a 94°C 40s, 58°C 40s, 72°C 40s, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de cada reação foram misturados na mesma proporção (v/v) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. O fragmento da B2M foi usado como normalizador das reações.

3.3.4-RT-PCR qualitativo para a região 5' UTR :

A PCR para detecção do mRNA da região UTR foi feita a partir de 4 μL de cDNA, 1U de Taq DNA polimerase Platinum, tampão da Taq 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de dNTPs, 6 pmoles de cada iniciador 5' UTR (figura 1) e água DEPC totalizando um volume de 20 μL . A reação foi incubada a 95°C por 5 minutos, após essa desnaturação inicial, seguiram-se 45 ciclos de amplificação, sendo: 20 a 94°C por 30s, 50°C 50s e 72°C 40s e mais 25 ciclos a 94°C por 30s, 53°C 50s e 72°C 40s; ao final foi acrescentada uma extensão de 72°C por 10 minutos. Durante o processo de otimização, várias condições de reação foram testadas e esse padrão foi o único a detectar a presença do fragmento de 360 pb.

Os produtos de reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose, 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado em aparelho VDS Pharmacia Biothec.

3.3.5-RT-PCR semi-Nested para a região de Fusão:

No processo de otimização para detectar a presença da região de fusão foram testadas várias condições de reação e combinações de iniciadores, sendo que a melhor maneira de amplificar essa região foi verificada com o uso da PCR semi-Nested.

A reação de PCR foi feita com 4 μL de cDNA, 1U de Taq DNA polimerase Platinum, tampão da Taq 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de dNTPs e 10 pmoles

de cada iniciador. A reação foi incubada a 95° C por 5 minutos e por 30 ciclos a 94° C 40s, 58° C 50s, 72° C 50s, e uma extensão final a 72° C por 10 minutos. A amplificação dessa região foi obtida pela combinação do iniciador direto 5'UTR com o iniciador reverso da fusão e produziu um fragmento de aproximadamente 650pb.

Para a segunda reação de PCR foram utilizados 4µL do produto da primeira reação de PCR, 1U de Taq DNA polimerase Platinum, tampão da Taq 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 10 pmoles de cada iniciador da fusão (figura 1) e água DEPC totalizando um volume de 20 µL. A reação foi incubada a 95° C por 5 minutos e por 35 ciclos a 94° C 40 s, 59° C 50 s, 72° C 50 s, e uma extensão final a 72° C por 10 minutos. Os produtos foram visualizados por meio do aparelho VDS PharmaciaBiothec após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

3.4-Análise do gene PTI-1 em relação ao gene DD3

Os dados obtidos para o gene PTI-1 em sangue periférico foram comparados aos dados do gene DD3 anteriormente obtidos por Neves e colaboradores (2006). Essa análise foi feita para verificar a sensibilidade, especificidade e acúrcia desses marcadores na detecção do CaP.

3.5-LIS-SSCP (Low Ionic Strenght Single Stranded Conformation Polymorphism)

A técnica de conformação polimórfica de fita simples (SSCP) foi usada para detectar possíveis polimorfismos no gene EF1A. Os produtos de amplificação do gene EF1A foram desnaturados a 95° C por 5 minutos em tampão de LIS (sacarose 10%, azul de bromofenol 0.01% e xilenocianol 0.01%) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrimamida-bis 30% (49:1) em tampão TBE, à 200V, por 18h. O gel foi corado com nitrato de prata para possibilitar a visualização dos resultados.

3.6-Leitura densitométrica para estimativa dos níveis relativos de expressão gênica

Os produtos amplificados do gene EF1A, e do gene da B2M foram analisados e quantificados de acordo com a leitura da intensidade do sinal, em gel de agarose, usando programa ImageMaster VDS software versão 2.0 (Amersham Biosciences). A normalização das leituras de densitometria foi feita usando a proporção mRNA do alvo:mRNA B2M e dessa forma os níveis relativos de expressão do gene EF1A foram obtidos para cada amostra.

De acordo com os níveis de expressão obtidos, os pacientes foram divididos em quatro intervalos de classe ($\leq 0,5$, $0,5 \geq 1$, $1 \geq 1,5$ e $> 1,5$), para uma análise mais detalhada da expressão do EF1A em relação ao CaP nos grupos estudados.

3.7-Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para verificar a normalidade dos dados. A abundância relativa dos níveis de mRNA no sangue e tecido entre os pacientes HPB e CaP e o grupo controle foi verificada por regressão linear. O teste de correlação de Pearson foi aplicado para comparar os dados dos exames laboratoriais clínicos aos dados moleculares, para essa análise os grupos estudados foram reduzidos em virtude dos dados disponíveis nos prontuários dos pacientes. A razão de chances foi estimada para se determinar a chance de um indivíduo portador dos genes EF1A e PTI-1 vir a desenvolver câncer de próstata. O teste de Crivo foi usado para estimar a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo, o valor preditivo negativo e a acurácia do gene EF1A. Todos os testes foram realizados por meio do programa BioEstat v 3.0.

3.8-Bioinformática

Para verificar o a estrutura conformacional das proteínas do eEF1A e do PTI-1 foi feito o alinhamento das seqüências (acesso no NCBI: gi|62897653|dbj|BAD96766.1 e gi|927065|gb|AAC09385.1, respectivamente), utilizando-se o programa HHpred (SÖDING *et al.*, 2005). O modelo foi criado utilizando-se o programa Modeller 7v7 (SALI *et al.*,1995). Devido ao extenso gap no final do alinhamento foi feito um refinamento de “loop” utilizando-se o programa ModLoop (FISER *et al.*, 2000). A estrutura do EF1A (gi|9256877|pdb|1F60|A) foi usada como parâmetro para análise do modelo predito.

4-Resultados

4.1-Análise dos níveis de expressão do gene EF1A

O padrão de amplificação, por meio de RT-PCR semi-quantitativa, obtido para os genes *B2M* e EF1A nos grupos em estudo, CN, HPB e CaP estão representados na figura 2.

Os níveis de abundância relativa do gene EF1A: B2M nas amostras analisadas de sangue ($n= 291$, $p<0,01$) e tecido ($n= 70$, $p< 0,01$) seguem o padrão de distribuição normal.

A análise da expressão dos níveis relativos da mRNA do EF1A: mRNA B2M, por meio do teste de correlação de Pearson, apresentou diferença significativa entre os grupos analisados, tanto em sangue periférico, com $p= 0,001$, quanto em tecido, $p= 0,0514$. Houve uma tendência de maior expressão do gene EF1A nos indivíduos do grupo CaP. As figuras 3A e 3B mostram a distribuição dos pacientes de acordo com os grupos analisados, em sangue periférico e tecido respectivamente, em relação aos níveis médios de abundância relativa de mRNA do EF1A.

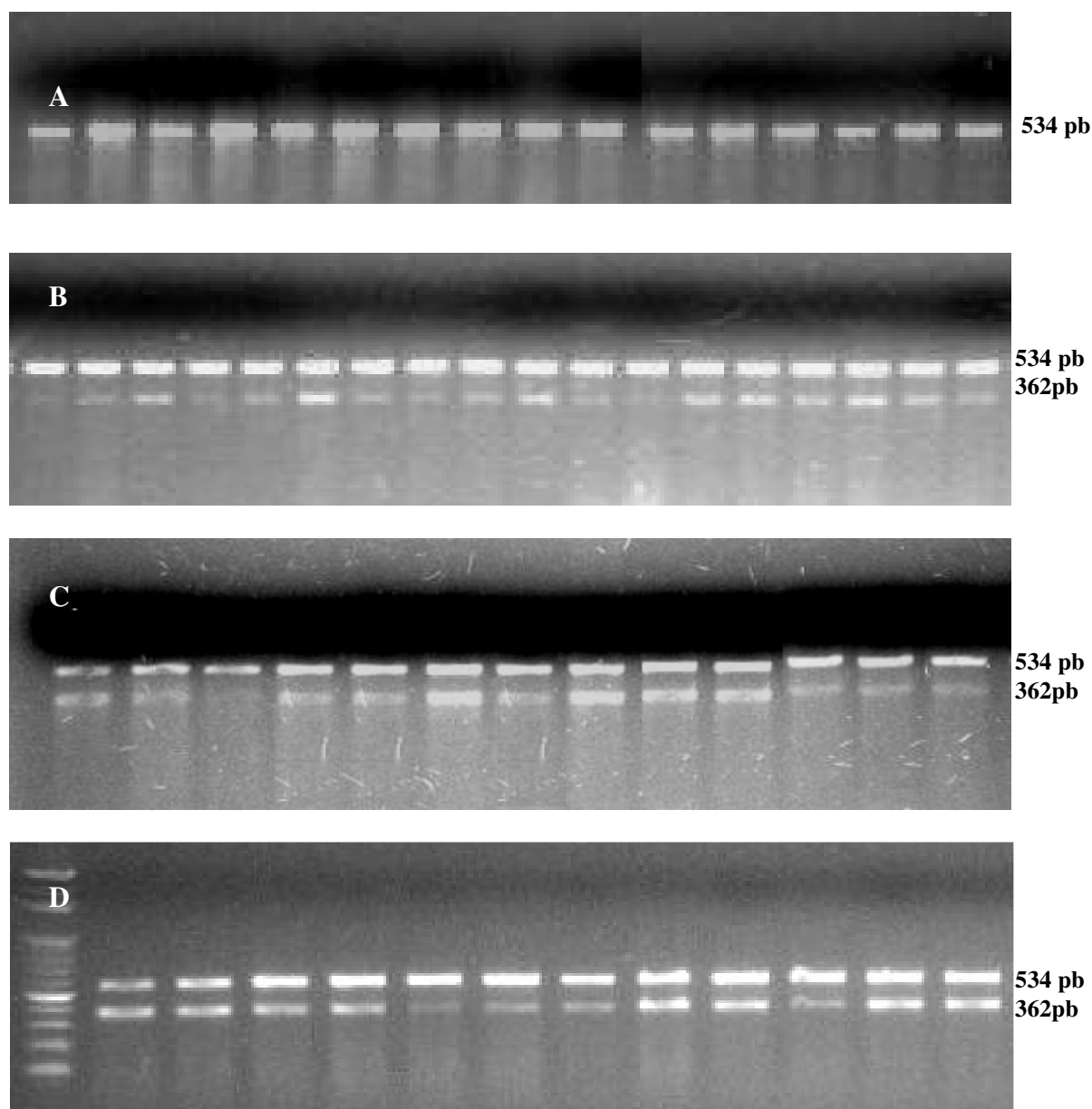


Figura 2- Géis representativos da RT-PCR semi-quantitativa dos genes B2M e EF1A em sangue periférico, de acordo com o grupo estudado. (A)-Padrão de amplificação do fragmento de 534 pb da B2M; (B): Linha 1- Padrão de amplificação do fragmento de 534 pb da B2M e Linha 2- Padrão de amplificação do fragmento de 362 pb do *EF1A* obtido para o grupo CN (C): Linha 1- Padrão de amplificação do fragmento de 534 pb da B2M e Linha 2- Padrão de amplificação do fragmento de 362 pb do *EF1A* obtido para o grupo HPB e (D): Linha 1-Padrão de amplificação do fragmento de 534 pb da B2M e Linha 2- Padrão de amplificação do fragmento de 362 pb do *EF1A* obtido para o grupo CaP.

