

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise do polimorfismo *C748T* do gene *KLK2* em pacientes
com Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna**

Carolina Fernandes Reis

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
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise do polimorfismo *C748T* do gene *KLK2* em pacientes
com Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna**

Carolina Fernandes Reis

Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

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

Fevereiro– 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise do polimorfismo *C748T* do gene *KLK2* em pacientes
com Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna**

Carolina Fernandes Reis

Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do curso de
Ciências Biológicas em ____/____/____.

Vera Lúcia de Campos Brites

Uberlândia – MG
Fevereiro– 2007

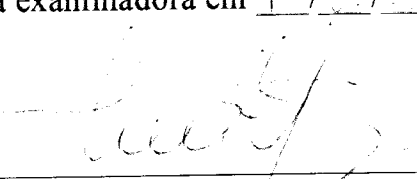
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise do polimorfismo *C748T* do gene *KLK2* em pacientes
com Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna**

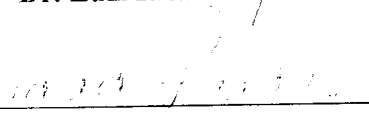
Carolina Fernandes Reis

Aprovada pela banca examinadora em 11/01/07

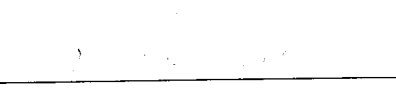
Nota 10



Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho



Msc. Adriana Freitas Neves



Dr. Danielo Garcia de Freitas

Uberlândia-MG

Fevereiro– 2007

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela vida e por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho.

Aos meus pais, Osvaldo e Silvana, por terem me gerado, pela educação, amor, companheirismo e pelo incentivo de sempre lutar pelos meus sonhos.

Ao meu irmão, Thiago, por fazer parte da minha história e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu namorado, Edson, que é mais que um amigo e me ajuda a vencer os momentos difíceis.

A toda minha família, pelo amor, carinho e por torcerem por meu sucesso.

Ao meu orientador, prof. Luiz Ricardo, por ter confiado em mim e aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar esse trabalho. Pelo exemplo de excelente pesquisador, otimismo e confiança.

A amiga de todas as horas, Adriana, pronta para ajudar e socorrer. Sempre sendo exemplo a ser seguido. Obrigada também pelos momentos que passamos juntas.

A amiga Ana Paula, companheira de curso, laboratório e de vida. Por estar sempre torcendo pra tudo dar certo e por estar sempre ao meu lado.

A todos os amigos do Laboratório, em especial a Fabiana, Thaíse e Washington por terem colaborado muito com a realização desse trabalho.

Ao Dr. Danielo por ter abraçado a causa, por entender que a pesquisa é necessária para a melhora dos métodos diagnósticos.

A histologista Tânia Alcântara pela colaboração com a pesquisa.

A todos os pacientes, que cederam as amostras, sem as quais não seria possível a realização desse trabalho.

Aos órgãos financiadores, CnPq e Fapemig.

RESUMO

O adenocarcinoma prostático (CaP) é a segunda causa de óbitos por câncer em homens, e a incidência desse câncer aumenta a cada ano, o que pode ser parcialmente explicado pela evolução dos métodos de diagnóstico. Os polimorfismos gênicos associados ao câncer de próstata estão se tornando uma ferramenta clínica para o monitoramento de pacientes com maior predisposição de desenvolver o CaP, permitindo assim o auxílio no diagnóstico precoce e tratamento mais efetivo. No presente estudo foi analisado o polimorfismo C748T do gene KLK2 (calicreína glandular humana) no sangue de 238 pacientes, sendo 130 com CaP, 108 com hiperplasia prostática benigna (HPB), além 160 indivíduos saudáveis; e no tecido de 46 pacientes com CaP e 29 com HPB. O objetivo foi verificar a associação do polimorfismo com a ocorrência e/ou progressão do adenocarcinoma prostático. Os resultados obtidos por PCR-RFLP mostraram as seguintes frequências genotípicas: CaP – 37,69% CC, 53,08% CT e 9,23% TT; HPB – 52,78% CC, 40,74% CT e 6,48% TT e na população controle 45,62% CC, 49,38%CT e 5,00% TT. A frequência encontrada para o alelo T, foi de 35,77% no grupo CaP, 26,85% na HPB e 29,69% na população. No LIS-SSCP foram encontrados dois padrões diferenciados que serão futuramente investigados. Dos pacientes analisados também no tecido 3 apresentaram genótipos diferentes para sangue e tecido. O OD (Odds Ratio) para os genótipos CT+TT foi aproximadamente duas vezes maior no câncer ($IC_{95\%}=1,10-3,10$, $p=0,02$), comparado ao HPB. Este estudo indica, que o alelo T, que aparentemente codifica uma proteína inativa, pode estar associado ao câncer de próstata.

