

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise semi-quantitativa da expressão simultânea do gene EF1A/  
PTI-1 em sangue periférico de pacientes com Hiperplasia  
Prostática Benigna e Câncer de Próstata

Isabela Cardoso Fontoura

Monografia apresentada à coordenação do Curso de  
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de bacharel  
em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG  
Set/ 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise semi-quantitativa da expressão simultânea do gene EF1A/  
PTI-1 em sangue periférico de pacientes com Hiperplasia  
Prostática Benigna e Câncer de Próstata

Isabela Cardoso Fontoura

Dr. Luiz Ricardo Goulart

Monografia apresentada à coordenação do Curso de  
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de bacharel  
em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG  
Set/ 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

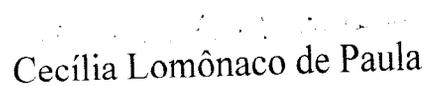
Análise semi-quantitativa da expressão simultânea do gene EF1A/  
PTI-1 em sangue periférico de pacientes com Hiperplasia Prostática  
Benigna e Câncer de Próstata

Isabela Cardoso Fontoura

Luiz Ricardo Goulart  
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas em

        /        /        

  
Cecília Lomônaco de Paula

Uberlândia – MG  
Set/2006

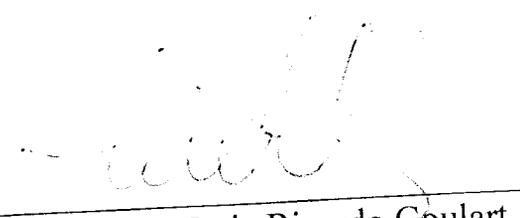
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise semi-quantitativa da expressão simultânea do gene EF1A/  
PTI-1 em sangue periférico de pacientes com Hiperplasia Prostática  
Benigna e Câncer de Próstata

Isabela Cardoso Fontoura

Aprovado pela Banca Examinadora em: 11/09/2006

Nota: 10,0

  
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Uberlândia, \_\_\_\_\_, de Setembro, 2006

## AGRADECIMENTOS:

Primeiramente a Deus, por ter me dado a oportunidade de estar aqui cumprindo esta etapa tão importante na minha vida.

Ao Prof. Luiz Ricardo, por me abrir as portas do seu Laboratório, dando início a realização de um sonho, o qual foi ele mesmo quem plantou em mim. E por sempre ter confiado em meu trabalho.

A todos os colegas de Laboratório Carlos, Guilherme, Juliana Franco, Andréia, Ana Paula Freschi, Rone, Paula, Fausto, Alexandra, Renata, Fred, Waldesse, Jaqueline, que sempre estiveram prontos a me ensinar, me ajudar, e sempre estiveram com um sorriso amigo quando precisei.

À turma do CaP, Paula Cristina, Thaise (minha sempre companheira de Laboratório), Karina (ex CaP), Ana Paula Carneiro, Carol, Washington, e agora Fabiana, que foram meus companheiros de trabalho durante esses dois anos e meio que fiquei aqui, e que serão inesquecíveis!!!

À Adriana, também do grupo CaP, que sem dúvida foi a pessoa com quem mais aprendi dentro do Laboratório. Não só fundamentos de biologia molecular, mas também muitas e muitas coisas da vida. Dri, te admiro muito. Valeu por tudo!!

À Elis, agora recentemente ex CaP, que muito me ajudou a fazer este trabalho, sempre me incentivou e me apoiou. Muito obrigada por tudo.

Aos outros companheiros de laboratório, que chegaram por último, mas mesmo assim, já fazem parte da minha história, e que de alguma forma, mesmo que com um sorriso, estiveram sempre ao meu lado.

Aos meus amigos da graduação, Fernanda, Lara, Dri, Dani, Patrícia, Michele, Raoni, que foram meus companheiros durante os quatro anos da graduação, e continuarão para toda a vida. Amo muito e sinto muita saudade de vocês!

Aos meus avós e meu tio Eduardo, que abriram as portas de sua casa e me acolheram como filha, quando me mudei para estudar. Sem esta acolhida, não sei se estaria aqui hoje. Não tenho nem palavras para agradecer.

Ao meu sogro Cláudio e minha sogra Ângela, que são como meus terceiros pais. Sempre me aconselhando, me apoiando, me ajudando, me acolhendo e me dando forças

quando preciso. Também ao meu cunhado Fred que me acudiu no computador sempre que precisei.

Ao meu namorado, Cristiano, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida desde o primeiro dia em que ficamos juntos. Pelos conselhos, ajudas, puxões de orelha, pelo carinho, pelo amor, toda a compreensão e dedicação para comigo. E o mais importante, por acreditar sempre que sou sempre capaz! Neném, Te amo muito!

À minha família, meu pai Homero, que sempre me deu forças para trilhar este caminho, e que sempre se orgulhou muito de tudo que eu sou, tudo que consegui conquistar com o apoio dele, e com meu próprio esforço.

À minha mãe Naia, que, assim como meu pai, sempre esteve ao meu lado, em qualquer ocasião, hora, ou motivo. Sempre me consolando nos momentos de dificuldade, me ouvindo, me apoiando, me alegrando, e acreditando sempre em mim. Amo muito vocês! Vocês são a razão da minha vida.

Aos meus dois irmãos, Leandro e Fernando, que são duas paixões da minha. Pelo ciúme, pelo orgulho que sentem de mim, pelo carinho, pelos momentos de alegria e de brincadeiras que sempre vivemos juntos. Sinto muita falta de vocês!

Por fim, gostaria de agradecer a todos os funcionários da UFU, que colaboram para manter tudo sempre limpinho, organizado, à Marlene, que cuida de toda a nossa papelada;

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma maneira para a minha formação profissional.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	01
1.1. A Próstata .....	01
1.2. Algumas patologias da Próstata .....	02
1.3. Diagnóstico Clínico .....	04
1.4. O Gene EF1A .....	05
1.5. O Gene PTI-1 .....	05
1.6. Técnicas utilizadas no estudo .....	06
Transcrição Reversa (RT) .....	06
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	06
1.7. Objetivos .....	08
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	08
2.1. Obtenção das amostras e extração do RNA total .....	08
2.2. Amplificação dos fragmentos .....	09
2.3. Análise semi-quantificativa por Densitometria Óptica.....	10
2.4. Análises Estatísticas .....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
5. BIBLIOGRAFIA .....	17
6. ANEXOS.....	23

## RESUMO<sup>1</sup>

O desenvolvimento de diagnósticos moleculares é de suma importância para o combate ao câncer de próstata. Baseia-se na busca por genes específicos que possam servir como indicadores do estado de saúde da Próstata. Entre os possíveis candidatos, destaca-se o gene EF1A (Elongator Factor 1), que codifica uma proteína responsável pela incorporação correta dos aminoácidos durante o processo de elongação da proteína, além de exercer outras funções como a de apoptose. O presente trabalho teve o objetivo de verificar se os níveis de expressão desse gene é um bom modelo molecular para auxiliar no diagnóstico clínico do Câncer de Próstata. Foi realizado uma análise semi-quantitativa da expressão do gene EF1A em sangue de pacientes com Câncer de Próstata (CaP), Hiperplasia Protática Benigna (HPB) e Controle Saudável. O RNA foi extraído em duplicata de cada paciente e, em seguida, realizou-se uma RT-PCR, com um par de primers homólogo ao gene EF1A e outro par homólogo ao gene B2M. Os amplicons foram quantificados por densitometria ótica, e submetidos a razão RNAm EF1A/ RNAm B2M obtendo-se a abundância relativa do gene alvo. Os resultados mostraram que houve uma diminuição nos níveis de expressão do gene EF1A de acordo com o aparecimento do Câncer, contrastando com dados da literatura. Este contraste pode ser devido à função apoptótica também postulada ao EF1A, pois quando sua expressão está alta como no caso da expressão no grupo HPB, estas células se encontram em estágio proapoptótico. Já quando sua expressão é baixa, como é o caso dos pacientes do grupo CaP, as células estão em função antiapoptótica. O caráter preliminar deste trabalho impossibilita a confirmação desses achados, mas, por outro lado, evidencia as potencialidades deste tipo de estudo.