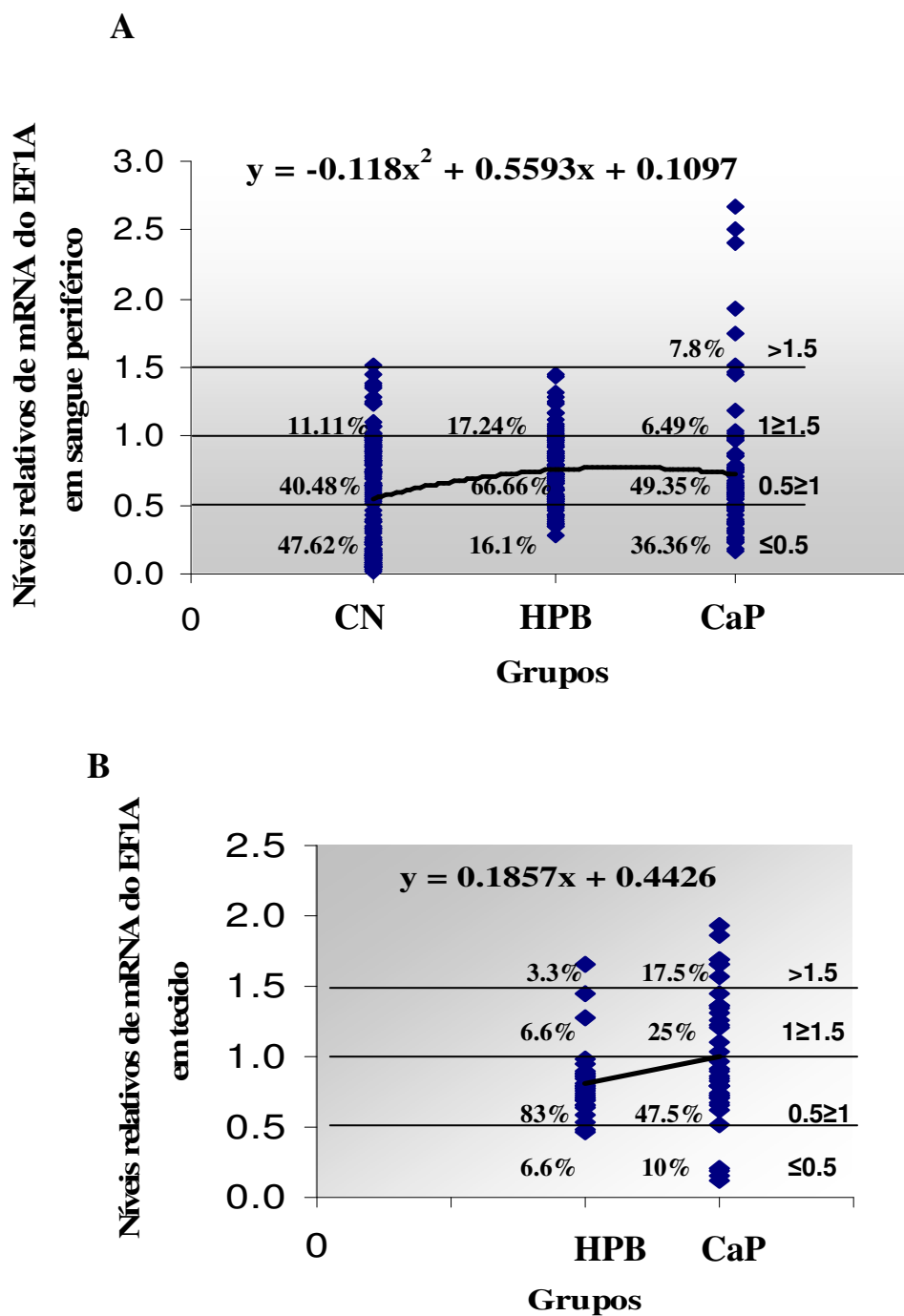


Figura 3-Níveis médios da expressão relativa de transcritos do gene EF1A em (A) sangue periférico de pacientes com CaP, HPB e do controle negativo (CN) e (B) tecido de pacientes com CaP e HPB, obtidos por RT-PCR semi-quantitativa, curva de tendência e porcentagens observadas por classe de expressão.

Os pacientes foram distribuídos em intervalos de expressão para o gene do EF1A de acordo com o grupo de estudo (tabela 3). Em sangue periférico notamos que há uma concentração na distribuição dos pacientes, dentro de cada grupo, nos intervalos de expressão menores que 1, aproximadamente 83% a 87% dos indivíduos tem níveis relativos de expressão nesse intervalo. A análise independente dos grupos mostra que o grupo HPB, sangue e tecido, tem aproximadamente 67% e 83% das suas amostras concentradas no intervalo de $0,5 \geq 1$ e praticamente as mesmas proporções nos intervalos de $\leq 0,5$ e $1 \geq 1,5$. No grupo CaP observamos uma pequena proporção de indivíduos com média de expressão dentro do intervalo $> 1,5$, porém em relação aos demais grupos é uma proporção estatisticamente significativa, $p < 0,05$, segundo o teste binominal para diferença entre duas proporções, capaz de diferenciar os portadores de câncer dentro desse intervalo de expressão do gene EF1A.

Tabela 3- Distribuição dos pacientes, CaP, HPB e CN, por intervalo médio de expressão relativa do gene EF1A em sangue periférico e tecido, com número de pacientes e respectivas porcentagens observadas para cada intervalo de classe.

	sangue			tecido	
	CaP (%)	HPB(%)	CN(%)	CaP(%)	HPB(%)
$\leq 0,5$	28(36.36)	14(16.1)	60(47.62)	4(10)	2(6.66)
$0,5 \geq 1$	38(49.35)	58(66.66)	51(40.48)	19(47.5)	25(83.34)
$1 \geq 1,5$	5(6.49)	15(17.24)	14(11.11)	10(25.0)	2(6.66)
$> 1,5$	6(7.8)	0	1(0.79)	7(17.5)	1(3.33)
total	77	87	126	40	30

Para cada intervalo de expressão do gene EF1A foi calculada a razão de chances (do inglês Odds ratio (OR)) dentre os grupos, para estimar a chance de um indivíduo pertencente ao respectivo intervalo possuir a patologia em questão, CaP ou HPB. Os resultados foram: Sangue -Intervalo $\leq 0,5$: CaP x HPB, OR = 2,97 ($p = 0,005$, IC_{95%} 1,42-6,22); CaP x CN, OR = 0,62 ($p = 0,15$, IC_{95%} 0,3-1,12); HPB x CN, OR = 0,2 ($p = 0,0005$, IC_{95%} 0,10-0,41) – Intervalo $0,5 \geq 1$: CaP x HPB, OR = 0,48 ($p = 0,03$, IC_{95%} 0,2-0,9); CaP x CN, OR = 1,3 ($p = 0,3$, IC_{95%} 0,70-2,4); HPB x CN, OR = 2,7 ($p = 0,0007$, IC_{95%} 1,5-4,9) – Intervalo $1 \geq 1,5$: CaP x HPB, OR = 0,3

($p = 0,06$, $IC_{95\%}$ 0,11-0,96); CaP x CN, OR = 0,5 ($p = 0,3$, $IC_{95\%}$ 0,19-1,6); HPB x CN, OR = 1,6 ($p = 0,2$, $IC_{95\%}$ 0,7-3,6) - Intervalo $>1,5$: CaP x CN, OR = 10,56 ($p = 0,02$, $IC_{95\%}$ 1,2-89,5) e tecido - Intervalo $\leq 0,5$: CaP x HPB, OR = 1,5 ($p = 0,9$, $IC_{95\%}$ 0,2-9,11); - Intervalo $0,5 \geq 1$: CaP x HPB, OR = 0,18 ($p = 0,0048$, $IC_{95\%}$ 0,05-0,5); - Intervalo $1 \geq 1,5$: CaP x HPB, OR = 4,6 ($p = 0,09$, $IC_{95\%}$ 0,939-23,18); - Intervalo $>1,5$: CaP x HPB, OR = 6,15 ($p = 0,14$, $IC_{95\%}$ 0,7-53,01).

Em sangue periférico observamos uma chance, praticamente, 3 vezes maior de um indivíduo possuir CaP em relação ao HPB para níveis relativos de expressão do EF1A menores ou iguais a 0,5 e uma chance de 10,56 vezes maior em relação ao CN para níveis de expressão maiores do que 1,5. No intervalo de expressão de 0,5 a 1 a chance de um indivíduo vir a ser HPB é 2,7 vezes maior em comparação ao CN. No tecido, a maior chance do indivíduo desenvolver CaP em relação ao HPB é de 4,6 vezes para níveis de expressão situados entre 1 e 1,50.

O teste de correlação de Pearson foi aplicado para comparar a abundância relativa dos níveis de mRNA aos dados clínicos, porém para essa análise, em virtude da disponibilidade dos resultados existentes nos prontuários dos pacientes os grupos foram reduzidos. Foram analisadas 102 amostras de sangue, sendo 69 pacientes do grupo de HPB e 33 do grupo CaP, e 43 amostras de tecido, das quais 23 HPB e 20 CaP.

