

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RT-PCR multiplex semiquantitativa na análise da expressão do gene  
*PSMA* (antígeno prostático específico de membrana) em tecidos  
prostáticos benignos e malignos

Alexandra de Moraes Cardoso

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de  
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas

Uberlândia – MG  
Dezembro – 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RT-PCR multiplex semiquantitativa na análise da expressão do gene  
*PSMA* (antígeno prostático específico de membrana) em tecidos  
prostáticos benignos e malignos

Alexandra de Moraes Cardoso

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de  
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas

Uberlândia – MG  
Dezembro – 2003

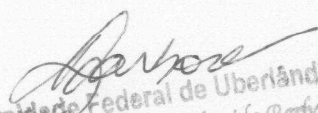


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

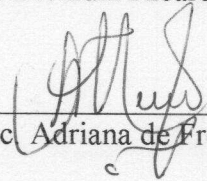
RT-PCR multiplex semiquantitativa na análise da expressão do gene  
*PSMA* (antígeno prostático específico de membrana) em tecidos prostáticos  
benignos e malignos

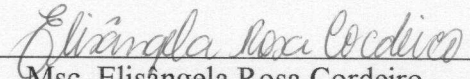
Alexandra de Moraes Cardoso

Aprovado Pela Banca Examinadora Em 18 / 12 / 03 Nota 100,0

  
Universidade Federal de Uberlândia  
Prof.ª Dra. Ana Angélica Abneida Barbosa  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

  
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

  
Msc. Adriana de Freitas Neves

  
Msc. Elisângela Rosa Cordeiro

Uberlândia, 18 de dezembro de 2003.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Ricardo por me abrir as portas do laboratório, pela confiança no meu trabalho e por sempre ter estimulado minha vocação como pesquisadora.

Ao CNPQ, por conceder minha bolsa de Iniciação Científica.

Aos colegas do Laboratório, em especial aos colegas do grupo de Câncer de Próstata: Waldesse, Jaqueline, Adriana, Andréia, Ana Paula, Karina, Paula, Juliana Franco, Juliana Meola, Elisângela, Weruska, pelas inúmeras discussões científicas, pelas risadas, pelo crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram.

À Aline, que se tornou uma de minhas melhores amigas neste último ano, pelas risadas, pelas fofocas, pelos puxões de orelha na hora certa, pelo ombro amigo... Você é umas das poucas pessoas que realmente me conhece.

À Karina, por ter feito eu me dar conta que devemos nos dar a chance de conhecer as pessoas pelo que elas são, e não pelo que aparentam ou demonstram ser. Minha admiração por você é enorme.

À Ju Meola. Sem sua ajuda, esta monografia certamente não estaria pronta.

À toda minha família, por sempre me apoiar em qualquer situação.

A meu pai, Odelmo, por ter me ensinado a ser uma profissional mais competente e por sempre me fazer enxergar a verdade, por mais dolorosa que seja.

A meus irmãos Marcelo e Isabel. Por encherem nossa casa de alegria, por me ensinarem a ser mais altruísta.

A minha mãe, Débora. Me orgulho de dizer que tudo que sou hoje é fruto da sua dedicação e do seu amor. Graças a você me considero uma pessoa segura, sensata, equilibrada e amada. Poder contar com você é confortante.

Ao Rodrigo, pelos inúmeros momentos felizes, por seu amor, por seu carinho, sua compreensão, seu companheirismo, seu apoio incondicional. Por me fazer feliz e por me fazer acreditar que a vida só tem sentido se for ao seu lado. Lindo, eu te amo!

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional.



**ÍNDICE**

1. RESUMO .....	02
2. INTRODUÇÃO .....	03
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	06
3.1 Obtenção das amostras e extração de RNA .....	06
3.2 RT-PCR semi-quantitativo .....	06
3.3 Análises estatísticas .....	08
4. RESULTADOS .....	09
5. DISCUSSÃO .....	11
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	14
7. FIGURAS .....	17
8. TABELA .....	18
9. LEGENDAS .....	19

**RT-PCR MULTIPLEX SEMIQUANTITATIVA NA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *PSMA* (ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO DE MEMBRANA) EM TECIDOS PROSTÁTICOS BENIGNOS E MALIGNOS**

ALEXANDRA DE MORAES CARDOSO

Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, Brasil.

Título corrente: Expressão do *PSMA* em tecidos prostáticos

Palavras-chave: RT-PCR, câncer de próstata.