PALAVRAS CHAVE: Câncer de próstata, KLK2, C748T

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 A Glândula Prostática	1
1.2 Doenças da Próstata	2
1.3 Epidemiologia do Câncer de Próstata	3
1.4 Família das Calicreínas	4
1.5 Calicreína glandular humana (KLK2).....	5
 2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 Obtenção das amostras	8
2.2 Extração do DNA total	8
2.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	9
2.4 PCR-RFLP (Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição)...	9
2.5 PCR-LIS-SSCP.....	10
2.6 Análise estatística	10

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4. CONCLUSÕES	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
ANEXO I	27
ANEXO II	28
ANEXO III	29
ANEXO IV	30

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Localização da glândula prostática.....	1
Figura 2: Localização da família das calicreínas no genoma humano.....	6
Figura 3: Produto de extração de DNA obtido do sangue periférico dos casos analisados (CaP, HPB, controle) e utilizado para amplificação do gene KLK2.....	11
Figura 4: Qualidade do produto amplificado pela PCR do gene KLK2	11
Figura 5: PCR-RFLP em gel de agarose 2,0%.....	12
Figura 6: : Padrão de PCR-LIS-SSCP para o polimorfismo C748T do gene KLK2 em gel de poliacrilamida 12%.....	13
Figura 7: Diferentes padrões de genótipos para o polimorfismo C748T do gene KLK2 obtidos em gel de LIS-SSCP 12%.....	14
Figura 8: : Distribuição da frequência genotípica CC, CT e TT do polimorfismo C748T do gene KLK2 entre os indivíduos com câncer de próstata (CaP), hiperplasia prostática benigna (HPB) e controle populacional masculino.....	16
Figura 9: Distribuição da frequência genotípica comparando CC com CT+TT do polimorfismo C748T do gene KLK2 entre os indivíduos com câncer de próstata (CaP), hiperplasia prostática benigna (HPB) e controle populacional masculino.....	17
Figura 10: Distribuição da frequência genotípica CC, CT e TT do polimorfismo C748T do gene KLK2 no grupo de indivíduos com câncer de próstata (CaP), analisando as populações chinesa, americana e brasileira (este estudo).....	18

Tabela 1: Pacientes que tiveram genótipos diferenciados para o polimorfismo C748T do gene KLK2 em amostras de sangue periférico e tecido prostático..... 14

Tabela 2: Frequência alélica e genotípica do polimorfismo C748T do gene KLK2 dentro de cada grupo analisado: câncer (CaP), hiperplasia benigna (HPB) e controle populacional..... 15

Tabela 3: Frequência alélica e genotípica do polimorfismo C748T do gene KLK2 do grupo CaP nas populações: Brasileira (BRA, desse estudo), Chinesa (CHI) e Norte-americana (USA)..... 18

Lista de abreviaturas

%	porcentagem
A	adenina
Arg	arginina
C	citossina
°C	graus Celsius
CaP	câncer de próstata
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DHT	dihidrotestosterona
DNA	ácido desoxirribonucléico
g	grama (s)
G	guanina
EDTA	ácido etilnodiâminotetra acético sal dissódico
HK2	calicreína glandular humana 2
HPB	hiperplasia prostática benigna
IGF	fatores de crescimento semelhantes à insulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kD	kilodaltons
KLK1	calicreína renal/pancreática 1
KLK2	calicreína glandular humana 2
KLK3	calicreína prostática específica 3 (PSA)
KLK4	calicreína peptidase 4
KLK5	calicreína 5, KLK-L2
KLK9	calicreína 9, KLKL3
KLK10	calicreína 10, NES 1
KLK11	calicreína 11, TLSP
KLK12	calicreína 12, KLKL5
KLK13	calicreína 13, KLKL4
KLK15	calicreína 15, ACO protease
LABGEM	Laboratório de Genética Molecular
LIS	baixa concentração iônica
mg	miligrama (s)