**Palavras-chave:** Câncer de próstata; EF1A; RT-PCR

<sup>1</sup> PTI-1=Prostate Tumor Inducing 1; EF1A= Fator de Elongação 1 A; CaP= Câncer de Próstata; HPB= Hiperplasia Prostática Benigna; RT-PCR= Transcrição Reversa-Reação em cadeia da Polimerase; RNAm: RNA mensageiro

# 1. INTRODUÇÃO:

## 1.1 A Próstata:

A próstata é uma glândula constituída de 30% de tecido fibromuscular e 70% de tecido glandular que se localiza na pelve circundando a parte posterior da uretra masculina (TANAGHO, 1992) (Fig. 01).

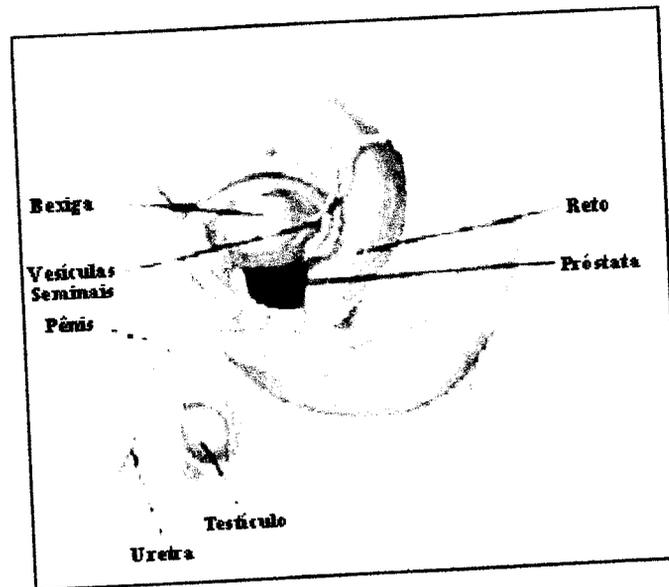


Figura 01. Localização da glândula prostática (INCA, 2006).

Segundo Coffey (1992), a próstata é anatomicamente dividida em 5 Zonas (Fig. 02)

- Zona fibromuscular anterior: composta praticamente por músculo liso.
- Zona Periférica: representa a maior subdivisão anatômica, contendo 75% do tecido glandular. Este é o local onde quase todos os carcinomas se desenvolvem e, por isso, é um alvo importante durante a biópsia.
- Zona Central: contém os 25% do tecido glandular restante e é incomum à carcinogênese.
- Zona pré-prostática: funciona como um esfíncter durante a ejaculação para prevenir o refluxo do líquido seminal para a bexiga.
- Zona de transição: é o local de origem da Hiperplasia Prostática Benigna.

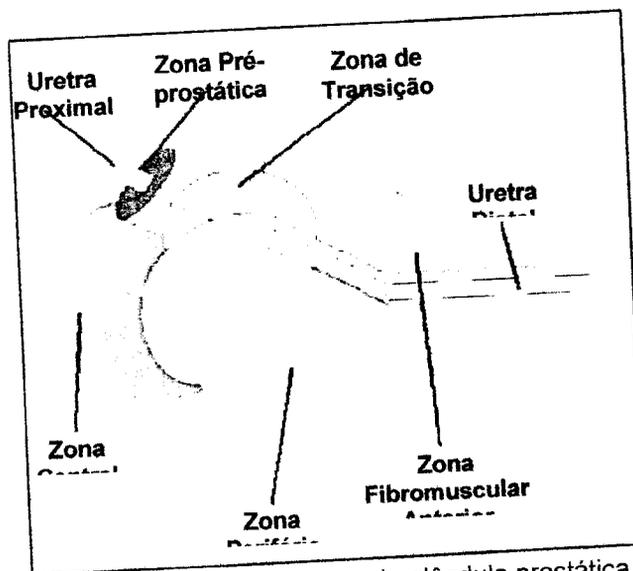


Figura 2. Divisão anatômica da glândula prostática

### 1.2. Algumas Patologias da Próstata:

A homeostase desta glândula é mantida pelo balanço entre as ações dos fatores que estimulam e dos que restringem o crescimento celular. A falta de controle entre esses mecanismos pode resultar em instabilidade genética com alterações nos processos de crescimento das células (GRIFFITHS & MORTON, 1999).

Portanto, anormalidades no crescimento e/ou infecções neste órgão causam algumas das doenças mais comuns em homens com idade superior a 50 anos, como as Prostatites, a Hiperplasia Prostática Benigna e o Câncer de Próstata (SROUGI & CURY, 1998). Estas doenças apresentam grande significado clínico, não só pelas suas conseqüências mas, também, pela alta freqüência com que se manifestam (SROUGI & CURY, 1998).

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e o Câncer de Próstata (CaP) são as duas principais patologias da glândula prostática. São originadas por alterações que resultam em distúrbios do crescimento e/ou da diferenciação celular (BOGLIOLO, 1998).

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é um aumento no volume da próstata, resultante de um aumento das glândulas periuretrais. Não resulta de uma simples hipertrofia, mas provém de vários mecanismos interativos hormonais que levam a secreta fatores de crescimento interferindo no crescimento das células epiteliais (COFFEY, 1992; WALSH, 1992; SROUGI & CURY, 1999).

A HPB ocorre em quase 80% dos homens por volta dos 80 anos, sendo responsável por infecções urinárias a partir dos 50 anos de idade (WALSH & WORTHINGTON, 1998).

O Câncer de Próstata corresponde a um aumento na taxa de proliferação celular e diminuição na taxa 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 clones autônomos de células malignas (GRIFFITS & MORTON, 1999).

Acredita-se que o Câncer de Próstata se desenvolva no período de maior atividade androgênica, ou seja, entre os 35 e 45 anos. A progressão é lenta, bem como a redução das quantidades hormonais (SADI, 1975).

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

Vários fatores esporádicos têm sido associados ao desenvolvimento do CaP, como dietas ricas em gorduras, o fumo, a exposição à radiação, a obesidade, a altura e o peso ao nascer, a presença de HPB, o consumo de álcool, baixos níveis de atividade física (WALSH & WORTHINGTON, 1998), presença de neoplasia intraepitelial (NIP) (DOWNING et al, 2001).