Autor para correspondência:

Alexandra de Moraes Cardoso

Av. Amazonas s/n.º Bloco 2E sala 24, 38400-902, Uberlândia, MG Brasil

Telefone: (34)3218-2478

E-mail: [alexandramcardoso@yahoo.com.br](mailto:alexandramcardoso@yahoo.com.br)



## 1. RESUMO<sup>1</sup>

O *PSMA* é altamente expresso em carcinomas prostáticos, com baixa ou nenhuma expressão em HPB e NIP. Para este trabalho, foram isolados RNAm de fragmentos prostáticos de pacientes com HPB e CaP. Após a RT, o cDNA foi co-amplificado utilizando-se primers homólogos aos genes *PSMA* e *B2M*. Os amplicons foram quantificados e submetidos à razão de RNAm *PSMA*/RNAm *B2M* obtendo-se a abundância relativa do gene *PSMA*. As razões não seguem uma distribuição normal ( $n = 39$ ;  $p < 0.0001$ ), de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. O teste de Kruskal-Wallis para a média dos fragmentos prostáticos mostrou que as amostras provêm de populações diferentes, com  $p < 0.05$ . Os coeficientes de correlação entre CaP e HPB e entre a expressão relativa do gene *PSMA* e o nível de PSA sérico foram de 0.343 e 0.412 respectivamente, indicando que os níveis relativos dos transcritos do gene *PSMA* aumentam de acordo com os níveis de PSA sérico. Os resultados evidenciam risco aumentado em 6 vezes ao desenvolvimento do câncer de próstata quando a expressão do gene *PSMA* se torna igual ou maior ao valor de 0,4. O estudo multiplex semiquantitativo (RT-PCR) aqui desenvolvido mostrou que há uma associação positiva entre o aumento na expressão do gene *PSMA* e o desenvolvimento do câncer de próstata, sugerindo que o *PSMA* está envolvido no desenvolvimento deste tumor.

---

<sup>1</sup> *PSMA*=antígeno prostático específico de membrana; HPB=hiperplasia prostática benigna; NIP=neoplasia intraepitelial; RT=transcrição reversa; B2M= $\beta$ -2-microglobulina; CaP=adenocarcinoma ou câncer de próstata

## 2. INTRODUÇÃO

Atualmente, têm se tornado cada vez mais claro que a próstata constitui um dos maiores problemas clínicos em homens com idade superior a 50 anos. O câncer de próstata é atualmente o segundo tipo de câncer que mais atinge homens, sendo superado somente pelo câncer de pele, não melanoma. (Walsh & Worthington, 1998). Segundo as estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil, do Instituto Nacional de Câncer, deverão ocorrer 32.240 novos casos de câncer de próstata e 8.230 mortes por este câncer em 2003. Enquanto a incidência está ligada às características demográficas da população, a alta taxa de mortalidade é causada pelo retardo de diagnóstico, o que favorece a ocorrência de tumores com capacidade de invasão local e de metástase. (INCA, 2003; Poste & Fidler, 1980).

A identificação e caracterização de novos antígenos ou a expressão de genes específicos ao câncer de próstata podem prover novos biomarcadores e também fornecer instrumentos para o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento (Bussemakers *et al.*, 1999).

O *PSMA* (antígeno prostático específico de membrana), uma proteína transmembrana tipo II, é altamente expresso em carcinomas prostáticos e apresenta baixa ou nenhuma expressão em hiperplasias prostáticas benignas (HPB) (Israeli *et al.*, 1994). Este antígeno foi primeiramente descrito por Horoszewicz *et al.* (1987) usando o anticorpo monoclonal 7E11-C5 produzido contra linhagens de células de adenocarcinoma prostático. O gene *PSMA* está localizado no cromossomo 11 (Rinker-Schaeffer *et al.*, 1995), mais exatamente na região 11p11.2 (Leek *et al.*, 1995), consiste de 18 íntrons e 19 exons que constituem aproximadamente 60kb de DNA genômico (O'Keefe *et al.*, 1998), apresenta um RNAm de 2.65 kb e codifica uma proteína de 750 aminoácidos, apresentando uma estrutura constituída de três partes: uma região interna com 19 aminoácidos, uma região transmembrana com 24 aminoácidos e uma região externa com 707 aminoácidos (Llanes *et al.*, 2002).