MgCl ₂	cloreto de magnésio
ml	mililitro (s)
mM	milimolar
ng	nanograma (s)
NIP	neoplasia intraepitelial prostática
PCR	reação em cadeia da polimerase
pmoles	picomoles
PSA	antígeno prostático específico
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	ácido ribonucleico
RTU	Ressecção transuretral
SNP	Polimorfismo de um nucleotídeo
SSCP	conformação polimórfica de fita simples
ssDNA	fita simples de DNA
T	timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris/Borato/EDTA
TNF308	fator de necrose tumoral locus 308
TNM	<i>tumor-node-metastasis</i>
Trp	triptofano
U	unidade (s) de enzima
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
USTR	ultra-sonografia transretal
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultravioleta
µg	micrograma (s)
µL	microlitro (s)
µM	micromolar
VDS	sistema de vídeo documentação

1- INTRODUÇÃO

1.1- A glândula prostática

A próstata começa seu desenvolvimento na 12ª semana de vida embrionária sobre a influência da Diidrotestosterona (DHT), e completa sua diferenciação no 4º mês de gestação (TANANGHO, 1994).

A próstata é um órgão fibromuscular e glandular masculino localizado abaixo da bexiga urinária (Figura 1), e pesa aproximadamente 20g no indivíduo adulto, sua função é produzir uma substância que, juntamente com a secreção da vesícula seminal e os espermatozoides produzidos nos testículos, vão formar o sêmem ou esperma (SMITH, 1979; GOSLING *et al.*, 1992). É composta por ácinos e um complexo sistema de ductos ramificados, cujos produtos de excreção são lançados dentro da uretra prostática (ROHR; BARTHSCH, 1980). É regulada, principalmente, por hormônios sexuais denominados androgênios, sendo a testosterona o mais importante deles (ERHAT, 1992).

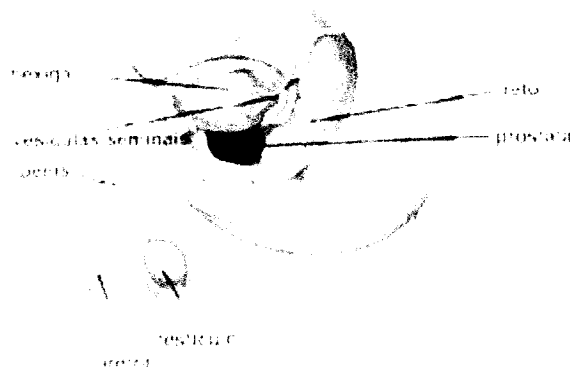


Figura 1: Localização da glândula prostática. Fonte: <http://www.centrodeterapias.com.br>

Estruturalmente, a próstata é envolta por uma cápsula de tecido conjuntivo e fibras musculares lisas da qual partem finas trabéculas que se dirigem ao parênquima, que é ocupado por células glandulares distribuídas em tubos ramificados. Anatomicamente, é dividida em cinco zonas: a anterior, a periférica, a central, o tecido pré-prostático e a transicional (local exclusivo da hiperplasia prostática benigna). Na zona periférica, encontra-

se a maioria dos casos de câncer de próstata (CaP) e corresponde à região mais pesquisada na biópsia da próstata (COFFEY, 1992, WALSH; WORTHINGTON, 1998).

1.2- Doenças da próstata

Anormalidades no crescimento e infecções na próstata causam algumas das doenças mais comuns em homens com idade superior a 50 anos. Várias disfunções têm sido associadas à glândula prostática, dentre elas incluem-se as prostatites, a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (SROUGI; CURY, 1998).

As prostatites ocorrem em diversas formas distintas, sendo as formas mais comuns as prostatites aguda bacteriana e não inflamatória ou crônica, prostatites não bacterianas (MEARES-JUNIOR, 1992).

A prostatite bacteriana aguda caracteriza-se pela presença de processo infeccioso no tecido prostático, podendo ser localizado ou difuso. Comumente é causado por bactérias como a *E. coli*, bacilos gram negativos, enterococos e estafilococos, germes comuns à infecções do trato urinário inferior. Clinicamente apresenta febre com calafrios e disúria (COTRAN *et al.*, 1994).

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é um aumento do número de células da próstata, resultante de novo crescimento das glândulas periuretrais e não de uma simples hipertrofia. 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).