Em função de suas altas taxas de incidência e mortalidade, o CaP representa um sério problema de saúde pública no Brasil. É o segundo tipo de câncer mais comum em homens, só sendo superado pelo câncer de pulmão, inclusive em relação ao número de óbitos. A incidência está ligada às características demográficas da população, enquanto a alta mortalidade é causada pelo retardo no diagnóstico, favorecendo, assim, a ocorrência de tumores com alta capacidade biológica de invasão local e de disseminação para outros órgãos (metástase). Quando tratados em fase metastática, tais tumores são praticamente incuráveis (INCA, 2006).

A ocorrência do Câncer de Próstata aumenta com a idade, mais rapidamente do que qualquer outro tipo de câncer. Assim, o aumento de sua incidência é também, uma decorrência do aumento de sua expectativa de vida verificada ao longo do século (COFFEY, 1993; ISAACS, 1997; CHAN et al, 1998).

Nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, esse tipo de câncer é o segundo mais incidente, enquanto no Sul ocupa a primeira posição (INCA, 2006). No Nordeste é o terceiro e no Norte o quarto (KLIGERMAN, 2001). No Triângulo Mineiro, dados não oficiais apontam o CaP como

um dos mais diagnosticados. Isso se deve ao fato da existência de um centro de tratamento específico na região, o que aumenta o número de diagnósticos realizados.

### 1.3. Diagnóstico Clínico:

O rastreamento das anomalias prostáticas é realizado principalmente por quatro etapas: o exame físico (toque retal), dosagem do antígeno prostático específico (PSA), ultrassonografia transretal da próstata (USTR) e biópsias. A sensibilidade do toque retal varia de 40 a 80%, enquanto as dosagens de PSA são ainda incoerentes ou duvidosas (STAMEY & MCNEAL, 1992).

O estadiamento clínico e o resultado histopatológico dos pacientes com CaP são de fundamental importância para o planejamento terapêutico. No estadiamento clínico é utilizada a classificação de União Internacional Contra o Câncer (UICC) -**Sistema TNM** (*Tumor-Node-Metastasis*) (STAMEY; McNEAL, 1992). Estas classificações fornecem informações sobre o desenvolvimento do tumor e o grau de acometimento do mesmo (SROUGI, 1998).

A análise histopatológica da neoplasia é baseada na escala de Gleason (1997). Os parâmetros deste sistema são: o padrão glandular e a sua relação com o estroma prostático. Os tumores são classificados em cinco graus, sendo de grau um as lesões mais diferenciadas e as de grau cinco as mais indiferenciadas. Como o Adenocarcinoma da Próstata apresenta mais de um padrão histológico, o diagnóstico final da escala Gleason é dado pela soma de graus do padrão primário (área predominante) e do padrão secundário (área de menor representatividade). Assim, as neoplasias mais diferenciadas são classificadas como grau 2 (1+1) e as mais indiferenciadas como grau 10 (5+5); (STAMEY & MCNEAL, 1992; ISAACS, 1997; SROUGI, 1998).

A compreensão dos complexos mecanismos genéticos que resultam nas patologias prostáticas pode auxiliar a detecção, o estadiamento, o prognóstico e o tratamento, principalmente do Câncer. A cura do Câncer de Próstata é, geralmente, limitada àqueles pacientes com a doença confinada ao órgão, principalmente quando em estágio inicial. Assim, é de grande importância o diagnóstico em estágios precoces, quando há enormes chances de cura, o que não acontece quando a doença apresenta metástase, ou seja, espalha-se para outros órgãos (WALSH & WORTHINGTON, 1998).

Inúmeros esforços têm sido feitos com intuito de avaliar e descobrir novos marcadores moleculares e terapêuticos para pacientes com essa doença. A identificação e caracterização de

novos antígenos ou genes específicos ao Câncer de Próstata podem prover biomarcadores e também fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento (BUSSEMAKERS et al, 1999).

#### 1.4. O Gene EF1A:

O Fator de Elongação 1 A, que é codificado pelo gene EF1A, é uma proteína responsável pelo transporte de aminoácidos do sítio aa-tRNA para o complexo de elongação da síntese de proteínas (NEGRUTSKY et al, 1998). A sua expressão já foi detectada em câncer de pâncreas, cólon, mama e pulmão (GRANT et al, 1992).

Outras funções também foram postuladas ao Fator de Elongação 1 A, como a transdução celular, (YANG, 1994), o rearranjo do citoesqueleto (SHIINA et al, 1994; KURASSAWA, 1996), a função apoptótica (LAMBERTI et al, 2004) e transformação oncogênica ( GANGWANI et al, 1998). É superexpresso em células metastáticas quando comparado com células não-metastáticas, pois, nas primeiras, sua afinidade com a F-actina é reduzida, já que uma de suas funções é trabalhar no rearranjo do citoesqueleto (EDMONDS et al, 1996).

Modificações na maquinaria traducional das células, incluindo mudanças nos fatores de iniciação e elongação de proteínas em eucariotos, resultam em susceptibilidade à transformação e aquisição de propriedades transformantes e oncogênicas em células-alvo específicas (RIIS et al, 1990; SONENBERG, 1993). As caracterizações pós-transcricionais do gene eEF1A, associadas com transformação celular ou apoptose, poderia prover maiores informações para novas estratégias para diagnóstico e terapia do Câncer de Próstata (LAMBERTI, et al, 2004).

#### 1.5. O Gene PTI-1:

O gene PTI-1 (Prostate Tumour Inducing 1) é constituído de 2123 pb. Contém uma única região 5' de 630 pb não traduzível (5' UTR) que possui 85% de identidade com a região 23S do RNA ribossomal do *Mycoplasma hyopneumoniae*. Possui também uma região traduzível de 1493 pb com 97,7% de identidade com o EF1A. (SHEN et al, 1995).

A presença inesperada de um elemento homólogo ao *M. hyopneumoniae* levantou a hipótese de uma possível *cross-combination* com a bactéria. Contudo, esta pode ser uma seqüência que, simplesmente, faz parte do genoma humano (SU, et al, 1998). Análises de

seqüência do cDNA do PTI-1 no Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mostraram que a localização desse gene no genoma humano é, ainda, elusiva (MANSILLA et al, 2005).

Su e colaboradores (1998) mostraram que o oncogene *Prostate Tumor Inducing 1* (PTI-1) possui diferentes níveis de expressão em pacientes sem nenhuma anormalidade na próstata, linhagens de células cancerígenas, pacientes com carcinoma prostático e em sangue de pacientes com metástase de CaP. Com isso, demonstraram que o PTI-1 representa um marcador para detectar essa doença por meio de análises moleculares no sangue, sendo sensível e específico para diferentes estágios de progressão.

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).

Baseado na similaridade desse gene com o EF1A, sugere-se que o mecanismo da oncogenicidade do PTI-1 esteja envolvido na inibição ou interferência na integridade do processo de alongação durante a tradução, podendo interromper a função do Fator de Elongação 1 A levando a transformação de fenótipos para células cancerosas e/ou desordenar a tradução fiel de proteínas, por meio de alterações na organização do citoesqueleto ou no sinal de transdução celular (GOPALKRISHNAN et al, 1999; MARCHESI & NGO, 1993).