O coeficiente da correlação de Pearson obtido para os níveis relativos de mRNA do EF1A1 nos pacientes do grupo CaP, apresentou correlação somente com o estadiamento TNM em tecido, $p = 0,011$ (figura 4 A); no sangue obtivemos associação positiva somente entre os níveis relativos de mRNA do EF1A1 e idade, $p = 0,000$, a associação com PSA sérico, estadiamento TNM (figura 4 B), score de Gleason e dados de DD3 não foi estatisticamente significativa. A comparação feita entre o diagnóstico clínico, histologia e PSA sérico, expressão do gene DD3, idade e os níveis relativos de mRNA do EF1A no grupo de pacientes HPB também não foi significativa.

De acordo com os dados da figura 4 A, em tecido, níveis relativos de expressão do EF1A mais elevados parecem estar associados à progressão do câncer de próstata.

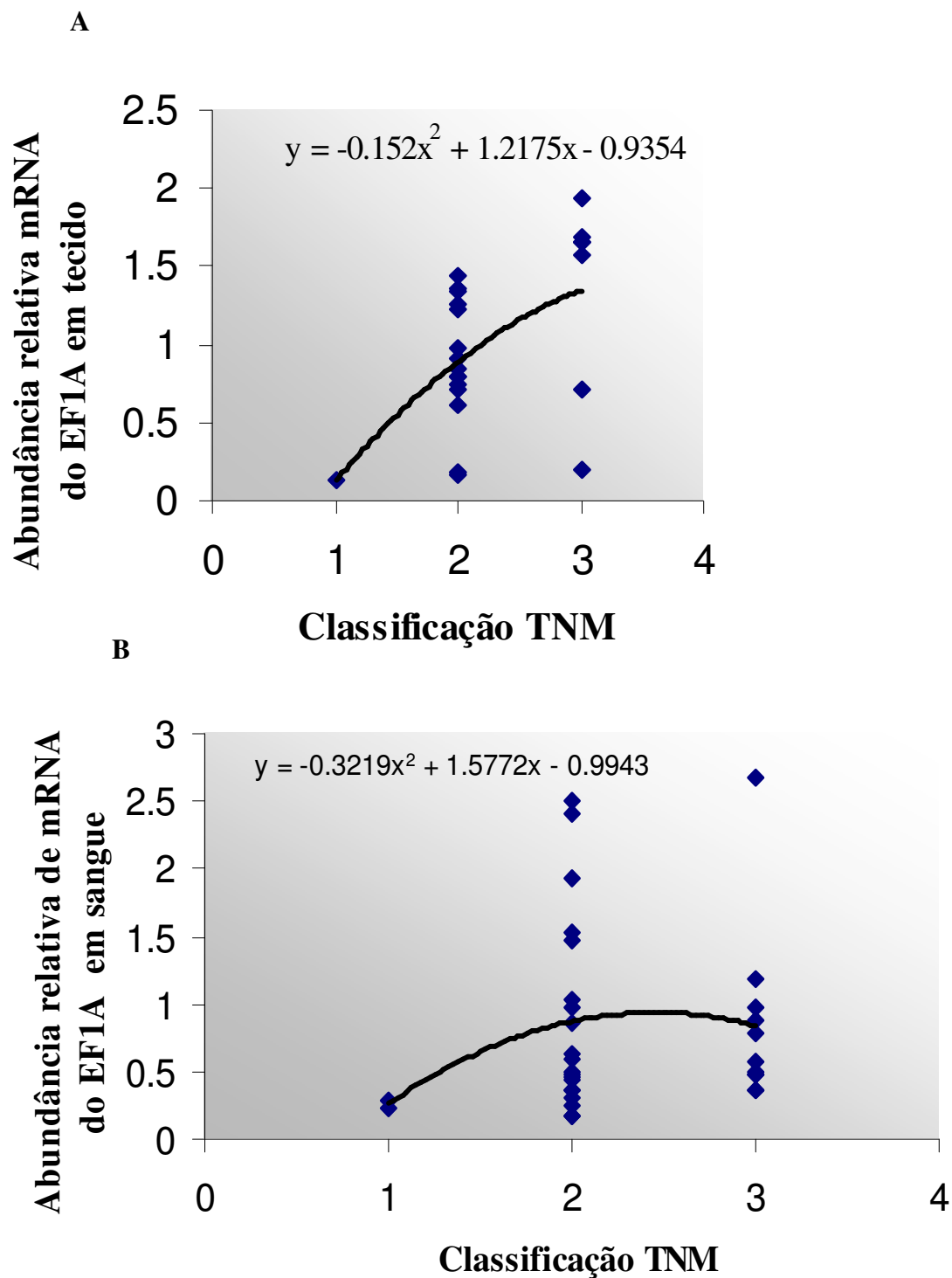


Figura 4-Análise da expressão relativa do gene EF1A, obtida por RT_PCR semi-quantitativa, dos pacientes do grupo CaP em relação à classificação TNM e curva de tendência observada.
 A- Análise do TNM em relação aos níveis de abundância relativa da mRNA no tecido ($p = 0,011$)
 B- Análise do TNM em relação aos níveis de abundância relativa da mRNA no sangue ($p > 0,05$)

4.2-Análise de LIS-SSCP

O padrão de bandas obtido no gel e LIS- SSCP (figura 5) revelou que o gene do EF1A, nas amostras analisadas, conservou a mesma seqüência nucleotídica, ou seja, em nenhum dos indivíduos foi observado padrão de migração diferencial, logo certificamos tratar-se realmente de transcritos do gene EF1A e não da do gene PTI-1, pois embora essa região seja homóloga aos dois genes, no PTI-1 ela apresenta algumas trocas nucleotídicas em relação à seqüência do EF1A, que resultariam em variação no padrão de migração.



Figura 5- Gel de LIS-SSCP, representativo do padrão de migração eletroforética do produto do gene EF1A obtido por RT-PCR semi-quantitativa.

4.3-Análise da RT-PCR qualitativa para as regiões 5' UTR e Fusão:

As figuras 6 e 7 são representativas do padrão de amplificação do gene PTI-1, em sangue e tecido, regiões 5'UTR e de Fusão, , obtido por RT-PCR qualitativo e semi-nested respectivamente.

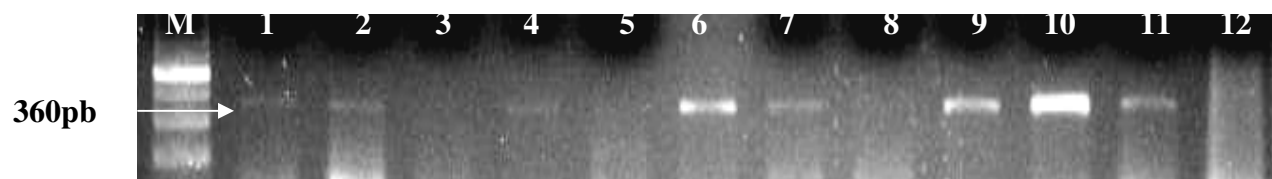


Figura 6- Gel representativo de RT-PCR qualitativo para detecção da região 5' UTR em amostras de sangue periférico e tecido dos grupos HPB e CaP
M-marcador de peso molecular de 100pb, Colunas de 1-12 amplificação do fragmento de 360pb (presença/ausência) em sangue periférico e tecido . Colunas 1,2 e 3-sangue HPB, 4, 5 e 6-tecido HPB; 7, 8 e 9 sangue CaP e 10,11 e 12 tecido CaP.

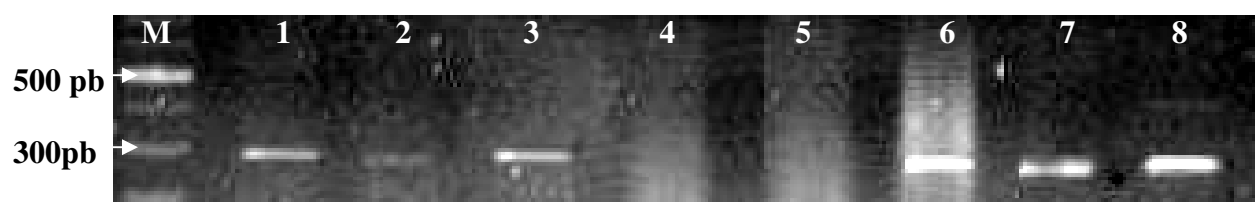


Figura 7- Gel representativo da RT-PCR semi-nested para detecção da região de fusão em amostras de sangue e tecido de pacientes HPB e CaP
M - marcador de peso molecular de 100pb, colunas 1 e 2-tecido HPB, 3 e 4 sangue HPB, 5 e 6 sangue CaP, e colunas 7 e 8 tecido CaP.

A análise dos resultados obtidos com a amplificação das regiões 5' UTR e de fusão, tanto no sangue quanto em tecido, apresentados na tabela 4, mostram que essas regiões foram detectadas em uma porcentagem maior de indivíduos pertencentes ao grupo CaP, tanto em sangue quanto em tecido.

Tabela 4 -Distribuição dos pacientes dos grupos CaP, HPB e CN, em sangue periférico e tecido, de acordo com a presença do transcrito do gene *PTI-1*, regiões 5'UTR e fusão, obtida por RT-PCR qualitativa, em números e porcentagem.

	Sangue			tecido	
	CaP (77)	HPB (86)	CN (126)	CaP(40)	HPB (31)
5'UTR+	30 (38.9%)	30 (34.8%)	31 (24.6%)	22(55%)	10 (32.25%)
Fusão+	13 (16.8%)	11 (12.8%)	4(3.17%)	6(15%)	3 (9.67%)
Ambos-	44(57.14%)	55(63.95%)	95(75.39%)	17(42.5%)	20(64.5%)

O teste de correlação de Pearson foi estatisticamente significativo, em sangue periférico, quando analisamos os grupos CaP e CN x 5'UTR, $p = 0,03$, CaP e CN x Fusão, $p = 0,0006$ e HPB e CN x Fusão, $p = 0,008$. Porém, a análise dos grupos CaP e HPB x 5'UTR x Fusão, em sangue e tecido, não foi estatisticamente significativa, $p > 0,05$.