O *PSMA* atua tanto como uma neurocarboxipeptidase como uma folato hidrolase, estando envolvido na regulação neuroendócrina do crescimento e diferenciação da próstata (Pinto *et al.*, 1996). Os folatos são famílias de vitaminas necessárias à síntese de DNA e à transferência dos grupos metil no ciclo da metionina (Selhub & Rosenberg, 1996). As implicações da localização intracelular de folato hidrolase ou carboxipeptidase são de extrema importância, já que as células normais retêm folato intracelularmente formando poligamaglutamatos. O *PSMA* remove o radical gama, levando a célula prostática normal a uma deficiência de folato, o que pode induzir ao câncer (Tasch *et al.*, 2001), tanto por meio da elevação da taxa de danos ao DNA devido à alta incorporação de uracila ao invés de timina, já que o folato é responsável pela doação de um grupo metil à uracila, convertendo-a em timina, que é usada para síntese e reparo de DNA (Duthie *et al.*, 2002), como por meio da alteração da metilação do DNA, pois o folato também é responsável pela síntese de metionina e S-adenosil-metionina, requeridos para a manutenção do padrão de metilação do DNA, que determina a expressão gênica e conformação do DNA, sendo ambos fatores de risco ao desenvolvimento de câncer (Fenech, 2001).

Devido a superexpressão do *PSMA* na membrana das células tumorais, esta proteína poderá servir como alvo terapêutico em estratégias imunológicas e genéticas. Uma grande variedade de aplicações clínicas utilizando o *PSMA* vem sendo desenvolvida, podendo haver um grande impacto no diagnóstico do câncer de próstata e no tratamento dos pacientes.

O RT-PCR semiquantitativo 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, o qual é utilizado para normalizar os níveis de expressão do gene alvo e também para caracterizar a qualidade do RNA (Favre *et al.*, 1997; Pernas-Alonso *et al.*, 1999).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção das amostras e extração do RNA**

As amostras foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia, mediante autorização dos pacientes, os quais assinaram Termo de Consentimento, e aprovação do Comitê de Ética da UFU. Após coleta, o material foi levado para o Laboratório de Genética Molecular da UFU e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior processamento. Neste estudo, foram utilizados fragmentos provenientes de 39 pacientes, sendo que 25 foram submetidos à prostatectomia radical e apresentavam adenocarcinoma de próstata e 14 submetidos à ressecção transuretral da próstata (RTU) e apresentavam hiperplasia prostática benigna (HPB). A média de idade dos pacientes com adenocarcinoma foi de  $66 \pm 6,2$  anos e dos pacientes com HPB foi de  $72 \pm 10,2$  anos ( $\pm$  desvio padrão).

O RNA total dos fragmentos foi extraído utilizando reagente TRIZOL (Invitrogen) conforme protocolo otimizado no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia e seguindo-se as recomendações do fabricante.

#### **3.2. RT-PCR semiquantitativo**

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando  $1\mu\text{g}$  de RNA total, 20 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Pharmacia), 1X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Pharmacia),  $200\mu\text{M}$  de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e  $0,5\mu\text{g}$  de hexâmeros como primers randômicos. O volume final de cada reação foi completado para  $20\mu\text{l}$  de água tratada com DEPC. A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora e aquecida a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para inativação da enzima MMLV-RT. O produto da transcrição reversa (cDNA) foi co-amplificado por PCR utilizando-se dois diferentes pares de primers, desenhados para terem



homologia com o gene *PSMA* e o gene constitutivo *B2M*. O par de primers para o gene *PSMA* foi desenhado por meio do software Primer Design, versão 2.0 e do software Oligo Tech, versão 1.0, sendo o direto (5'- GAA TGC CAG AGG GCG ATC TA - 3') e o reverso (5'- TTC TAG GAG CTT CTG TGC ATC ATA GTA TCC - 3'), anelando na junção dos exons 4 e 5 e na junção dos exons 7 e 8 respectivamente, amplificando um fragmento de 419 pb. Para amplificação do gene *B2M*, os primers utilizados foram: forward (5'-AGC AGA GAA TGG AAA GTC AAA-3') e reverso (5'-TGT TGA TGT TGG ATA AGA GAA-3'), que se ligam nos exons 2 e 4 respectivamente, amplificando um fragmento de 534pb.