#### **1.6. Técnicas utilizadas para diagnóstico molecular:**

O desenvolvimento de diagnósticos alternativos é de suma importância para reduzir os altos índices de incidência e mortalidade por câncer de próstata. A seguir, estão descritas algumas técnicas que possibilitam um diagnóstico mais precoce do Câncer de Próstata.

##### **Transcrição Reversa (RT):**

Denomina-se transcrição reversa o processo no qual ocorre a síntese de moléculas de cDNA a partir de simples fitas de RNA. A primeira descrição dessa técnica ocorreu em 1987 (VERES et al, 1987), com a utilização de enzimas de retrovírus, a Transcriptase Reversa, para catalisar a síntese do cDNA.

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):**

A PCR é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática, *in vitro*, de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA Polimerase. A reação se baseia no anelamento de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizadas como iniciadores (primers) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes primers são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Cada ciclo de PCR envolve três passos: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA molde é desnaturada pela elevação da temperatura para 92-95°C. Na etapa de anelamento do primer, a temperatura é rapidamente reduzida para 35-60°C, dependendo essencialmente, do tamanho e da seqüência do iniciador utilizado. Isto permite a hibridação DNA-DNA, de cada primer com as seqüências complementares da região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada porção terminal 3' dos primers (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Vários ciclos repetidos permitem a amplificação do fragmento, cujo tamanho é limitado pelos iniciadores (WHITE et al, 1989).

As condições iniciais para a amplificação, tais como concentrações de MgCl<sub>2</sub> (co-fator da enzima), Taq (Enzima DNA polimerase), primers e a temperatura de anelamento do primer, devem ser definidas para cada par destes (PASSAGLIA & ZAHA, 1996).

O uso seqüencial da transcrição reversa e da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) tem permitido avanço nas pesquisas em biologia molecular, por apresentar uma alta sensibilidade e ser uma técnica rápida para o estudo da expressão gênica (FAVRE et al, 1997; SANTAGATI et al, 1997; CHEN et al, 1999; PERNAS-ALONSO et al, 1999; SEAH et al, 1999; DUMOULIN et al, 2000).

A RT-PCR semi-quantitativa é uma metodologia rápida e eficaz para estimar as quantidades relativas da expressão gênica em populações de RNA-mensageiros, utilizando-se de um gene constitutivo como controle interno da reação para normalizar os níveis de expressão do gene de interesse e, também, para monitorar a extensão da degradação das amostras de RNA, caracterizando a qualidade do material utilizado (FAVRE et al, 1997; SANTAGATI et al, 1997;

CHEN et al, 1999; PERNAS-ALONSO et al, 1999; SEAH et al, 1999; DUMOULIN et al, 2000; REGINATO & COUTINHO, 2001).

Os transcritos do gene que codificam para a  $\beta$ -2-microglobulina, actinas, enzimas diidrofolato redutase e gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) têm sido utilizados como controles internos para indicar resultados semi-quantitativos (SIEBERT & LARRIC, 1992; IGAZ et al, 1998).

A técnica de RT-PCR tem mostrado ser uma metodologia sensível para detecção da doença em estágios iniciais, em diversos tipos de tumores (GHOSSEIN et al, 1995). Esforços têm sido feitos no sentido de desenvolver RT-PCR para detectar células tumorais circulantes no sangue (CHRISTIANO et al, 2000).

### **1.7. Objetivos:**

O presente trabalho foi realizado com o intuito de verificar se a expressão do gene EF1A associado aos níveis de expressão do gene PTI-1, é uma boa estratégia para diferenciar pacientes com Câncer de Próstata, Hiperplasia Prostática Benigna e Controle saudável a partir de análises de RT-PCR semi-quantitativas em sangue periférico.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **2.1. Obtenção de amostras de sangue e extração de RNA:**

As amostras de sangue foram coletadas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia. Os pacientes assinaram um Termo de Consentimento autorizando o estudo (Anexo I), que passou previamente pela aprovação do Comitê de Ética da UFU. Neste estudo, foi utilizado sangue de 55 pacientes: 20 possuíam entre 13 e 26 anos e não apresentavam nenhuma anormalidade na próstata, representando o Controle Saudável (CS); 19 possuíam Câncer de Próstata (Grupo CaP) e foram submetidos à prostatectomia radical; os outros 16 apresentavam Hiperplasia Prostática Benigna (Grupo HPB) e foram submetidos à ressecção transuretral.

O RNA total das amostras foi extraído em duplicata, utilizando-se o protocolo otimizado no Laboratório de Genética Molecular da UFU (Anexo II).

A qualidade do RNA foi verificada de duas maneiras:

- Gel de agarose 1,5% em corrida por 1 hora a 100 volts em tampão TBE 0,5X (45mM Tris-borato, pH 8,0 e 10mM EDTA), corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml e visualizado por luz ultravioleta em sistema de videodocumentação VDS Image Master (Amersham Biosciences).
- Espectrofotômetro Ultrospech 1000 de luz ultravioleta (Amersham Biosciences) a um comprimento de onda de 260nm e 280nm.

## 2.2. Amplificação dos fragmentos:

Foi utilizada a técnica de RT-PCR para cada duplicata das amostras de RNA obtidas para cada paciente. Utilizou-se 1µg do RNA total, que foi submetido a uma reação contendo 20U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40U de MMLV-RT (Transcriptase Reversa) (Amersham Pharmacia), Tampão de MMLV-RT 1X (Amersham Pharmacia), 200mM de dNTPs (dGTPs, dATPs, dCTPs, dTTPs) e 0,5µg de hexâmeros como primers randômicos. O volume final de cada reação foi completado para 20µl de água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato). A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) a 37°C por 1 hora.

O produto de Transcrição Reversa (cDNA) foi amplificado por PCR utilizando-se dois diferentes pares de primers (tabela 1), um desenhado para ter homologia com uma região comum entre o gene EF1A e o gene PTI-1, produzindo um fragmento de 366 pb; e o outro com o gene constitutivo B2M, produzindo um fragmento de 534 pb. Este último foi usado para caracterizar a qualidade do RNA e normalizar os níveis de expressão do gene alvo. O par de primers para a região comum entre os genes EF1A e PTI-1 foram desenhados por meio do software Primer Design, versão 2,0 e do Software Oligotech, versão 1,0. Para a amplificação da B2M, foram utilizados os primers descritos por Bussemakers, (1999).

As reações para amplificação da β-2-microglobulina foram feitas nas seguintes condições: 2 µl de cDNA, 1U de Taq DNA Polimerase (Labtrade), Tampão da Taq Polimerase 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,3), 200mM de dNTPs (dATPs, dGTPs, dTTPS, dCTPs) (Amersham Pharmacia), 5 pmol do par de primers, em um volume final de 25 µl que foi completado com água mili-Q.