Uma alteração no balanço entre a proliferação e a morte celular pode corresponder ao câncer de próstata. Durante os estágios iniciais do crescimento do câncer, as taxas de proliferação celular são maiores que as de morte celular, porém as células irão responder aos mesmos fatores regulatórios (hormônio-dependente) (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

Os tumores da próstata são heterogêneos, com áreas de maior ou menor diferenciação celular, dessa forma a graduação histológica dos adenocarcinomas constitui um importante fator no prognóstico. Outros parâmetros também são importantes, como o estágio inicial do tumor, o volume da neoplasia, o conteúdo de DNA do tumor e as medidas de PSA (SROUGI, 1998).

Aproximadamente 70% dos cânceres desenvolvem-se multifocalmente na zona periférica, menos de 5% na zona central e acima de 25% originam-se na zona de transição, tumores denominados incidentais, quando removidos por RTU - ressecção transuretral da

próstata (STAMEY; MCNEAL 1992, SROUGI 1998, BOSTWICK 1999, JARMULOWICZ 1999).

Os tumores da zona de transição são menos agressivos do que aqueles que surgem na zona periférica (BOSTWICK, 1999). A organização anatômica da glândula inclui um tecido fibromuscular entre a zona central e a zona periférica que de certo modo limita a expansão de carcinomas da zona de transição para os feixes neurovasculares e ductos ejaculatórios, as duas maiores rotas para a expansão extraglandular (BOSTWICK 1999, JARMULOWICZ 1999).

O rastreamento de anomalias prostáticas é realizado principalmente por quatro etapas: o exame físico da próstata (toque retal), dosagem do antígeno prostático específico (PSA), ultra-sonografia transretal (USTR) e biópsias. O toque digital tem a sensibilidade que varia de 40 a 80% e as dosagens de PSA de 70 a 90%. A USTR é indicada quando os resultados do toque digital ou as dosagens de PSA são incoerentes ou duvidosos (STAMEY ; MCNEAL, 1992).

A análise histopatológica do tecido prostático é baseada no Sistema Gleason (1977) (*apud* Stamey; McNeal 1992, Isaacs 1997, Srougi 1998), que consiste num sistema que valoriza o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático classificando os tumores em cinco graus, sendo grau um, as lesões mais diferenciadas e as de grau cinco as mais indiferenciadas (STAMEY; MCNEAL, 1992; ISAACS, 1997; SROUGI, 1998).

1.3- Epidemiologia do Câncer de Próstata

O câncer de próstata é a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo de pulmão. O número de casos tem aumentado a cada ano, o que 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 (INCA, 2007).

A idade é um fator de risco importante, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam exponencialmente após a idade de 50 anos. História familiar de pai ou irmão com câncer da próstata antes dos 60 anos de idade pode aumentar o risco de câncer em 3 a 10 vezes em relação à população em geral, podendo refletir tanto fatores hereditários quanto hábitos alimentares ou estilo de vida de risco de algumas famílias (COFFEY 1993, ISAACS 1997, INCA 2007).

A influência que a dieta pode exercer sobre a gênese do câncer ainda é incerta, não sendo conhecidos os exatos componentes ou através de quais mecanismos estes poderiam estar influenciando o desenvolvimento do câncer da próstata. Contudo, já está comprovado que uma dieta rica em frutas, verduras, legumes, grãos e cereais integrais, e com menos gordura, principalmente as de origem animal, pode ajudar a diminuir o risco de câncer de próstata (CHAN *et al.* 1998).

A etnia é um dos poucos fatores de risco bem estabelecido para a incidência e mortalidade por câncer de próstata (CUSSENOT; VALERI, 2001). Nos Estados Unidos, a taxa de mortalidade é duas a três vezes maior entre afro-americanos do que entre brancos, mesmo quando os fatores sócio-econômicos são ajustados. Os japoneses e chineses apresentam índices ainda menores, embora essa taxa pareça aumentar quando esses homens residem em países de alto risco (RUIJTER *et al.*, 1999).

A cura do câncer de próstata é limitada àqueles pacientes com a doença confinada ao órgão, ainda em estágio inicial. Assim, é de grande importância o diagnóstico do câncer em estágios precoces, quando há enormes chances de cura, o que não acontece quando a doença não está mais confinada ao órgão e apresenta metástase. Portanto estudos e avanços na área molecular são de grande importância para um diagnóstico precoce (WALSH; WORTHINGTON, 1998).