Para cada reação de PCR, 4 µl de cada cDNA, sintetizado na transcrição reversa, foram co-amplificados em um volume final de 25 µl, contendo 200 µM de dNTPs (Amersham Pharmacia); 7,5 pmoles do par de primer da *B2M* e 10 pmoles do par de primer *PSMA*; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega); 1,5 unidades de Taq DNA polimerase (Promega); 1X do tampão da Taq (Promega) e o volume final foi completado com água ultrapura. A mistura foi aquecida a 95°C por 3 minutos, seguida de 29 ciclos a 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Reações de controle negativo sem o cDNA foram incluídas para monitorar possíveis contaminações dos reagentes.

Para realização do semiquantitativo, foi necessário determinar o número ideal de ciclos de PCR para que a co-amplificação estivesse na fase exponencial, e em fases de otimização para a RT-PCR multiplex semiquantitativa, o número decidido foi experimentalmente determinado.

Após a co-amplificação, 10 µl de cada produto de PCR misturados com *loading dye* (12.5 mg de azul de bromofenol, 4,0 g de sacarose e 5,0 ml de água) foram analisados por eletroforese em gel 1,5% de agarose por 1,5 hora a 100 V em tampão TBE 0,5X (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados com 0,5 mg/ml de brometo de etídio. Os amplicons gerados a partir das amostras de adenocarcinoma e de

HPB, tanto para o gene *PSMA* como para o gene *B2M* foram analisados e quantificados quando às suas densidades óticas no programa *Image Master VDS Software*, versão 2.0 e as leituras foram submetidas à razão de RNAm *PSMA*/ RNAm *B2M* para obter a abundância relativa do gene *PSMA* nas amostras.

### 3.3. Análises Estatísticas

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para testar normalidade das amostras de adenocarcinoma prostático e HPB (n=39). O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para verificar se a média das duas regiões de adenocarcinoma é estatisticamente diferente da média das duas regiões das amostras de HPB. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes. Além disso, foram determinados os coeficientes de correlação simples para a abundância relativa total do gene e níveis de PSA sérico. Para a análise do risco relativo ao desenvolvimento do câncer de próstata (Odds Ratio) foi determinado um valor de corte.



#### 4. RESULTADOS

O padrão de RNA obtido para as amostras foi de boa qualidade, apresentando baixa ou nenhuma contaminação com DNA, o que permite a realização de pesquisas com expressão gênica. As amplificações das amostras provenientes de pacientes com CaP e HPB para os genes *PSMA* and *B2M* são mostradas nas figuras 1 e 2 respectivamente, onde é possível verificar que a expressão do gene é muito variável em amostras de pacientes com adenocarcinoma e HPB.

A razão  $\text{RNAm } PSMA / \text{RNAm } \beta 2M$  não segue uma distribuição normal ( $n = 39$ ;  $p < 0.0001$ ), de acordo com o teste de Shapiro-Wilk.

O teste de Kruskal-Wallis para a média dos fragmentos prostáticos benignos e malignos mostrou que as amostras vêm de populações diferentes, com  $p < 0.05$ .

Os coeficientes de correlação entre CaP e HPB e entre a expressão relativa do gene *PSMA* e o nível de PSA sérico foram 0.343 e 0.412 respectivamente, indicando uma correlação entre o aumento na expressão do gene *PSMA* em pacientes com adenocarcinoma prostático com o aumento dos níveis de PSA sérico. Não houve correlação significativa entre a expressão do gene *PSMA* com os demais dados clínicos (Gleason, TNM, Whitmore & Jewett). As análises estatísticas demonstraram que não há diferença significativa na abundância relativa do gene *PSMA* entre as regiões tumorais R1 e R2 ( $p=0.2129$ ).

Os resultados evidenciam um risco aumentado em 6 vezes ao desenvolvimento do câncer de próstata quando a expressão se torna igual ou maior a 0.4. O risco relativo ao câncer de próstata relacionado ao aumento da abundância relativa do gene *PSMA* encontra-se na figura 3.

A utilização do gene *PSMA* como um teste diagnóstico clínico, tendo como valor de corte a abundância relativa  $\geq 0.4$  apresentou 64% de eficiência, 87% de sensibilidade, 50% de

especificidade e 86% de valor preditivo negativo. Para o cálculo, os dados de expressão média foram utilizados. (Tabela 1).