A PCR foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) de acordo com as seguintes condições: 28 ciclos (94° - 30 seg., 58°C - 40 seg., 72°C - 40 seg.), precedidos de

desnaturação inicial a 95°C – 5 min e um ciclo de extensão final de 72°C – 10 min. Reações de controle negativo sem o cDNA foram incluídas para monitoramento de possíveis contaminações dos reagentes.

As mesmas concentrações de reagentes e de cDNA foram utilizadas para realizar reações de amplificação do gene EF1A, nas seguintes condições: 28 ciclos (94° - 30 seg., 61°C – 40 seg., 72°C – 40 seg.), precedidos de desnaturação inicial a 95°C – 5 min e um ciclo de extensão final de 72°C – 10 min.

**Tabela 01.** Sequência dos iniciadores para os genes B2M e EF1A, respectivamente.

Iniciadores	Seqüência 5' → 3'	Tamanho do fragmento esperado
B2M <i>sense</i>	AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA	534 pb
B2M <i>anti-sense</i>	TGTTGATGTTGGATAAGAGAA	
EF1A <i>sense</i>	TTGATGCCCCAGGACACAGAC	366 pb
EF1A <i>anti-sense</i>	TGAACCAAGGCATGTTAGCTC	

### 2.3. Análise semi-quantitativa por Densitometria Ótica:

Para realização da análise semi-quantitativa, foi necessário determinar um número ideal de ciclos de PCR que garantisse a fase exponencial de amplificação para que esta não atingisse o platô.

Após a amplificação, 12µl de cada produto de PCR de ambos os genes foram misturados com tampão de carreamento (12,5mg de azul de bromofenol, 4,0g de sacarose 100%, e 5,0 ml de água destilada) e submetidos à corrida em gel de agarose 1,5% durante 1 hora, a 100v, em tampão TBE (Tris Borato EDTA) 0,5X (450mM de Tris, 450mM de ácido bórico, 10mM de EDTA, pH= 8,0), corados com brometo de etídio 0,5 µg/ml e visualizados por luz ultravioleta em sistema de videodocumentação VDS Image Master (Amersham Biosciences).

Os transcritos gerados pela RT-PCR a partir de sangue contendo células benignas e tumorais foram analisados no programa IMVDS (*Image Master TM VDS software*, versão 2,0 – Amersham Biosciences), o qual realiza a leitura da densidade ótica da imagem. Os valores obtidos foram submetidos à razão RNAm EF1A / RNAm B2M. Foi também realizada a média do

valor de cada leitura para cada duplicata a fim de se obter os níveis relativos da expressão do gene EF1A, nos grupos de indivíduos analisados.

#### **2.4. Análises estatísticas:**

Os valores da abundância relativa do gene EF1A obtidos para os grupos de CaP, HPB, e Controle Saudável, foram analisados pelo teste de Mann-Witney para verificar quais abundâncias diferem estatisticamente entre si. Foram consideradas significativas as análises com  $P < 0,05$ . O cálculo do *Odds Ratio* (OR) foi realizado para verificar a chance de ocorrência de Adenocarcinoma Prostático associado aos níveis de expressão do EF1A. Foi também realizado o Teste de Crivo afim de se estimar a eficácia do uso da análise de RT-PCR semi-quantitativa para os transcritos do gene EF1A associado aos transcritos do gene PTI-1 como marcador auxiliar no diagnóstico clínico para o Câncer de Próstata.

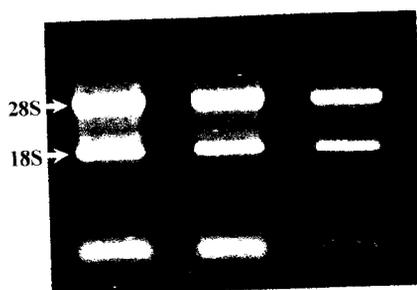
### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

A técnica de RT-PCR é um método rápido e eficiente para estimar a quantidade relativa de expressão de determinados genes em várias populações de RNAm (SANTAGATI et al, 1997). A transcrição reversa utilizando hexanucleotídeos randômicos realizada neste trabalho, descrita por Santagati et al (1997) e Pernas-Alonso et al (1999), foi eficaz para a análise dos transcritos de ambos os genes aqui mencionados, pois permitiu que fossem realizadas simples preparações de RT.

A amplificação do gene B2M foi utilizada para um monitoramento da qualidade do RNAm e também como referência para a semi-quantificação do EF1A.

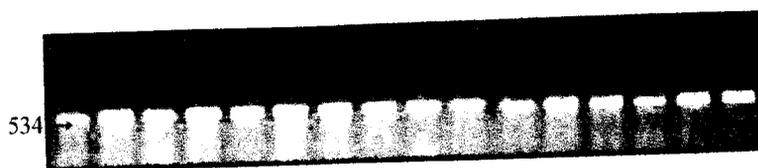
Quando se fazia uma única reação com ambos os primers, havia competição durante a amplificação, favorecendo algum dos dois genes, o que não permitia uma análise confiável dos resultados. Por isso, as amplificações dos genes foram feitas separadamente.

O RNA extraído foi de boa qualidade (Fig. 03). Devido à especificidade do primer hexâmero em selecionar RNA, e ausência de DNA (totalmente ou presença insignificante), não foi necessário tratar o RNA com a enzima DNase.

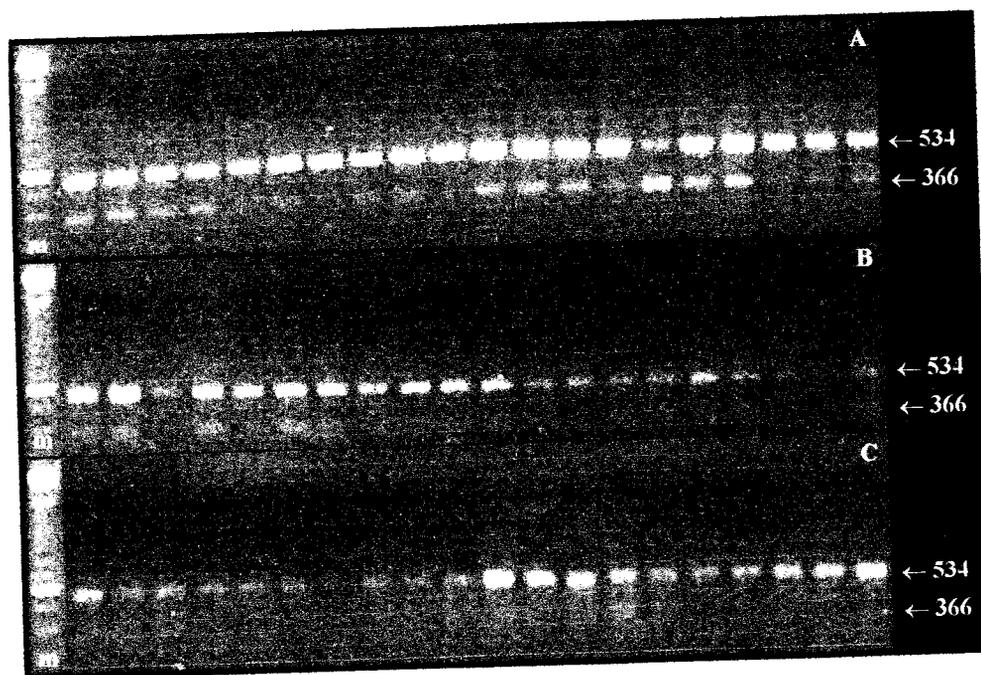


**Figura 03.** Padrão eletroforético do

Para os transcritos dos genes B2M e EF1A/ PTI-1 os fragmentos amplificados foram de 534 e 366 pb, respectivamente (Figs. 04 e 05). Os resultados obtidos nessas figuras mostraram o bom funcionamento das reações de RT-PCR.