1.4- Família das calicreínas

As calicreínas são um subgrupo de serino proteases que são encontradas em diversos tecidos e fluidos biológicos e possuem diversas funções fisiológicas. Na próstata, por exemplo, há expressão de KLK1, KLK3, KLK2, KLK4, KLK5, KLK9, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13 e KLK15 (YOUSEF; DIAMANDIS, 2001).

Essas enzimas são divididas em duas categorias: as plasmáticas e as teciduais, pois diferem quanto ao peso molecular, ponto isoelétrico, substrato específico, características imunológicas, tipos de cininas liberadas e importância funcional (MOVAT, 1979).

As calicreínas plasmáticas são exclusivamente expressas por células do fígado, suas funções incluem participação na coagulação sanguínea e fibrinólise, liberação de bradicinina e regulação do tônus vascular e de reações inflamatórias. As teciduais são membros de uma família que possuem similaridade gênica, protéica e de estrutura terciária (BHOOLA, 1992).

As calicreínas teciduais são expressas em muitos tecidos incluindo os hormônio-dependentes tais como próstata, mama, ovário e testículos, por isso estão emergindo como novos marcadores tumorais (DIAMANDIS; YOUSEF, 2002).

A nomenclatura das calicreínas seguem a ordem de descoberta, e não a ordem em que são encontradas no gene (Figura 2), hoje já se conhecem 15 genes dessa família, todos codificam serino proteases, possuem 5 éxons, suas organizações são muito parecidas e (YOUSEF; DIAMANDIS, 2001), todos estão diferencialmente expressos no câncer (BORGONÔ, 2004).

1.5- Calicreína glandular humana (KLK2)

Schedlich *et al.* em 1987, isolaram o DNA genômico do KLK2 de 5,2 Kb e determinaram que o gene codifica uma pré-proteína hK2 de 261 aminoácidos. A proteína madura é de 237 aminoácidos e tem 66% e 80% de homologia com a hK1 e a hK3, respectivamente.

O gene da calicreína glandular humana – 2 (KLK2) está localizado no cromossomo 19, região q 13.41, codifica 3 isoformas, que possuem 261, 223 e 164 aminoácidos. A hK2 tem função na ativação de peptidase, ativação de endopeptidase tipo-serina e ativação de calicreína tecidual; além de existirem evidências de que esteja envolvida em processos de proteólise (NCBI, 2007)

Recentemente o papel de hK2 na carcinogênese tem sido discutido, em 2001 Rehault *et al.*, descobriram que tem atividade de clivar *IGF binding* proteína (insulin-like growth factor) 2 para 5, a qual pode aumentar a disponibilidade de IGF e aumentar o risco de CaP; Frenette *et al.*, 1997 descreveram que essa proteína ativa o plasminogênio da uroquinase e conduz a invasão do câncer de próstata; muitos trabalhos apontam alta expressão de hK2 em tecido prostático com CaP, e pacientes com CaP confinado tem alto nível hK2 no soro (DARSON *et al.*, 1997; PARTIN *et al.*, 1999; BECKER *et al.*, 2000; MEOLA *et al.*, 2006).

Outros trabalhos apontam hK2 como agente que cliva a pró-forma para forma madura enzimática do PSA, sendo responsável pela ativação do PSA, o qual é um importante fator em expansão do tumor e metástase (KUMAR *et al.*, 1997; WEBBER *et al.*, 1995).

Vários genes têm sido associados à ocorrência e progressão do câncer esporádico de próstata. O KLK2 tem sua expressão aumentada em CaP confinado e metastático e está sendo um adicional marcador de tumor prostático que pode ser complementar ao uso de PSA, tendo aplicações clínicas (STENMAN, 1999; MEOLA *et al.*, 2006).

Estudos têm sido realizados para tentar associar polimorfismos nesses genes e a ocorrência desse câncer, bem como sua progressão. Esses polimorfismos podem ser úteis para detectar pacientes com maior predisposição para desenvolver o CaP, permitindo melhor acompanhamento e tratamento dos mesmos. Mais de 90% dos polimorfismos nos genes humanos são SNP (Single Nucleotide Polymorphism), ou seja, mudanças de uma única base; e a maioria das doenças com base genética são causadas por um ou mais SNP. (CORREO-CERRO *et al.*, 1999). Um desses genes pode ser o KLK2 (calicreína glandular humana), no qual já foram identificados diversos SNPs, os quais devem ser melhor estudados.