## 5. DISCUSSÃO

RT-PCR é um método rápido para se estimar a quantidade relativa de uma mensagem em várias populações de RNA (Santagati *et al.* 1997). A transcrição reversa usando primers hexanucleotídeos randômicos aqui desenvolvida, e como descrito por Santagati *et al.* (1997) e por Pernas-Alonso *et al.* (1999), foi mais eficiente para a análise dos transcritos de ambos os genes, *PSMA* and  $\beta 2M$ , porque foi feita de uma simples preparação de RT. Além disso, o uso de um controle endógeno da RT-PCR (*B2M*) para a avaliação da expressão do gene *PSMA* foi eficiente na minimização das variações entre tubos, capazes de interferir no resultado final.

A amplificação do gene *B2M* foi utilizada para avaliar a integridade do RNAm e também como referência para permitir a semi quantificação do RNAm do gene *PSMA*. A co-amplificação foi possível devido ao fato de que este gene constitutivo não apresenta uma expressão acentuada, pois se isso acontecesse, o mesmo número de ciclos não seria possível, uma vez que o gene *B2M* alcançaria a fase platô antes do gene *PSMA*.

O estudo semiquantitativo (RT-PCR) aqui desenvolvido mostrou que há uma associação positiva entre o aumento na expressão do gene *PSMA* e o desenvolvimento do câncer de próstata, sugerindo que o *PSMA* está envolvido no desenvolvimento deste tumor. Wright *et al.* (1995) demonstraram que amostras de tecidos com HPB apresentam expressão de *PSMA* baixa ou ausente, e que tecidos prostáticos malignos apresentam a maior expressão de *PSMA*, corroborando com este estudo. Renneberg *et al.* (1999) mostraram que células derivadas de tecidos com HPB são negativas para a expressão do gene *PSMA*. Observações de que o *PSMA* aparenta ser diferentemente expresso em HPB e CaP (Wright *et al.*, 1996; Kawakami & Nakayama, 1997; Sweat *et al.*, 1998 Beckett *et al.*, 1999) sugerem que o *PSMA* pode ser um marcador eficiente para diferenciar CaP de HPB, reduzindo o número de biópsias desnecessárias.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beckett ML, Cazares LH, Vlahou A, Schellhammer PF, Wright, GL (1999) Prostate-specific membrane antigen levels in sera from healthy men and patients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer. *Clin Cancer Res* 5: 4034-4040.
- Bussemakers MJ, Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB (1999) DD3; A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 59:5975-5979.
- Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, Pirie L, Grant G (2002) Impact of folate deficiency on DNA stability. *J. Nutr* 132:2444-2449.
- Favre N, Bordmann G, Rudin W (1997) Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *J Immunol Methods* 204:57-66.
- Fenech M (2001) The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 475:57-67.
- Horoszewicz JS, Kawinski E, Murphy GP (1987) Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Res.* 7:927-936.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. (2003) Disponível: <http://www.inca.gov.br/cancer/prostata>. Acesso em: 01 Nov. 2003.
- Israeli RS, Powell CT, Corr JG, Fair WR, Heston WDW (1994) Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 54:1807-1811.
- Kawakami M, Nakayama J (1997) Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer Res* 57:2321-2324.



Leek J, Lench N, Maraj B, Bailey A, Carr IM, Andersen S, Cross J, Whelan P, MacLennan KA, Meredith DM, Markham AF (1995) Prostate-specific membrane antigen: evidence for the existence of a second related human gene. *Br J Cancer* 72:583-588.

Llanes L, Ferruelo A, Páez A, Gómez JM, Moreno A, Berenguer A (2002) The clinical utility of the prostate specific membrane antigen reverse-transcription/polymerase chain reaction to detect circulating prostate cells; an analysis in healthy men and women. *Int J Urol* 89:882-885.

O'Keefe DS, Su SL, Bacich DJ, Horiguchi Y, Luo Y, Powell CT, Zandvliet D, Russel PJ, Molly PL, Nowak NJ, Shows TB, Mullins C, Vonder Haar EA, Fair WR, Heston WDW (1998) Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. *Biochim Biophys Acta*. 1443:113-127.

Pernas-Alonso R, Morelli F, Porzio U, Perrone-Capano C (1999) Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal RNAm. *Brain Res Protoc* 4:395-406.

Pinto JT, Suffoletto BP, Berzin TM, Quiao CH, Lin S, Tong WP, May F, Mukherjee B, Heston WDW (1996) Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2:1445-1451.

Poste G, Fidler IJ (1980) The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*. 283:139-146.