**Figura 04.** Gel de agarose 1,5% mostrando o padrão de amplificação do fragmento de 534 pb da B2M.

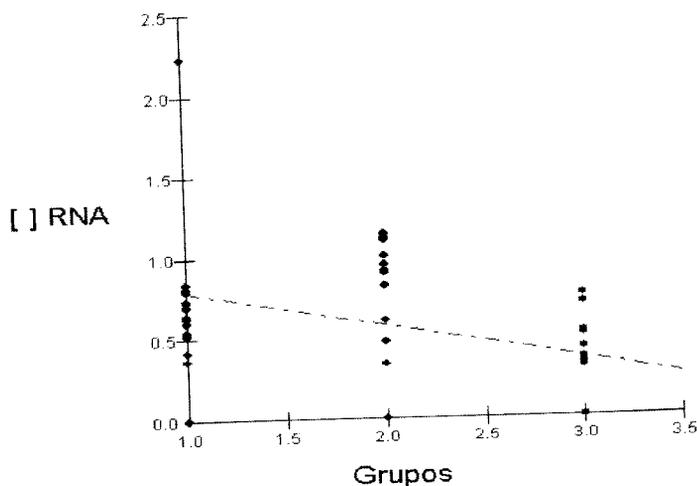


**Figura 05.** Gel de agarose 1,5% representando o padrão de amplificação do Gene EF1A (366 pb) e da B2M (534 pb). (A) - Padrão de amplificação do Controle Saudável; (B)- padrão de amplificação do grupo HPB; (C)- Padrão de amplificação do grupo CaP; (m) Marcador de Peso Molecular.

Os resultados mostraram que há diferença significativa entre as amostras de sangue periférico com CaP, HPB e Controle Saudável ( $P < 0,05$ ).

Como há uma semelhança de estrutura e função entre os genes EF1A e PTI-1, os primers utilizados na amplificação do gene em questão foram construídos para uma região comum a ambos os genes, havendo provavelmente uma amplificação simultânea dos transcritos destes.

O índice de pacientes do grupo Controle Saudável e do grupo HPB que apresentaram níveis de expressão positivos em relação ao RNAm estudado foi de 70% e 81%, respectivamente (considerando positivo um valor de expressão acima de 0,6). Este resultado contrasta com os pacientes do grupo CaP, em que apenas 10% apresentaram níveis de expressão positivos (Figura 06).



**Figura 06:** Gráfico representando a diminuição dos níveis de expressão do RNAm do gene EF1A, nos 3 grupos de pacientes analisados. (1.0: Controle Saudável; 2.0: HPB; 3.0: CaP).

A comparação dos níveis de transcritos do grupo Controle Saudável contra o grupo HPB não foi significativa, (OR=0,53; P=0,69). Contudo, a comparação do grupo HPB com o grupo CaP, mostrou que para níveis de expressão do EF1A abaixo de 0,6 a chance de o indivíduo ter câncer de próstata, é 36,8 vezes maior, e entre CaP e Controle saudável essa chance é de 19,8 para indivíduos com níveis de expressão maiores que 0,6 (Tabela 02).

**Tabela 02.** Cálculo das chances de ocorrência do adenocarcinoma prostático frente os grupos HPB e Controle Saudável baseado nos níveis de expressão relativa dos transcritos gênicos do eEF1A.

Expressão	CaP	HPB	CS	Relação CaP x CS		Relação CaP x HPB		Relação HPB e CS	
				OR*	P	OR	P	OR	P
≤ 0,6	17	3	6	19,8	0,0006	36,8	0,0001	0,53	0,69
> 0,6	2	13	14						
Total	19	16	20	IC <sub>95%</sub> = 3,44-114,1		IC <sub>95%</sub> = 5,3-253,6		IC <sub>95%</sub> = 0,11-2,6	

\* OR = Odds Ratio

\*\* IC<sub>95%</sub> = Intervalo de Confiança à 95% de probabilidade.

Estas diferenças sugerem que a próstata dos pacientes do grupo Controle Saudável e do grupo HPB se encontram em estágio benigno. Embora o HPB seja considerado uma patologia, ainda está em caráter não-maligno. A próstata apresenta um volume aumentado.

A comparação dos pacientes do grupo HPB e do grupo CaP mostrou que os pacientes de ambos os grupos apresentam patologias da próstata, embora o HPB ainda seja um estado benigno, enquanto o CaP, já se encontra em uma fase de malignidade, e pode ser considerado câncer propriamente dito.

A diferença encontrada entre os grupos CaP e Controle Saudável deve-se ao fato de que eles estão em fases histológicas e fisiológicas bem distintas. O grupo Controle Saudável é composto por pacientes que não apresentam nenhuma anormalidade na próstata, enquanto no grupo CaP, a próstata dos pacientes possui uma alteração, em caráter maligno.

Observou-se assim, uma diminuição nos níveis de expressão do gene EF1A de acordo com o aparecimento do Câncer de Próstata (Fig. 06). A análise semi-quantitativa realizada neste estudo mostrou uma correlação negativa entre o desenvolvimento do Câncer de Próstata e a expressão do gene EF1A, ou seja, enquanto o câncer se desenvolve, a expressão do gene diminui. Isso sugere que este gene não está diretamente relacionado ao aparecimento do tumor, contrastando com o que foi discutido por Negrutskii e colaboradores (1998), em que foi sugerido que o gene EF1A possui função carcinogênica.

Esses resultados encontrados podem estar relacionadas à função de indução da apoptose pelo EF1A. Esta função se baseia no princípio de que o Fator de Elongação seja uma proteína associada a vias normais de manutenção das atividades celulares e as perdas de expressão de seus níveis protéicos poderiam estar associadas à perda da homeostase prostática, o que, juntamente com outros fatores alterados culminaria na formação de células com características carcinogênicas. Essa explicação pode estar suportada pelos dados de Lamberti e colaboradores, 2004, em que a função do Fator de Elongação 1 A está associada a função de indução da apoptose associado ao mecanismo de escape tumoral. Baseado nisso, o aumento do nível de expressão desse gene em pacientes com HPB pode ser uma tentativa da glândula prostática de conter a proliferação celular anormal, pois de acordo com Duttaroy e colaboradores 1998, quando a expressão do EF1A é abundante as células estão em estágio proapoptótico e, contrariamente, quando a expressão do EF1A é baixa, as células estão em modo antipoptótico. Assim, o gene

EF1A pode apresentar diferentes funções de acordo com os níveis de expressão nos diferentes estágios patológicos da próstata, ora inibindo, ora induzindo a proliferação celular.