Nam *et al.*, (2005) estudaram 13 diferentes polimorfismos em vários genes sendo que apenas dois foram associados positivamente ao câncer de próstata, TNF- locus 308 do gene TNF alfa e C748T do gene KLK2 (polimorfismo estudado neste trabalho). O polimorfismo C748T faz com que ocorra a troca de um aminoácido Arg²⁵⁰-hK2 para um Trp²⁵⁰-hK2, tornando assim a proteína inativa (CHIANG *et al.*, 2005; NAM *et al.*, 2003).

O objetivo do trabalho foi estudar a frequência do polimorfismo C748T, troca de citosina (C) por timina (T) na posição 748 do cDNA, do gene KLK2 em pacientes com CaP. No DNA está base está na posição 5089, mas já recebia a denominação C748T se referindo ao cDNA de outros autores.

Outro objetivo foi substituir a genotipagem pela enzima de restrição *Msp I* pelo LIS-SSCP, pois essa técnica foi utilizada com o intuito de minimizar os custos e para que mudanças no padrão das bandas obtidas indicassem a existência de outras possíveis mutações.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Obtenção das amostras

Desde 2001 foram coletados sangue periférico e tecido prostático de 238 pacientes, que foram submetidos à biópsia, ressecção transuretral (RTU) ou prostatectomia radical. As coletas foram feitas no Hospital de Clínicas da UFU pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia, mediante aprovação do Comitê de Ética da UFU e autorização dos pacientes, os quais assinaram Termo de Consentimento (ANEXO I). O procedimento de coleta foi realizado dentro da rotina do setor cirúrgico, sem causar desconforto adicional aos pacientes.

O sangue foi coletado em tubo tipo *vacutainer*TM contendo K₂EDTA 7,2mg e enviadas ao Laboratório de Genética Molecular, armazenadas em câmara fria à 4°C, fazendo parte de um banco de amostras de DNA e RNA do Laboratório de Genética Molecular (LABGEM). Os fragmentos de tecido, depois de coletados, foram acondicionados em solução fisiológica à -80°C.

Das amostras obtidas, 238 eram de sangue, sendo que 108 foram caracterizadas como hiperplasia benigna e 130 como adenocarcinoma prostático. E 75 eram de tecido, sendo 46 tecidos de CaP e 29 de HPB, sendo esses dos mesmos pacientes que tiveram o sangue coletado. A idade desses pacientes variou de 48 a 87 anos, com média de 64 anos. Para complementação do presente estudo, foram coletadas ao acaso amostras de sangue periférico de 160 homens aparentemente saudáveis (grupo controle), com idade média de 23 anos.

2.2- Extração do DNA total

O DNA foi extraído, conforme protocolo otimizado no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (ANEXO II e III).

Após a extração do DNA genômico, três microlitros foram analisados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 0,8%, tampão TBE (45mM Tris-borato, pH 8,3 e 1mM EDTA) 0,5X, corado com 0,5µg/ml de brometo de etídio e visualizado por luz ultravioleta (sistema de vídeo documentação – VDS *ImageMaster*-Pharmacia Biosciences). Após avaliação, o ácido

desoxirribonucleico foi armazenado à -20°C, passando a fazer parte do Banco de ácidos nucleicos do LABGEM.

2.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a extração, o fragmento de DNA do gene KLK2 foi amplificado por meio dos *primers* direto 5' GGA ATT GCT CTC AGT CAT CTG 3' e reverso 5' CAG AAC GTG AGG TGG ACT TA 3', que anelam no éxon 5 (NC_000019), em uma reação que continha além dos 4 pmol de *primers* e dNTPs, 0,5U Taq DNA polimerase, tampão 10X (Tris HCl 100mM; KCl 500mM; MgCl 1,5mM), DNA e água para completar a reação final de 20µl. As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-150 Mini Cycler TM (MJ Research), com um programa que iniciou com um ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 59°C por 40 segundos e extensão à 72°C por 50 segundos.

Após a amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% e tampão Tris-Borato EDTA 0,5X (TBE) (SAMBROOK *et al.*, 1989), o gel foi submetido a uma voltagem de 120 volts de 30 à 40 minutos e corado com 0,5µg/ml brometo de etídeo. Para análise do produto amplificado em quatro microlitros de cada amostra foram adicionados 2µl de tampão de carregamento *Loading Dye* (azul de bromofenol 3,61M; xileno cianol 4,64M; sacarose 1,71M), e verificado o peso molecular correspondente a 314 pb.