Rinker-Schaeffer CW, Hawkins AL, Su SL, Israeli RS, Griffin CA, Isaacs JT, Heston WDW (1995) Localization and Physical Mapping Of the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSM) Gene to Human Chromosome 11. *Genomics* 30:105-108.

Renneberg H, Friedetzky A, Konrad L, Kurek R, Weingärtner K, Wennemuth G, Tunn UW, Aumüller G (1999) Prostate specific membrane antigen (PSM) is expressed in various human tissues: implication for the use of PSM reverse transcription polymerase chain reaction to detect hematogenous prostate cancer spread. *Urology Res* 27:23-27.

Santagati S, Garnier M, Carlo P, Iolani E, Picatti GB Maggi A (1997) Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)- based methods. *Brain Res Protoc.* 1:217-223.

Selhub J, Rosenberg LH (1996) Folic acid. In: Ziegler, E.E. and Filer, L.J. Present knowledge of nutrition. ILSI Press. 206-219.

Sweat SD, Pacelli A, Murphy GP, Bostwick DG (1998) Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastasis. *Urology.* 52:637-640.

Tasch J, Gong M, Sadelain M, Heston WDW (2001) A unique folate hydrolase: prostate – specific membrane antigen (PSMA): A target for immunotherapy? *Crit Rev Immunol* 21:249-261.

Walsh PC; Worthington JF (1998). *Doenças da Próstata: um guia para os homens e para as mulheres que os amam.* Martins Fontes, São Paulo, 420pp.

Wright GL, Haley C, Beckett ML, Schellhammer PF (1995) Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign and malignant prostate tissues. *Urol Oncol* 1:18-28.

Wright GL, Grob BM, Haley C, Grossman K, Newhall K, Petrylak D, Troyer J, Konchuba A, Schellhammer PF, Moriarty R (1996). Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology.* 48:326-334.

Xiao Z, Adam BL, Cazares LH, Clements MA, Davis JW, Schellhammer PF, Dalmasso EA, Wirht GL (2001) Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease. *Cancer Res* 61:6029-6033.



## 7. TABELA

**TABELA 1:** Risco relativo ao câncer de próstata relacionado ao aumento na abundância relativa média do gene *PSMA*.

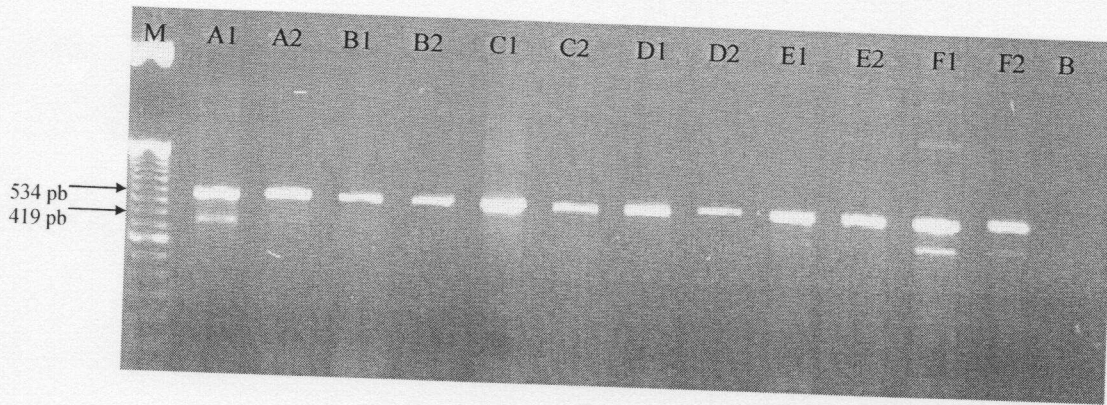
Classe	Abundância relativa do gene <i>PSMA</i>	
	< 0,4	≥ 0,4
HPB (n)	12	2
CaP (n)	12	13
OR	1,00	6,5
95 % IC	(1,20- 35,23)	

OR – odds ratio (risco relativo) IC – intervalo de confiança.