Os dados estimados de sensibilidade (89,47%), especificidade (81,25%), acurácia (86%), valor preditivo negativo (86,67%) e valor preditivo positivo (85%) para expressão do gene EF1A  $\leq 0,6$ , entre os grupos CaP, HPB, e Controle Saudável demonstram que este representa um bom marcador para auxiliar o diagnóstico clínico.

Contudo, o caráter preliminar deste trabalho impossibilita a confirmação dessa suposição. Seria necessário aumentar o número amostral e utilizar, adicionalmente, outras técnicas de biologia molecular para confirmar as conclusões obtidas a partir desses resultados.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:**

- O estudo realizado mostrou uma correlação negativa entre o aparecimento do Câncer de Próstata e os níveis de expressão do gene EF1A.
- A expressão aumentada dos transcritos do gene EF1A em pacientes com a HPB comparado ao CaP pode estar relacionada ao processo apoptótico postulado a atividade do fator de alongação 1 A e com conseqüente perda de função no CaP.
- Devido aos altos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia e valores preditivos, verificados quanto a presença do transcrito do gene EF1A neste estudo preliminar, este representa um bom marcador auxiliar para o uso em diagnóstico clínico.
- Apesar de ser um trabalho preliminar, os resultados evidenciam a potencialidade e a importância deste tipo de estudo no desenvolvimento de métodos para avaliar as vias de ocorrência e desenvolvimento de doenças multifatoriais como o Câncer de Próstata.

## 8. BIBLIOGRAFIA:

ALBRIGHT, L.C.; EELES, R. Progress in prostate cancer. **Nature Genetics**, v.9, p 336-338, 1995.

BOGLIOLO, D.G. **Patologia Geral**, Guanabara Koogan S. A., 2<sup>a</sup> ed, p. 220, 1998.

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

CHAN, J.M.; STAMPFER, M.J.; GIOVANNUTTI, E.L. What causes prostate cancer? Brief summary of epidemiology. **Seminars in Cancer Bilogogy**, v.8, p.263-273, 1998.

CHEN, L.; SEGAL, D.M.; MASH, D.C. Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction: an approach for the measurement of target gene expression in human brain. **Brain Research Protocols**, v.4, p. 132-139, 1999.

CHRISTIANO, A.P.; YOSHIDA, B.A.; DUBAUSKAS, Z.; SOKOLOFF, M.; RINKER-SCHAEFFER, C.W. Development of markers of prostate cancer metastasis: Review and perspective. **Urologic Oncology**, v. 5, p. 217-223, 2000.

COFFEY, D.S. The molecular biology endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Walsh, P.C.; Retik, A.B.; Stamey, T.A.; Vaughan, E.D. **Campbell's Urology**, Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 226-227, 1992.

DOWNING, S.R.; JACKSON P.; RUSSELL, P.J. Mutations within the tumour suppressor Gene P53 are not confined to a late event in prostate cancer progression: a review of the evidence. **Urologic Oncology**, v. 6, p. 103-110, 2002.

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

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

EDMONDS, B.T.; WYCKOFF, J.; YEUNG, Y.G.; STANLEY, E.R.; JONES, J.; SEGALL, J.; CONDEELIS, J. Elongation factor-1 alpha in an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. **Journal Cell Science**, v. 109, p. 2705-2714, 1996.

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

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética, **EMBRAPA-CENARGEM**, ed. Brasília, 3<sup>a</sup> ed., p. 220, 1998.

GANGWANI, L.; MIKRUT, M.; GALCHEVA-GARGOA, Z.; DAVIS, R.J. Interaction of ZPR 1 with translational elongation factor-1 alpha in proliferating cells. **Journal Cell Biology**, v.143, p. 1471-1484, 1998.

GLEASON, F. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: **Urologic Pathology: the prostate**, Eds. Tannenbaum, M.; Lea & Febiger., Philadelphia: Saunders Company, W.B., 1997.

GHOSSEIN, R.A.; SCHER, H.I.; GERALD, W.K.; CURLEY, T.; AMSTERDAM, A.; ZHANG, Z.F.; ROSAI, J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic carcinoma: clinical implications. **Journal of Clinical Oncology**, v. 13, p. 1195-1200, 1995.

GOPALSKRISHNAN, R.V.; SU, Z.Z.; GOLDSTAIN, N.I. Translational Infidelity and human cancer: Role of PTI-1 oncogene. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 151-162, 1999.

GRANT, A.G.; FLOMEN, R.M.; TIZARD M. L.; GRANT, D.A. Differential screening of human pancreatic adenocarcinoma lambda gt11 expression library has identified increase transcriptional of elongation factor EF-1 alpha in tumor cells. **Institute Journal Cancer**, v. 50, p. 740-745, 1992.

GRIFFITHS, K.; MORTON, M.S. Aspects of the cell biology of prostate cancer. Textbook of prostate cancer: Pathology Diagnosis and Treatment, In: Eds Kaisary, A. V.; Murphy, G.P.; Denis, L.; Griffiths. K., London: **Martin Dunitz Ltda**, 6° ed., p. 47-51, 1999.

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

ISAACS, J.J. Molecular markers of prostate cancer metastasis: Developing diagnostic methods for predicting the aggressiveness of prostate cancer. **American Journal of pathology**, v.150 (5), p. 1511-1521, 1997.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Câncer de Próstata. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/cancer/tipos/prostata>>. Acessado em : 15 mar. 2006, 2006.

KLIGEMAN, J. Estimativas sobre a incidência e mortalidade por Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, p. 111-114, 2001.

KURASSAWA, Y.; HANYU, K.; WANTANABE, Y.; NUMATA, O. F-actin bundling activity of *Tetrahymena* Elongation Factor 1 alpha is regulated by  $Ca^{2+}$ / Calmodulin. **Journal of Biochemistry** v. 119, p. 791-798, 1996.

LAMBERTI, A.; CARAGLIA, M.; LONGO, °; MARRA, M.; ABBRUZZES, A.; ARCARI, P. The translation Elongation factor 1A in tumorogenesis, signal transduction and apoptosis: Review article. **Amino Acids**, v.26, p. 443-448, 2004.

MARCHESI, V.T.; NGO In vitro assembly of multi protein complexes containing alpha, beta e gamma tubulin, heat shock protein HSP70, and elongation factor 1A. **Proc. Nalt. Academic** v. 90, p. 3020-3032, 1993.

NEGRUTSKII, B.S.; ELSKAYA, A.V. Eucaryotic translation elongation factor 1 $\alpha$ : estrutura, expression, funtions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling, Prog. Nucleic Acid Res. **Molecular Biology** v. 60, p. 47-78, 1998.

PASSAGLIA, L.M.P.; ZAHA, A. Técnicas de DNA Recombinante. In: Zaha, A.; **Biologia Molecular Básica**, Porto Alegre: Mercado Aberto Ltda., p. 324, 1996.

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

REGINATO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. Biologia molecular aplicada à produção animal, **Embrapa informações tecnológicas**, Brasília, DF, p. 215, 2001.

RIIS, B.; RATTAN, S.I.S.; CLARK, B.F.C.; MERRICK, W.C. Eucaryotic rprotein elongation factors, **TIBS** v. 15, p. 420-424, 1990.