A presença das regiões 5'UTR e de fusão foram associadas aos dados laboratoriais e clínicos dos pacientes. O score de Gleason e o estadiamento TNM não apresentaram nenhuma correlação significativa com essas regiões. A análise da região 5' UTR x PSA x idade no grupo CaP, sangue, apresentou correlação significativa com $p = 0,017$ e $p = 0,0018$ respectivamente. No grupo HPB, sangue, obtivemos associação significativa da região 5' UTR x DD3, $p < 0,005$ e da região de Fusão x idade, $p = 0,013$. Nas amostras de tecido, HPB e CaP, as regiões 5' UTR e de Fusão não apresentaram correlação estatisticamente significativa com os dados clínicos.

A razão de chances para a ocorrência de CaP, considerando-se a presença das regiões 5'UTR e de fusão do gene PTI-1, no sangue periférico, foi 1,94 vezes maior em relação ao HPB ($p = 0,04$ IC_{95%} 1,06-3,6) e 6,19 vezes maior em relação ao CN ($p = 0,0016$ IC_{95%} 1,94-19,77) para as respectivas regiões. A

presença da região de fusão, no sangue, aumenta a chance de desenvolvimento de HPB em 4,47 vezes em relação ao CN ($p = 0,0016$ IC_{95%} 1,37-14,55).

Os parâmetros para a aplicação da RT-PCR qualitativa, no diagnóstico de CaP, usando a detecção das regiões 5' UTR e Fusão em sangue e tecido foram estimados (tabela 5) e revelaram que, nesse estudo, o gene PTI-1 sozinho não foi um bom marcador molecular para o uso na clínica.

Tabela 5-Estimativa para aplicação da RT-PCR qualitativa para detecção dos transcritos gênicos do gene PTI-1, regiões 5'UTR e fusão, no diagnóstico clínico do CaP.

Parâmetros	sangue		tecido	
	5'UTR	Fusão	5'UTR	Fusão
Sensibilidade	38.96%	16.88%	55%	15%
Especificidade	65.12%	87.21%	67.74%	90.32%
Valor preditivo +	50%	54.17%	68.75%	66.67%
Valor preditivo -	54.37%	53.96%	53.85%	45.16%
Acúrcia	52.72%	54%	60.53%	47.89%

A detecção da presença (P) e da ausência (N) das regiões 5' UTR e Fusão gerou quatro haplótipos: PN, NP, PP e NN. Os grupos CaP, HPB e CN foram subdivididos de acordo com esses haplótipos (tabela 6) e o nível médio relativo de expressão do EF1A foi calculado em relação aos mesmos. Verificamos uma tendência no sangue de queda dos níveis relativos médios de expressão do EF1A no grupo CaP em relação ao haplótipo PP. Nos grupos HPB e CN, foi observada uma tendência inversa, os níveis de expressão relativa do EF1A aumentaram em relação ao haplótipo PP. No tecido, os níveis relativos médios de expressão aumentaram no grupo CaP e praticamente se mantiveram no grupo HPB em relação à positividade dos haplótipos (figura 8 A e B).

Foram adotados dois modelos, no primeiro considerou-se, que a presença do gene PTI-1 seria relevante somente quando as duas regiões, 5' UTR e fusão tivessem sido detectadas e no segundo considerou-se que a presença da região de fusão seria suficiente para atestar a presença do PTI-1. Os dados obtidos para desses modelos, observados na tabela 6 demonstram que os níveis médios de

expressão para o gene EF1A praticamente são os mesmos, dentro de cada grupo analisado, quando consideramos a presença das duas regiões ou somente a fusão. A figura 9 A e B, mostra que os níveis de expressão do EF1A em relação ao gene PTI-1 apresentaram praticamente o mesmo comportamento em relação à positividade dos haplótipos.

Embora em sangue periférico, figuras 8 A e 9 A, os níveis de expressão relativa do EF1A sejam menores no grupo CaP em relação ao grupo HPB, levando-se em consideração o haplótipo PP, quando analisamos os níveis de expressão do EF1A em relação a esse haplótipo, somente no grupo CaP em associação ao estadiamento TNM, observamos que dentro do grupo há uma tendência de aumento de expressão do EF1A de acordo com a progressão da doença (figura 10).

Tabela 6- Distribuição dos indivíduos, de acordo com o grupo de estudo, em sangue periférico e tecido, e cálculo dos níveis relativos médios de expressão do mRNA do gene EF1A em relação aos haplótipos do gene PTI-1, presença (P) ou ausência (N) das regiões 5'UTR e fusão.

Haplótipos*	Sangue						Tecido			
	HPB	mRNA	CaP	mRNA	CN	mRNA	HPB	mRNA	CaP	mRNA
NN	55	0.729	44	0.78	95	0.56	20	0.827	18	0.904
NP	2	0.696	3	0.505	0	0	1	0.72	0	0
PN	21	0.81	20	0.723	27	0.46	7	0.82	16	1.048
PP	9	0.809	10	0.556	4	0.895	2	0.765	6	1.156
Total	87		77		126		30		40	
Modelos										
NN+NP+PN	78	0.750	67	0.75	122	0.538	28	0.882	34	0.971
PP	9	0.809	10	0.556	4	0.895	2	0.765	6	1.156
NN+PN	76	0.75	64	0.762	122	0.538	27	0.882	34	0.971
PP+NP	11	0.867	13	0.544	4	0.895	3	0.75	6	1.158

*NN: 5'UTR – e fusão –, NP: 5' UTR – e fusão +, PN: 5' UTR + e fusão – e PP: 5' UTR+ e fusão +.

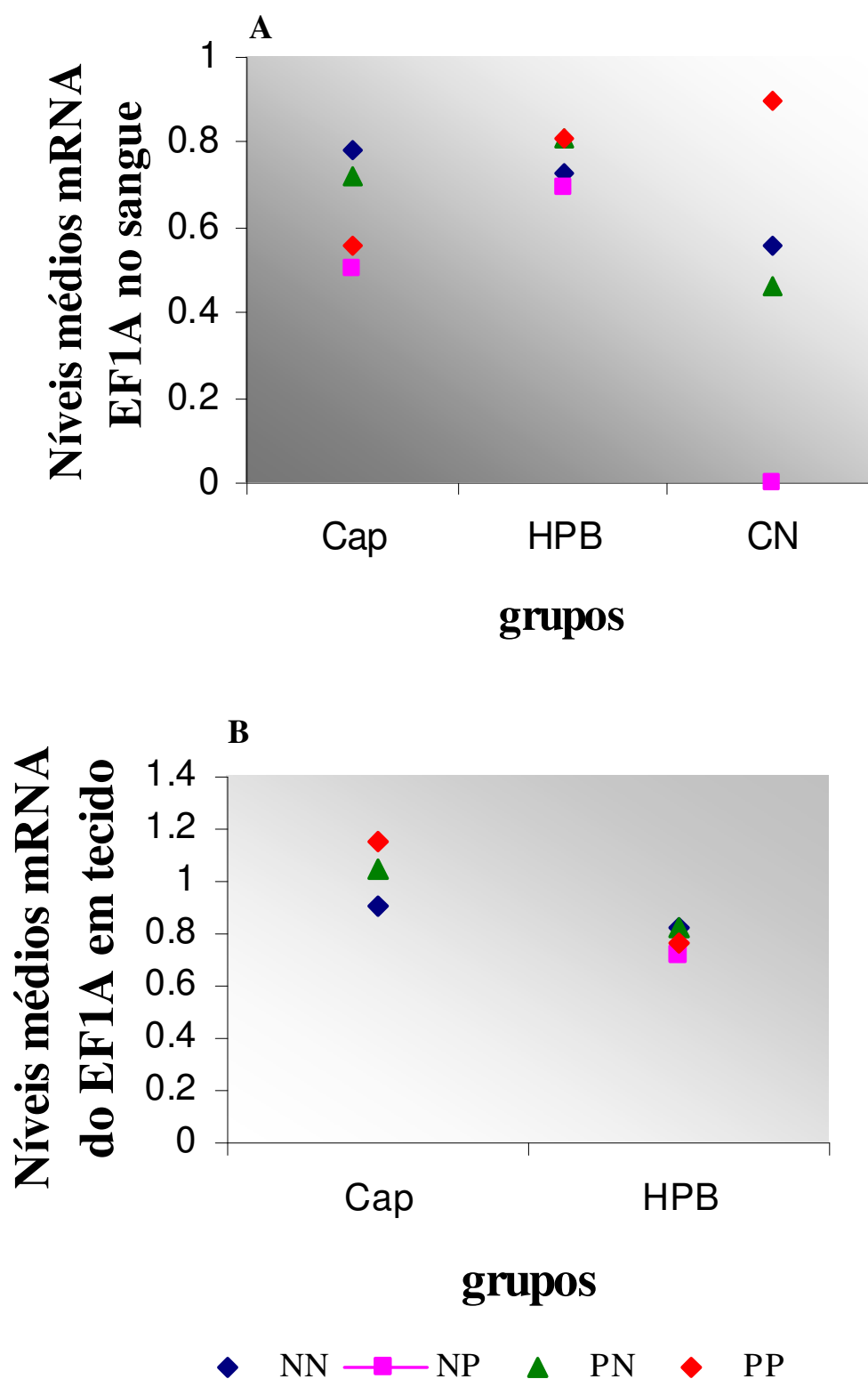


Figura 8- Análise dos níveis relativos de expressão do gene EF1A, obtidos por RT-PCR semi-quantitativa, em relação à presença dos haplótipos do gene PTI-1, presença ou ausências das regiões 5'UTR e fusão em (A) sangue periférico e (B) em tecido prostático de acordo com cada grupo estudado.