2.4- PCR-RFLP (Polimorfismos no Comprimento dos Fragmentos de Restrição)

O Fragmento amplificado de 314 pb foi a clivagem pela enzima de restrição *Msp I* (reconhece o sítio de clivagem C[↓]CGG), gerando um fragmento de 222 pares de base e um de 92 pares de bases. Para essa reação foi usado um volume final de 10µl contendo 3U de *Msp I*, tampão 1X da enzima e 7µl de produto amplificado. O volume final foi completado com água ultrapura e a reação foi submetida a 37°C *overnight*.

A restrição foi visualizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo a 100V por 1 hora em tampão TBE 0,5X e posteriormente visualizado em transluminador de luz ultravioleta (UV) e fotodocumentado em sistema de vídeo-documentação (VDS-Imagesystem- Amersham).

2.5- PCR-LIS-SSCP

Foram misturados em 19 μ l de tampão LIS (10% de sacarose, 0,01% de azul de bromofenol e 0,01% de xileno cianol) 1 μ l do produto amplificado, homogeneizados e aquecidos à 95°C por 12 minutos e imediatamente transferidos para gelo. Aparatos de géis de poliacrilamida contendo 12% acrilamida:bis (49:1) com espaçadores de 0,5mm foram montados. Foram aplicados no gel 10 μ l de cada amostra e submetidas à eletroforese vertical em tampão TBE 1X com uma pré-corrida de 300 volts por 15 minutos e de 250 volts, por 17 horas. Ao final da corrida, as placas foram separadas, o gel foi corado por nitrato de prata, segundo protocolo otimizado pelo Laboratório de Genética Molecular da UFU (ANEXO IV), e seco com duas folhas de papel celofane poroso.

2.6- Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa BioEstat 3.0 (AYRES *et al.*, 2003), foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$. Realizaram-se as análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg para as frequências genotípicas e alélicas de cada grupo.

Foi feito para verificar se havia relação da mutação C748T com o câncer de próstata o teste qui-quadrado com correção de Yates e intervalo de confiança de 95%. O *Odds Ratio* foi calculado para verificar a chance ou probabilidade de ocorrência de adenocarcinoma da próstata, para cada genótipo.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos após a extração do DNA provenientes das amostras de sangue periférico e tecido coletados de pacientes com adenocarcinoma da próstata, hiperplasia prostática benigna e do controle populacional (apenas sangue) podem ser visualizados na Figura 3. A amplificação do fragmento de DNA que corresponde ao gene KLK2 pode ser visualizada na Figura 4. Na Figura 3 observou-se que o DNA obtido foi de boa qualidade, gerando produtos amplificados sem bandas inespecíficas que poderiam influenciar o LIS-SSCP (Figura 4).



Figura 3: Produto de extração de DNA obtido do sangue periférico dos casos analisados (CaP, HPB, controle) e utilizado para amplificação do gene KLK2.

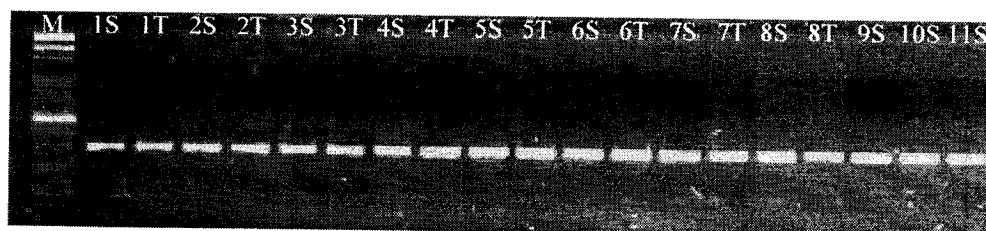


Figura 4: Qualidade do produto amplificado pela PCR do gene KLK2 (314 pb). M: marcador de 100 pb. S: sangue. T: tecido. Colunas 1-4: produto obtido de pacientes com CaP. Colunas de 5-8: produto obtido de paciente com HPB. Coluna 9-11: produto obtido do controle populacional.