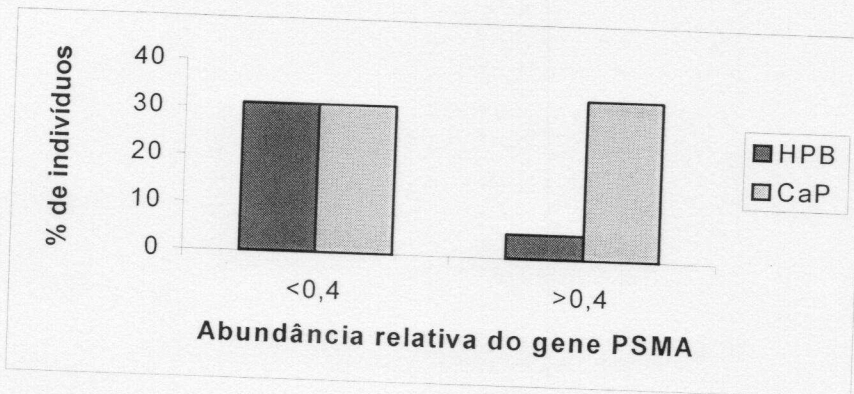
8. FIGURAS



1



2



3



## 9. LEGENDAS

**FIGURA 1:** Padrão eletroforético, em gel de agarose 1,5%, das duas regiões prostáticas (R1 e R2) de pacientes com adenocarcinoma que foram submetidos a prostatectomia radical. O fragmento do gene *PSMA* corresponde a 419pb e o gene  $\beta 2M$  corresponde a 534pb. M= marcador de 50pb. B= controle negativo.

**FIGURA 2:** Padrão eletroforético, em gel de agarose 1,5%, de pacientes com hiperplasia prostática benigna (HPB). O fragmento do gene *PSMA* corresponde a 419pb e o gene  $\beta 2M$  corresponde a 534pb. M= marcador de 50pb. B= controle negativo.

**FIGURA 3:** Gráfico da abundância relativa média do gene *PSMA* versus a frequência de indivíduos com hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP).

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

### Scope and policy

**Genetics and Molecular Biology** (formerly named *Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics* - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

The use of registered names and trademarks does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

### Submission of papers

#### 1. Manuscripts should be submitted to:

*Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief*

*Genetics and Molecular Biology*

*Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736*

*14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil*

#### 2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere;

- a. Three copies of the manuscript and figures.
- b. Two copies of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
- c. A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected; if a disk arrives damaged, a new disk will be requested, causing delays in publication. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIF or JPG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.g). Disk must be labeled with the first author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

#### 3. Categories of Contribution:

##### 3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

- a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department,



institution, and city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, and arranging for the payment of color illustrations and author alterations charges.

**b) The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

**c) The text:** must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et al". Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name ("et al" should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should be in the Title.

The text includes the following elements:

*Introduction* – Description of the background that led to the study.

*Material (or Subjects) and Methods* – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

*Results* – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

*Discussion* – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation. Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

**d) The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

**e) The References Section:** citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; journal titles must be abbreviated according to Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>).

*Sample journal article citation:*

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 1:103-120.

*Sample book citation*

Salzano FM and Freire-Maia N (1967) Populações Brasileiras. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.

Dobzhansky T (1951) Genetics and Origin of Species. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

*Sample chapter-in-book citation:*

Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da Cunha AB (eds) Elementos de Genética. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

*Sample abstracts in meeting citation:*

Basile R (1973) Cromossomos Politênicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de Rhyncosciara. Ciênc e Cult 25 (suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

*Sample Thesis/Dissertation citation:*

Frota-Pessoa O (1953) Revision of the Tripunctata group of Drosophila with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

**f) Tables** each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes, typed directly below the table, should be indicated in lowercase superscript numbers.

**g) Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. Three sets of illustrations of the highest quality must be provided, one original and two copies in glossy paper. If you have created figures electronically, submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIF or JPG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 ppi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600–1200 ppi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author, and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

**h) Nomenclature:** current standard international nomenclature should be adhered to.

**i) Sequences** may appear in text or in figure. DNA must be sequenced on both strands. DNA, RNA, or protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into appropriate data bank and the accession number must be provided before publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

**j) Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

**k) Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a brief



statement that the work was approved by the institutional review board. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

**3.2 Short Communications** present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. Their format is that of full-length article. The text must be kept to a minimum.

**3.3 Letters to the Editor** relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

**3.4 Review Articles** are welcome.

**3.5 Book Reviews:** publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal.

**3.6 History, Story and Memories:** accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

**4. Proofs:** Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

---

© 2002 *Sociedade Brasileira de Genética*  
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736  
14025-670 Ribeirão Preto SP Brazil  
Tel./Fax: +55 16 621-8540