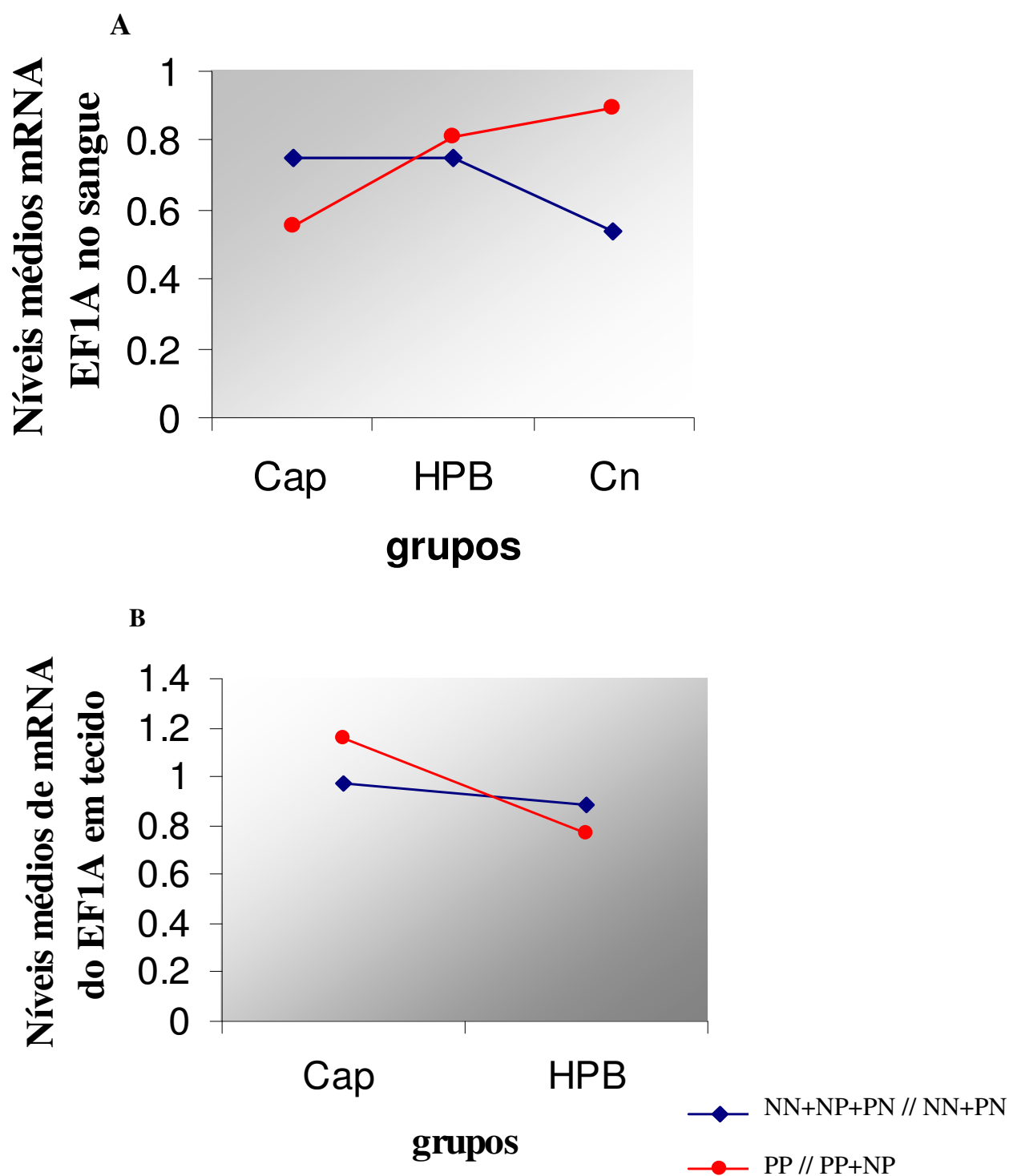


Figura 9- Análise dos níveis relativos de expressão do gene EF1A, obtidos por RT-PCR semi-quantitativa em relação aos modelos (NN+NP+PN e PP e NN+PN e PP+NP) adotados para os haplótipos do gene PTI-1, regiões 5' UTR e fusão em sangue (A) e tecido (B) de acordo com os grupos estudados.

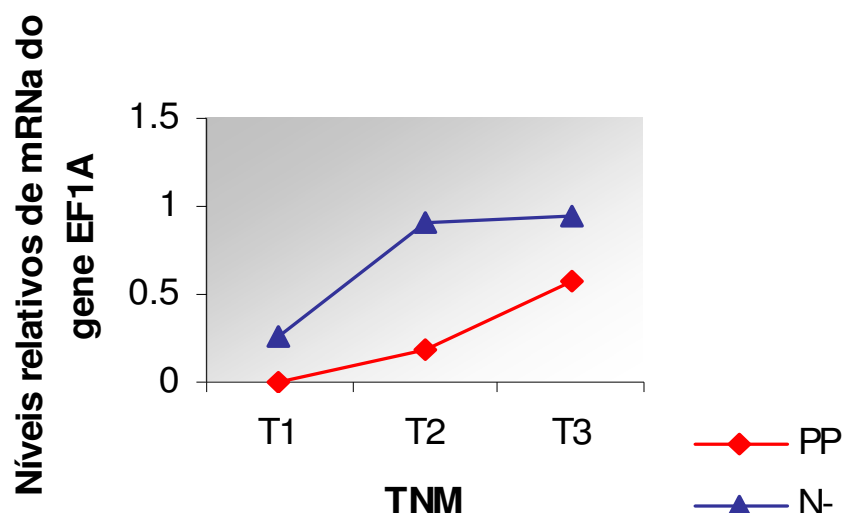


Figura 10-Análise dos níveis relativos de expressão do gene EF1A no grupo CaP, obtidos por RT-PCR semi-quantitativa em relação ao modelo (NN+NP+PN e PP) adotado para os haplótipos do gene PTI-1, regiões 5' UTR e fusão em sangue em sangue periférico, associado ao estadiamento TNM.

Os haplótipos do gene PTI-1, considerando-se como PTI-1 negativo somente os indivíduos NN, foram agrupados no sangue periférico de acordo com a presença/ ausência de transcrito do gene DD3, cuja expressão esta associada à presença de células prostáticas tumorais circulantes. Para essa análise foram obtidos dados de DD3, em sangue periférico, para 78 pacientes com HPB e 68 com CaP. As frequências de indivíduos, grupos CaP e HPB, portadores de expressão positiva para os dois marcadores, ausente para ambos e positiva para um deles foram calculadas (tabela 7).

Tabela 7-Distribuição dos indivíduos dos grupos CaP e HPB, em sangue periférico, de acordo com a presença dos transcritos do gene PTI-1, regiões 5' UTR ou fusão, em relação à detecção dos transcritos gênicos do DD3 obtida por RT-PCR semi-quantitativa.

	DD3 +		DD3-	
	HPB	CaP	HPB	CaP
PTI-1 +	8(34.78%)	16(50%)	22(40%)	14(37.8%)
PTI-1-	15(65.21%)	16(50%)	33(60%)	23(62.2%)
Total	23(41.81%)	32(58.19%)	55(59.78%)	37(40.22%)

Os parâmetros clínicos de diagnósticos do CaP, nestas amostras, usando as frequências do DD3 foram: sensibilidade de 47,06%, especificidade de 67,95%, acurácia de 58,22%. As frequências de detecção positiva para o DD3 e PTI-1, associadas, foram usadas para os parâmetros clínicos de diagnósticos do CaP e foi estimada uma sensibilidade de 41,03% , especificidade de 80,5%, acurácia de 61,25% . A associação desses dois genes melhora os parâmetros de especificidade e acurácia, porém é necessário que a sensibilidade do teste seja melhor.

O cálculo da razão de chances para a presença de CaP, usando os dados associados, gerou os seguintes resultados: DD3+ OR = 1,87 ($p = 0,39$, IC_{95%} 0,62-5,64); DD3- OR = 0,91 ($p = 0,99$, IC_{95%} 0,38-2,14); PTI-1+ OR = 3,14 ($p = 0,06$, IC_{95%} 1,06-9,26) e PTI-1- OR = 1,3 ($p = 0,47$, IC_{95%} 0,63-3,70). Portanto indivíduos portadores dos genes PTI-1+ e DD3+ têm 3,14 vezes mais chances de apresentar câncer metastático em relação aos indivíduos do grupo CaP DD3- e PTI-1+.

4.4- Determinação da estrutura predita do gene PTI-1 por análise de bioinformática:

A estrutura predita obtida pelo modelamento da sequência da proteína do PTI-1 (figura 11) apresentou identidade de 77% com a proteína eEF1A (gi|9256877|pdb|1F60|A). A proteína do PTI-1 perde parte da sua extremidade N-terminal em comparação à da eEF1A e, no nosso modelo, apresentou uma região na extremidade carboxi-terminal que parece conferir instabilidade à molécula.

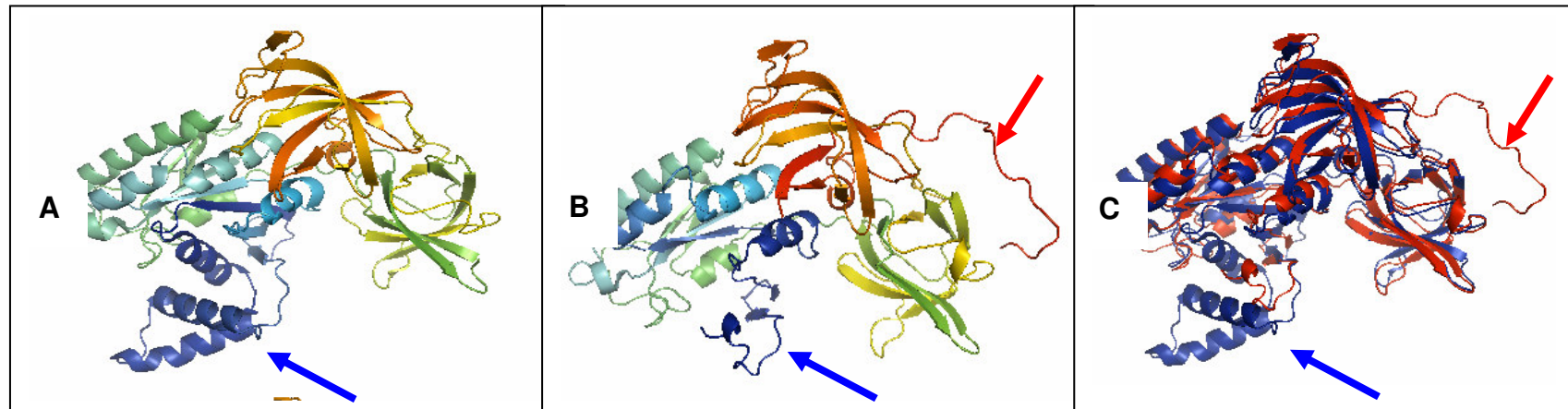


Figura 11-Estrutura tridimensional das moléculas do **A**- gene EF1A (gi|9256877|pdb|1F60|A), **B** gene PTI-1 e **C** sobreposição das imagens. As setas azuis indicam a região exclusiva do Gene EF1A, a qual corresponde ao domínio I que é perdido na molécula do PTI-1. As setas em vermelho mostram uma região na extremidade carboxi terminal da molécula, que provavelmente, devido a sua conformação, confere instabilidade para a mesma.