SADI, A. **Patologia Urogenital**, EDART, p. 545-602, 1975.

- SANTAGATI, S.; GARNIER, M.; CARLO, P.; VIOLAN, E.; PICATTI, G.B.; MAGGI, A. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using plimerase chain reaction (PCR)-based methods. **Brain Research Protocols**, v.1, p. 217-223, 1997.
- SEAH, G. T.; ROOK, G.A.W., A sensitive, non-radictive quantitative method for measuring IL-4 and IL-4 RNAm in unstimulated cells from multiple clinical samples, using nested RT-PCR. **Journal of Immunological Methods**, v. 228, p. 139-149, 1999.
- SHEN, R.; SU, Z.; OLSSON, C.A.; Fischer, P.B. Identification of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression cloning and differential RNA display. **Pro. Nalt. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 15, p. 6778-6782, 1995.
- SHIINA, N.; GOTOH, Y.; KUBOMURA, N.; IAWAMATSU, A.; NISHIDA, E. Microtubule severing by elongation factor 1 alpha. **Science**, v.226, p. 282-285, 1994.
- SIEBERT, P.D.; LARRIC, J.W. Competitive PCR. **Nature**, v. 359, p. 557-558, 1992.
- SROUGI, M. Câncer de próstata: Nefrologia, Urologia, Clínica. **Eds Schors n. Srougi M**, São Paulo: Savier, p.510 1998.
- SROUGI, M.; CURY, J. Hiperplasia Benigna da Próstata. In: Schor, N.; Srougi, M. **Nefrologia, Urologia, Clínica**. São Paulo: Seção C, capítulo 6. sarvier. p. 506-510, 1998.
- STAMEY, T.<sup>a</sup>; MCNEAL, J.E. Adenocarcinoma of the Prostate. In: Walsh, P. C.; Retik, A.B., Stamey, T.A; Vaughan, E.D. **Campbell's Urology**, Philadelphia, 6a ed **W.B.** Sauders Company,v. 1, p. 1159-1221, 1992.
- SU, Z.; GOLDSTAIN, N.I.; FISCHER P.B. Antisnese inhibition of the PTI-1 oncogene reverses cancer phenotypes. **Proc. Nalt. Acad. Sci. U.S.A.**, v.4, p. 1764-1769, 1998

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

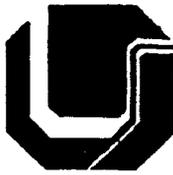
VERES, G.; SCHERER, S.E.; CASEY, C.T. The molecular basis of the sparse for mouse mutation. **Science**, v. 237, p. 415-417, 1987.

WALSH, P.C. Benign Prostatic Hiperplasia. In: Walsh, P.C.; Retik, A.B.; Stamey, T.A.; Vaughan, E.D. **Campbell's Urology**, Philadelphia, 6° ed W.B. Sauders Company, v. 1, p. 1007-1027, 1992.

WALSH, P. C; WORTHINGTON, J. F., Doenças da próstata: Um guia para homens e para as mulheres que os amam. **Martins Fontes**, São Paulo , p.420, 1998.

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

YANG, W.; BOSS, W.F. Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by the protein activator PIK-A49. Activation requires phosphorilation of PIK-A49. **Journal Biological Chemistry** v. 269, p. 3852-3857, 1994.



Universidade Federal de Uberlândia  
Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer nº: 005/2001

Título do Projeto	Biologia molecular do câncer de próstata: Análise da expressão gênica, estudos de polimorfismos, isolamento e caracterização de epítomos específicos.
-------------------	---

Coordenador	Dr Luiz Ricardo Goulart Filho
-------------	-------------------------------

Relator	Prof. Dr. Miguel Tannius Jorge
---------	--------------------------------

Área do Conhecimento	Ciências Biológicas - Genética
----------------------	--------------------------------

Código	2.02
--------	------

Projeto	<input checked="" type="checkbox"/> Local
---------	---

Multicêntrico:	<input type="checkbox"/> Nacional	<input type="checkbox"/> Internacional
----------------	-----------------------------------	--

Área Temática	<input checked="" type="checkbox"/> Grupo I	Nível	<input type="checkbox"/> Prevenção	<input checked="" type="checkbox"/> Epidemiológico
	<input type="checkbox"/> Grupo II		<input type="checkbox"/> Diagnóstico	<input type="checkbox"/> Não se aplica
	<input type="checkbox"/> Grupo III		<input type="checkbox"/> Terapêutico	

Objetivo(s)	criar um banco de dados de genes <sup>relacionados</sup> ao câncer de próstata. Descobrir um "Macronay" contendo os principais biomarcadores específicos do câncer de próstata.
-------------	---

Metodologia	
-------------	--

## Extração de RNA – Sangue

- 1 - Colocar todo o sangue em tubo falcon (15mL);
- 2 - Centrifugar o sangue por 10 min a 2.500 rpm a 4°C;
- 3 - Transferir o plasma para um microtubo e armazenar a -80°C;
- 4 - Deixar no máximo 2,5mL no tubo. Caso o volume esteja a cima de 2,5mL dividir o total em dois tubos;
- 5 - Adicionar nove partes (11,5mL) de cloreto de amônio e uma parte (1,25mL) de bicarbonato de amônio. Misturar antes de adicionar às células, 5 vezes o volume das hemáceas;
- 6 - Inverter delicadamente para misturar bem;
- 7 - Incubar em gelo por 15 minutos;
- 8 - Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante;
- 9 - Adicionar 1,0mL de solução D (ou 950µL de solução D + 50µL de sarcosil 10%);
- 10 - Adicionar 8µL de β-mercaptoetanol;
- 11 - Agitar no vortex para diluir o pellet de células e mergulhar no gelo;
- 12 - Adicionar 100µL de acetato de sódio 2M pH= 4;
- 13 - Adicionar 1,0mL de fenol saturado em água (pH = 4 e 5);
- 14 - Acrescentar 200µL de clorofórmio-álcool isoamílico (49:1, 196µL: 4µL);
- 15 - Vortexar a suspensão por 10 segundos e distribuir a mistura em tubos de 2,0mL (nomear cada tubo). Colocar no gelo por 15 minutos;
- 16 - Centrifugar a amostra por 15 minutos a 12.000g a 4°C;
- 17 - Após centrifugar, transferir no máximo 1,0mL da fase aquosa para cada microtubo de 2mL e adicionar cerca de 750µL de isopropanol gelado e manter a -20°C (freezer) – Deixar overnight (mínimo 4 horas);
- 18 - Centrifugar a 12.000g por 15 min a 4°C e descartar o álcool com cuidado;
- 19 - Lavar com 1,0mL de Etanol 75% e descartar o sobrenadante;
- 20 - Deixar o RNA secando por 15 minutos;
- 21 - Ressuspender o pellet em cerca de 25µL de água DEPC.

Mesmo dia

Para cada 1,0mL de Sangue:  
▪ 4,5mL de cloreto de amônio  
▪ 0,5mL de bicarbonato de amônio

Fazer as contas e misturar, depois colocar + ou - 13mL, se sobrar pode colocar mais.

Homogeneizar