5-Discussão

A expressão alterada do eEF1A tem sido ligada à transformação fenotípica em vários estudos independentes e em diferentes sistemas (WANG *et al.*, 1997; GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999). De fato, o papel do eEF1A na oncogênese tem sido investigado em câncer de próstata. Nessas células tumorais, foi identificado o oncogene dominante PTI-1, cuja expressão ocorre também em linhagens celulares de carcinoma de mama, colón e pulmão, mas não em células normais (LAMBERTI *et al.*, 2004). Os estudos publicados a respeito gene PTI-1 afirmam que o seu transcrito se expressa em células tumorais prostáticas e está ausente em células normais e de hiperplasia prostática benigna (SHEN *et al.*, 1995; SUN *et al.*, 1997, GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999). Entretanto, o transcrito analisado em todos esses trabalhos, foi na sua maioria isolado de cultura de células, e muitas vezes se restringiu à RT-PCR da região 5' UTR desse gene; com exceção de Mansilla e colaboradores (2005) que conseguiram amplificar a região 5' UTR e de fusão em diversas linhagens celulares e em sangue periférico de 8 doadores.

Este estudo teve como objetivo detectar e quantificar os produtos de transcrição do gene PTI-1 nas regiões que o caracterizam, 5' UTR, Fusão, e do transcrito do gene do eEF1A, de uma região homóloga ao PTI-1, em amostras de peças cirúrgicas e de sangue periférico de pacientes com CaP e HPB, para melhor compreender o papel desse oncogene no adenocarcinoma prostático.

Os resultados obtidos por meio da análise dos níveis relativos de mRNA do EF1A, demonstraram que em tecido a abundância relativa do transcrito gênico foi significativamente maior no grupo CaP, sendo capaz de diferenciá-lo do grupo HPB. Observou-se também uma correlação significativa, ($p = 0,011$), entre a associação TNM x níveis relativos de mRNA do EF1A no grupo CaP, o que mostra que em tecido existe uma tendência de aumento de expressão do EF1A em relação à progressão da doença. Ao analisarmos os níveis relativos de expressão do EF1A no tecido em relação aos intervalos de expressão estabelecidos, notamos que os pacientes do grupo HPB tem 90% de suas amostras com níveis relativos de expressão do EF1A dentro dos intervalos de expressão menores do que um; como o diagnóstico dos estágios iniciais de

câncer assemelha-se muito às alterações laboratoriais e clínicas da hiperplasia benigna (KRUMHOLTZ, CARVALHAL *et al.*, 2002; CATALONA, 2004), existe a possibilidade dos pacientes, com níveis de expressão acima de um, possuírem micro focos de células pré-tumorais, com alterações moleculares, mas não afetando a morfologia celular. No grupo CaP 42,5% das amostras analisadas apresentaram níveis de expressão do EF1A maiores do que um, provavelmente, esses estejam relacionados à progressão e evolução do câncer para um processo metastático pois foi observada também uma correlação significativa com a classificação TNM. Além do seu papel fundamental na tradução, o EF1A, desempenha inúmeras outras funções; acredita-se que ele esteja envolvido na organização do citoesqueleto, formando complexos com outros componentes celulares como a actina e há evidências de que estruturas citoesqueléticas contendo actina sejam importantes na motilidade celular requerida nos processos de metástase (EDMONDS *et al.*, 1996). O mRNA do EF1A tem alta expressão em tumores humanos gástricos, de pâncreas, cólon, mama e pulmão. De acordo com o cálculo da razão de chances, um indivíduo com níveis de expressão do EF1A compreendidos no intervalo de 1 a 1,5 têm 4,6 vezes mais chances de possuir CaP, fato que reforça mais a chance de membros do grupo HPB dentro desse intervalo virem a desenvolver CaP.

Em sangue periférico, detectou-se um nível relativo de expressão do mRNA do EF1A maior no grupo CaP, porém não obtivemos correlação estatisticamente significativa com os dados clínicos. A análise dos intervalos de expressão do EF1A mostrou que em média 85,5% dos pacientes dos grupos estudados têm níveis relativos de expressão menores ou iguais a um. Apenas uma pequena, mais significativa, parcela de indivíduos do grupo CaP, 7,8%, apresenta níveis de expressão relativa maiores ou iguais a 1,5. Provavelmente, essa pequena parcela de indivíduos do grupo CaP esteja em progressão para um fenótipo metastático.

O cálculo da razão de chances mostrou que para níveis de expressão do EF1A menores ou iguais a 0,5 a chance de um indivíduo ser portador de CaP é 3 vezes maior em relação aos pacientes do grupo HPB e que para níveis de expressão iguais ou maiores do que 1,5, a chance um indivíduo vir a desenvolver CaP é de 10,56 vezes maior em relação aos pacientes do grupo CN. O fato das maiores probabilidades de um indivíduo vir a desenvolver CaP,

está associado aos níveis de expressão menores do que 0,5 e maiores do que 1,5, pode estar relacionado à presença contínua de células prostáticas na circulação (GHOSSEIN *et al.*, 1999) as quais no início de formação do tumor prostático são pouco diferenciadas fazendo com que se detectem níveis baixos de transcritos do mRNA do EF1A e ou níveis normais, pois abaixo de um os níveis de expressão permanecem uniformes para os grupos estudados. Quando ocorre a progressão da diferenciação celular os níveis de mRNA do EF1A aumentam em virtude de um maior número de células tumorais ou mesmo metastáticas na circulação, a associação dos níveis relativos de expressão do EF1A ao TNM mostra que a linha de tendência cresce do estágio T1 para T2 e depois mantém-se quase estável em direção a T3. Embora não tenhamos encontrado associação significativa entre os níveis relativos de expressão do EF1A, no sangue e os dados clínicos, não podemos descartar a mesma, pois esse fator de elongação exerce inúmeras funções associadas a outros processos fisiológicos e celulares como sinal de transdução (YANG & BOSS 1994), organização do citoesqueleto (SHIINA *et al.*, 1994; KURASAWA *et al.*, 1996), infecção viral (CIMARELLI & LUBAN 1999), diabetes (REYNET & KAHN 2001) e senescência (CAVALLIUS *et al.*, 1986) que podem mascarar o seu efeito em um processo isolado. A própria faixa etária dos pacientes pode estar exercendo uma forte influência na expressão desse gene em sangue periférico.

A análise de regressão linear obtida dos dados cruzados: Idade x mRNA do EF1A ($p=0.000$), mostra uma associação entre o aumento de idade e os níveis relativos do EF1A, assim, parece que as condições fisiológicas relacionadas a idade afetam mais os níveis relativos de expressão do EF1A do que o fato desses pacientes terem células tumorais circulantes ou não, uma vez que não observamos correlação dos níveis relativos de mRNA do EF1A no sangue com o estadiamento TNM.

A técnica de SSCP demonstrou, pelo padrão de bandas obtido, que realmente os transcritos analisados eram do gene EF1A, pois essa região tem alta homologia à do gene PTI-1; porém neste são observadas algumas mutações de ponto em relação à sequência daquele, o que resultaria em um padrão de migração eletroforética diferencial entre os indivíduos caso se tratasse do transcrito do gene PTI-1.

As regiões 5'UTR e de Fusão, que são exclusivas do gene PTI-1, controverso à literatura, foram detectadas em amostras de indivíduos CaP, HPB e CN. Embora tenhamos verificado a maior frequência dessas regiões no grupo CaP, esta não foi estatisticamente capaz de diferenciar os indivíduos em CaP e HPB, tanto no sangue periférico quanto em tecido. A presença do transcrito do gene PTI-1 estabeleceu diferença significativa, em sangue periférico, caracterizando os grupos CaP e HPB em relação ao grupo controle CN. A presença das regiões 5' UTR e de fusão foi analisada em relação aos dados clínicos e histológicos, dentro de cada grupo e separadamente. No grupo CaP, sangue, a associação da região 5'UTR x PSA foi estatisticamente significativa, $p = 0.0017$, porém não foi observada associação com as demais condições histopatológicas, fato que nos permite afirmar que, no nosso estudo essa região, assim como o PSA, é um indicativo de alterações na próstata, e ou que ela tem expressão associada aos estágios primordiais do mecanismo de carcinogênese nos quais não necessariamente há alteração histopatológica. No grupo HPB, sangue, foi observada uma correlação entre a região 5'UTR x DD3, $p \leq 0,05$; esta associação permite reforçar a acurácia para classificação de amostras de HPB e também relacionar a expressão dessa região a disseminação de células tumorais no processo metastático.

A estimativa da razão de chances para a ocorrência do CaP em relação à presença do transcrito, 5'UTR, do gene PTI-1 foi de 1,94 vezes maior em relação ao HPB, demonstrando que apesar de não estabelecermos associação considerável com dados clínicos, conforme a literatura, os indivíduos portadores do gene PTI-1 têm uma predisposição relativamente maior em desenvolver CaP em relação aos indivíduos cuja expressão está ausente. Porém, o uso do gene PTI-1 no diagnóstico clínico, de acordo com os parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia, não é capaz de estabelecer um resultado conclusivo devido à sua baixa sensibilidade e acurácia.

Os transcritos obtidos com a amplificação das regiões 5'UTR e fusão, foram agrupados de acordo com a presença / ausência de detecção em 4 haplótipos (NN, NP, PN, e PP) para tentarmos elucidar como o gene *PTI-1* afeta os níveis relativos do mRNA do EF1A em relação ao CaP. Os níveis médios de expressão relativa do gene EF1A foram comparados dentro dos grupos, em

sangue e tecido, para cada haplótipo. Para verificar se as regiões 5'UTR e de fusão afetavam a expressão do EF1A do mesmo modo, foram criados dois modelos, no primeiro considerou-se, que a presença do gene PTI-1 seria relevante somente quando as duas regiões, 5' UTR e fusão tivessem sido detectadas e no segundo considerou-se que a presença da região de fusão seria suficiente para atestar a presença do PTI-1.

Esses modelos foram escolhidos de acordo com a caracterização estrutural do gene PTI-1, visto que, embora região 5'UTR seja exclusiva do gene em relação ao EF1A, sua homologia com o *Mycoplasma hyopneumoniae* poderia implicar na detecção dessa bactéria, resultando em falso positivo; enquanto a região de fusão, a qual contém homologia com as duas seqüências, *M. hyopneumoniae* e EF1A, só seria detectada em indivíduos portadores de transcritos do gene PTI-1; outra razão para o uso desse modelo é que esperávamos que essas regiões fossem detectadas de forma simultânea, uma vez que se trata de amplificação de fragmentos do mesmo gene.

Uma das razões que pode ter afetado a detecção dessas regiões, especialmente a de fusão, é o fato de que nessa região estão sendo detectadas algumas mutações em relação à seqüência original do PTI-1 (número de acesso no NCBI : L41490) e nossos iniciadores foram desenhados de acordo essa seqüência. Mansilla *et al.*,2005 descreveu duas mutações nessa região, C726A e C746A, e a última coincide com a região de anelamento, posição 734 a 752pb, da seqüência do iniciador reverso da região de fusão.

Os resultados revelaram que os níveis de expressão do EF1A assumem o mesmo comportamento quando analisados em relação aos 4 haplótipos ou aos dois modelos adotados nos grupos HPB e CaP, tanto em sangue quanto em tecido. Portanto, podemos afirmar que a presença das regiões de fusão e 5' UTR caracterizam a presença do gene PTI-1. Nossos resultados mostram que a presença do transcrito do gene PTI-1, em tecido, afeta de maneira significativa os níveis de abundância relativa do EF1A no grupo CaP, enquanto há uma tendência desses permanecerem quase constantes no grupo HPB. Esse fato nos permite afirmar que o PTI-1 pode estar estimulando um aumento na expressão do EF1A contribuindo para transformação fenotípica e a

progressão do câncer; pois segundo Edmons e colaboradores (1996), a alta expressão do EF1A está correlacionada com aumento do potencial metastático, provavelmente, devido a sua interação com a actina do citoesqueleto, um efector de metástases.

Em sangue periférico notamos uma tendência inversa, os níveis relativos de mRNA são menores no grupo CaP quando o gene PTI-1 está presente, enquanto no grupo HPB, verificamos uma tendência de discreto aumento dos níveis do transcrito EF1A. A análise dos níveis relativos de mRNA do EF1A e da presença do gene PTI-1, somente no grupo CaP em associação com o estadiamento TNM mostra que esse gene parece estar relacionado à progressão da doença para um fenótipo metastático.

Porém, a presença do gene PTI-1 fez com que os níveis relativos de expressão do EF1A fossem menores no grupo de CaP em relação aos grupos HPB e CN, talvez devido ao fato de esse gene também possa estar exercendo uma competição a nível transcricional com o EF1A nos estágios mais avançados da doença. Visto que, na análise em sangue periférico, considerando-se apenas os níveis de expressão do EF1A, a curva de tendência cresce na direção de T2 a T3 e depois tende a manter-se estável com uma discreta queda.

De acordo com os dados obtidos da análise da variação da expressão do EF1A associado à positividade de expressão do PTI-1 em sangue e tecido, nossa hipótese é a de que no processo inicial de carcinogênese a presença do PTI-1 esteja estimulando a transformação fenotípica celular. Os níveis de EF1A aumentam fazendo com que ocorra uma maior proliferação celular (GANGWANI *et al.*, 1998) e o câncer se estabelece no órgão.

Porém, com o avanço da carcinogênese, possivelmente, ocorre uma competição entre a forma truncada da proteína do EF1A, codificada pelo PTI-1, e a proteína do EF1A a fim de que essa, neste estágio da doença, tenha sua expressão reduzida, visto que os altos níveis de expressão do EF1A estão associados ao processo de apoptose (KATO, 1999; DUTTARROY *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2000). Desde modo, explicando o comportamento dos níveis relativos de expressão do EF1A quando analisamos o grupo CaP, em tecido, doença provavelmente confinada ao órgão na maioria das amostras

analisadas, e no sangue, processo final de diferenciação e evolução para doença metastática.

A presença do gene PTI-1 foi analisada em associação à presença do gene DD3 para estimar os valores desses marcadores aplicados ao diagnóstico. Em relação ao uso de cada um separadamente, verificamos que juntos eles melhoram o valor do diagnóstico em termos de especificidade, acurácia e valor preditivo positivo. Mas ainda sim, se faz necessário elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no câncer de próstata para que se possa estabelecer biomarcadores com maior aplicabilidade clínica.

O cálculo da razão de chances para desenvolvimento de Cap mostrou que os indivíduos portadores dos genes PTI-1 e DD3 têm 3,14 vezes mais chances de desenvolver câncer metastático em relação aos indivíduos DD3 negativo e PTI-1 positivo. O valor preditivo do gene PTI-1 é baixo, os resultados demonstram que ele é um fator associado à progressão da doença e ao potencial metastático.

A análise do modelo 3D criado para proteína predita do PTI-1 revelou que esta molécula apresenta uma estrutura instável, além de perder o domínio I, ligante de GTP da extremidade N-terminal, ela também apresenta uma região na extremidade carboxi-terminal exclusiva e com uma conformação altamente instável. Embora todas as explicações da oncogenicidade do PTI-1 estejam baseadas nas características da proteína nenhum estudo demonstrou a presença da proteína do PTI-1 *in vivo* (GOPALKRISHNAN *et al.*, 1999; MANSILLA *et al.*, 2005).

Estudos do padrão de super-expressão da proteína do PTI-1 demonstram que essa proteína é distribuída uniformemente no citoplasma e excluída do núcleo, uma característica também apresentada pela forma endógena da eEF1A. Devido à similaridade dessas proteínas, os anticorpos capazes de reconhecer a eEF1A também reconhecem a proteína do PTI-1 simultaneamente (MANSILLA *et al.*, 2005). Portanto, parece não haver um consenso sobre qual proteína, realmente, esta sendo detectada.

Baseado nos nossos dados, e nos dados disponíveis na literatura; nossa hipótese é a de que o gene do PTI-1 seja um produto de recombinação cromossômica formado durante o processo de edição do RNA, pois encontramos uma grande dificuldade em detectar a região de fusão desse

gene, e de acordo com a literatura, aparentemente, seqüências completas de rRNA 23S de bactéria e micoplasma têm sido capazes de se fusionar à região 5' UTR do PTI-1 e por sua vez, o EF1A é fusionado ao rRNA 23S do micoplasma. O fato dessas seqüências possuírem zonas de *overlap* e o rRNA 23S ter uma seqüência muito conservada, podem auxiliar o acontecimento dessa fusão (MANSILLA *et al.*, 2005).

A presença de múltiplos pseudogenes do EF1A no genoma humano (MADSEN *et al.*, 1990) aumentam a possibilidade para ocorrência de rearranjos cromossômicos durante ou após infecção com micoplasma. A origem desse transcrito é intrigante, sua presença parece estar relacionada à infecção, em algum momento, pelo micoplasma.

Acreditamos que, pela estrutura protéica predita, o gene PTI-1 esteja exercendo uma competição com o gene do EF1A a nível transcricional, ora induzindo ora inibindo a transcrição e tradução da proteína eEF1A e que o seu transcrito induza à oncogenicidade, independente da presença da proteína truncada.

Nossos resultados demonstram que o fator de alongação 1A e o PTI-1 parecem estar envolvidos nos mecanismos que agem na progressão e desenvolvimento do câncer de próstata, porém devido ao fato desses genes estarem atuando e modificando diversos processos celulares se faz necessária uma investigação mais detalhada das possíveis vias de atuação desses genes para elucidar os mecanismos que, direta ou indiretamente, regulam o crescimento e a transformação celular, para que melhor entendamos as alterações a nível de regulação durante a transformação oncogênica.

6-Conclusões

- Nossa hipótese é que em um dos diferentes processos de carcinogênese a presença do PTI-1 possa estar estimulando a transformação fenotípica celular. Os níveis de EF1A aumentam fazendo com que ocorra uma maior proliferação celular e o câncer se estabelece no órgão.
- Em processos avançados de carcinogênese, possivelmente, ocorre competição entre a forma truncada da proteína do PTI-1, e a proteína do EF1A a fim de que essa, neste estágio da doença, tenha sua expressão reduzida, visto que os altos níveis de expressão do EF1A estão associados ao processo de apoptose (CHEN *et al.*, 2000).
- Provavelmente o gene PTI-1 seja um produto de recombinação cromossômica formado durante o processo de edição do RNA.
- Acreditamos que, pela estrutura protéica predita, o gene PTI-1 esteja exercendo uma competição com o gene do EF1A a nível transcricional, ora induzindo ora inibindo a transcrição e tradução da proteína eEF1A e que o seu transcrito induza à oncogenicidade, independente da presença da proteína truncada.
- O EF1A e o PTI-1 estão envolvidos nos mecanismos que agem na progressão e desenvolvimento do câncer de próstata, porém devido ao fato desses genes estarem atuando e modificando diversos processos celulares se faz necessária uma investigação mais detalhada das possíveis vias de atuação desses genes para elucidar os mecanismos que, direta ou indiretamente, regulam o crescimento e a transformação celular, para que melhor entendamos as alterações que ocorrem em nível de regulação durante a transformação oncogênica.

7-Referências

CARAGLIA, M.; LONGO, O.; MARRA, M.; ABBRUZZES, A.; AND ARCARI,. The Translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: Review article. **Amino Acids** 26: 443-448, 2004.

CAVALLIUS, J., RATTAN, S.I., CLARK, B.C.F, Changes in activity and amount of active elongation factor 1 alpha in aging and immortal human fibroblast cultures. **Exp Gerontol** 21: 149–157, 1986.

CHEN, E., PROESTOU, G., BOURBEAU, D, WANG, E., Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1 alpha protein levels in an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis. **Exp. Cell. Res.** 259:140–148, 2000.

CHOMCZYNSKI, T.; SACCHI, N., Single-step method of RNA isolation by thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analit. Biochem.**, 162:156-159, 1987.

CIMARELLI, A.; LUBAN, J. Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. **J. Virol.** 73:5388-5401, 1999.

DUTTARROY, A.; BOURBEAU, D. ; WANG, X-L ; AND WANG, E, Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor 1 alpha. **Exp. Cell. Res.** 238:168-176, 1998.

EDMONDS, B.T., WYCKOFF, J., YEUNG, Y.G., WANG, Y., STANLEY, E.R., JONES, J., SEGALL, J., CONDEelis, J., Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. **J. Cell. Sci.** 109: 2705–2714. 1996.

EJIRI, S-L., Moolighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein RI-associated nuclear localization. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 66 (2002).

Fiser A, Do RK, Sali A. . Modeling of loops in protein structures. **Protein. Sci.** 9(9):1753-73, 200.

GANGWANI, L., MIKRUT, M., GALCHEVA-GARGOVA, Z., DAVIS, R.J., Interaction of ZPR1 with translation elongation factor-1alpha in proliferating cells. **J. Cell. Biol.** 143: 1471–1484, 1998.

GHOSSEIN, R.A., CARUSONE, L., BHATTACHARYA, S., Review: polymerase chain reaction detection of micrometastases and circulating tumor cells: application to melanoma, prostate, and thyroid carcinomas. **Diagn. Mol. Pathol.** Dec;8(4):165-75, 1999

GIMBA, E. R. P.; BARCINSKI, M. A. Molecular aspects of prostate câncer: implications for future directions. **Int. Braz. J. Urol.** 29:. 401-411, 2003.

GOPALKRISHNAM, R.V., SU, Z.Z., GOLDSTEIN, N.I., FISHER, P.B., Translation infidelity and human cancer: role of PTI-1 oncogene. **Int J Biochem Cell Biol** 31: 151–162, 1999.

GRANT , A.G., FLOMEN, R.M., TIZARD, M.L., GRANT, D.A., Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma lambda gt 11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1 alpha in tumor cells. **Int. J. Cancer** 50: 740-745, 1992.

KATO, M.V. ;SATO, H.; NAGAYOSHE, M. AND IKAWA, Y., Upregulation of the elongation factor 1 alpha gene by p53 in associated with death of an erythroleukemic cell line. **Blood** 90: 1373-1378, 1997.

KATO, M.V.,The mechanism of death of an erythroleukemic cell line by p53: involvement of the microtubule and mitochondria. **Leuk. Lymphoma** 33:181-186, 1999.

KAZIRO, Y., ITOH, H., KOZASA, T., NAKAFUKU, M., SATOH, T., Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. **Annu Rev Biochem** 60: 349–400, 1991.

KNUDSEN, S.M., FRAYDENBERG, J., CLARK, B.F.C., LEFFERS, H., Tissue dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel eEF1A and cell transformation 447 variant of human elongation-factor 1 alpha. **Eur J Biochem** 215: 549–554, 1993.

KRUMHOLTZ, J. D.; CARVALHAL, G.F. et al. "Prostate specific antigen cutoff of antigen cutoff OF 2.6 ng/ml for prostate cancer Screening is associated with favorable pathologic tumor features". **Urol.** 60: 3, 469-474, 2002.

KURASAWA, Y., HANYU, K., WATANABE, Y. AND NUMATA, O., F-actin bundling activity of Tetrahymena elongation factor 1a is regulated by Ca²⁺/calmodulin. **J. Biochem.** 119: 791-798, 1996.

LAMBERTI, A.; CARAGLIA, M.; LONGO, O.; MARRA, M.; ABBRUZZES, A.; AND ARCARI, . The Translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: Review article. **Amino Acids** 26: 443-448- 2004.

LUND, A.; KNUDSEN, S.M.; VISSING, H.; CLARK, B.F.C; TOMMERUP, N., Assignment of human factor elongation factor 1A. A gene : EEF1A elongation maps to chromosome 6q14, and EEF1A to 20q13.3. **Genomics** 36, 1996.

MADSEN, H.O., POULSEN, P., DAHL, O., CLARK, B.F.C., HJORTH, J.P., Retropseudogenes constitute the major part of the human elongation factor 1 alpha gene family. **Nucleic Acids Res.** 18: 1513-1516, 1990.

MANSILLA, F.; HANSEN, L. L.; JACKOBSEN, H.; KJELDGAARD, O. N.; CLARK, B.F.C.; KNUDSEN, S.M., Deconstructing Pti-1: PTI-1 is a truncated,

but not mutated, from of translation elongation factor 1A10, eEF1A. **Bioch. Biophys. Acta** 1727: 116-124, 2005.

MARCHESI, V. T.& NGO. In vitro assembly of multi protein complexes containing alpha, beta e gamma tubulin, heat shock protein HSP70, and elongation factor 1 A. **Proc. Natl. Academic**, 90: 3020-3032

MATHURS, S.; CLEARY , K.R.; INAMDAR, N.; KIM, Y.H, STECK, P.; AND FRAZIER, M.L. Overexpression of elongation factor 1 gama protein in colorectal carcinoma. **Cancer**.82, 816-821, 1998.

MIKOLAJCZYK, S. D.; SONG. Y.; WONG, J. R.; MATSON, R. S.; RITTENHOUSE, H. G., Are multiple markers the future of prostate cancer diagnostics? **Clin. Biochem**. 37:519-528, 2004.

NEVES, A. F., GOULART, L. R., FREITAS, D. G., CORDEIRO, E. R., SABA, K., FARIA. P. C. B., ARAÚJO, T. G., SANTOS, A. P. C., REIS, C.F., Detecção do biomarcador DD3 ^{PCA3} em sangue periférico como apoio à avaliação clínica no diagnóstico de câncer de próstata. **Âmbito Hospitalar** 177:9-11, 2006.

OHNAMI, S.; MATSUMOTO, N.; NAKANO, M.; AOKI, K.; NAGASAKI, K.; SUGIMURA, T.; TERADA, M.; YOSIDA, T. Identification of genes showing differential expression in antisense K-ras-transduced pancreatic câncer cells with suppressed tumorigenicity. **Cancer Res**. 59, 1999.

REYNET, C.; KAHN, C.R., Unbalanced expression of different subunits of elongation factor 1 in diabetic skeletal muscle. **Proc. Natl. Sci. USA**. 98 3422-3427, 2001.

RIIS, B., RATTAN, S.I.S., CLARK, B.F.C., MERRICK, W.C., Eukaryotic protein elongation factors. **TIBS** 15: 420–424

SALI, A., POTTERTON, L., YUAN, F., VAN VLIJMEN, H., AND KARPLUS, M. Evaluation of comparative protein modelling by MODELLER. **Proteins**. 23, 318-

326. 1995

SHEN, R., SU, Z.Z., C.A., OLSSON, FISHER, P.B. Identificação of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression e cloning and differential RNA display. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 6778-6782,1995.

SHEPHERD, J.C., WALLDORF, U., HUG, P., GEHRING, W.J., Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 alpha live longer. **Proc Natl Acad Sci USA** 86: 7520–7521, 1989.

SHIINA, N.; GOTOH,Y.; KUBOMURA,N.; IWAMATSU, A.; NISHIDA, E. Microtubule severing by elongation factor 1 alpha . **Science** 266:282-285, 1994.

Söding J, Biegert A, and Lupas AN., The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucl. Acids Res.**, **33**:244-248(2005

SONENBERG, N., Translation factors as effectors of cell growth and tumorigenesis. **Current Opinion Cell Biol** 5: 955–960, 1993.

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 Urol.** vol. 2. 6^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 29: 1159-1221, 1992.

STAMEY, T.A.,CALDWEL, M., McNEAL, J.E., NOLLEY, R., HERMENEZ, M., DOWNS, J., The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? **J. Urol.** 172: 1297-1301, 2004.

SU, Z., GOLDSTEIN, N.I., AND FISHER, P. B., Antisense inhibition of the *PTI-1* oncogene reverses cancer phenotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95: 1764–1769, 1998.

SUN, Y., LIN, J., KATZ, A. E., AND FISHER, P. B., Human prostatic carcinoma oncogene *PTI-1* is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples. **Cancer Res.** 57: 18–23, 1997.

TATSUKA, M., MITSUI, H., WADA, M., NAGATA, A, NOJIMA, H., OKAYAMA, H. Elongation factor-1 alpha gene determines susceptibility to transformation. **Nat.** 359: 333-336, 1992.

, H.L., Prostate cancer progression .Implicantions of histopathology . **Am. J. Pathol.**145:983-933, 1994.

YANG, W.; BOSS, W.F., Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by the protein activator PIK-A49. Activation requires phosphorylation of PIK-A49. **J. Biol. Chem.** 269: 3852-3857, 1994.

YU, L.;WU, G.; WANG,L.; ZHANG,G., Transient reduction of PTI-1 Expression by short interfering RNAs inhibits the growth of humam prostate cancer cell lines. **J. Exp. Med.** 209:141-148, 2006.

Anexo I
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Termo de Consentimento

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

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

Para a realização dos exames laboratoriais, serão necessárias a coleta de 15 mL de sangue periférico e biópsias de tecidos tumorais da próstata. Cabe ressaltar que todo o material utilizado será estéril e descartável, e, no caso das biópsias, serão realizadas juntamente com os procedimentos rotineiros do centro cirúrgico do Hospital de Clínicas 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,

Assinatura: _____

Testemunhas: _____

Anexo II: PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE SANGUE PERIFÉRICO

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

REAGENTES E SOLUÇÕES PARA O TAMPÃO DE LISE CELULAR

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

MÁSTER MIX *

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

* Pode ser armazenado à temperatura ambiente

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

REAGENTES PARA PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO D

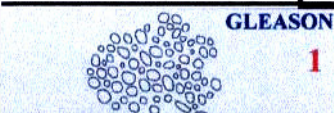
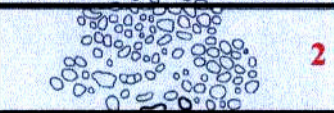
Reagente	Solução de Trabalho
Tiocianato de Guanidina	50 g
Citrato de Sódio 0,75 M, pH 7,0	3,52 ml
Sarcosil 10%	5,3 ml
Água DEPC	58,6 ml

**Anexo III: ESTADIAMENTO DOS ADENOCARCINOMAS DA PRÓSTATA,
CLASSIFICAÇÃO DE WHITMORE-JEWETT E TNM 1992**

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

Anexo IV

SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICO DE GLEASON

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

Fonte: Gleason (1977). **2 a 4 Diferenciado. 5 6 e 7 Moderadamente Dif. 8 a 10 Indif.**

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