A técnica de RFLP com a enzima de restrição Msp I, verifica-se a mudança de C para T, onde for CCGG a enzima reconhece e restringe, nos pacientes polimórficos CTGG a enzima de restrição não reconhece e não cliva. O padrão obtido no PCR-RFLP está demonstrado na Figura 5. Foram observadas três bandas com padrões de migração

diferenciados, dependendo do genótipo. Assim, indivíduos homozigotos normais apresentam o genótipo CC, com bandas de 222 e 92 pb; indivíduos heterozigotos apresentam genótipo CT, com bandas de 314, 222 e 92 pb e os indivíduos homozigotos mutantes apresentam o genótipo TT, com banda de 314 pb. O padrão de bandas obtido na Figura 5 foi o esperado, pois o sítio de restrição “CCGG” para corte da enzima *Msp* I, encontra-se na sequência de DNA normal, estando presente em indivíduos normais e heterozigotos e ausente na sequência de DNA mutante, evidenciado em indivíduos mutantes e heterozigotos.

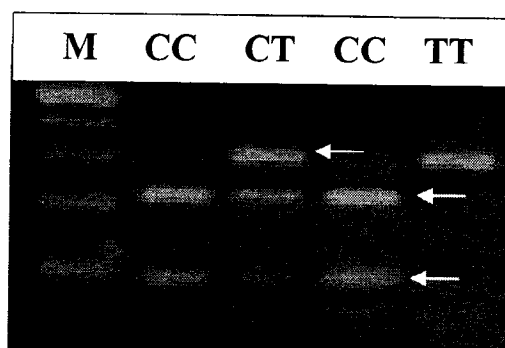


Figura 5: PCR-RFLP em gel de agarose 2,0%. Os genótipos do polimorfismo C748T do gene KLK2 se distinguem dependendo do padrão das bandas, evidenciado pelas setas: TT - 314 pb; CT-314, 222 e 92 pb e CC - 222 e 92 pb. M: marcador de 100 pb.

Na Figura 6 observa-se o padrão obtido para migração diferencial das fitas normais e mutantes em gel de LIS-SSCP 12%. O padrão de bandas obtido foi capaz de distinguir todos os genótipos: os indivíduos homozigotos normais (CC) são representados por duas bandas (superior e inferior); os indivíduos heterozigotos (CT) apresentam três bandas (superior, intermediária e inferior); e os indivíduos homozigotos mutantes (TT) são representados por duas bandas (intermediária e inferior). Os mesmos produtos amplificados foram submetidos à restrição enzimática e a corrida em gel de LIS-SSCP e demonstraram padrões equivalentes de bandas, permitindo a distinção entre genótipo normal e mutante pela migração diferencial de bandas. Dessa forma optou-se no presente trabalho, pela técnica de LIS-SSCP por ter um custo menor e ter repetido com fidelidade os dados do RFLP.

O padrão apresentado por essa técnica é resultado não apenas do peso molecular das fitas de DNA, mas, principalmente, da conformação adquirida por cada uma de acordo com suas seqüências de nucleotídeos (HOSHINO *et al.*, 1992).

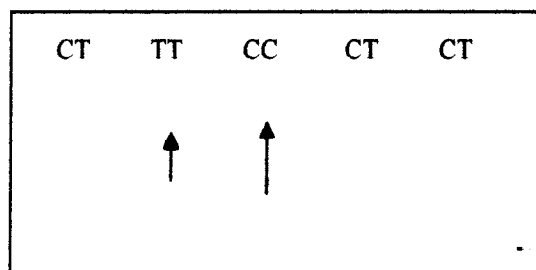


Figura 6: Padrão de PCR-LIS-SSCP para o polimorfismo C748T do gene KLK2 em gel de poliacrilamida 12%. Como cada banda representa uma fita desnaturada do DNA, os genótipos dos indivíduos foram evidenciados pela migração diferenciada de cada fita. As setas indicam a presença da fita normal (maior) e a fita mutante (menor).

No presente trabalho, foram observados outros padrões de conformação dados pelo LIS-SSCP (Figura 7), os quais possuem repetitibilidade e pouca freqüência (apenas 6 pacientes com padrões de conformação diferente). Assim, outro ponto importante a considerar é que além de repetir os resultados da restrição enzimática, a técnica de LIS-SSCP foi capaz de identificar outras mudanças de bases, pois a conformação final de cada fita simples foi alterada. Isso pode ser devido a presença de uma outra mutação nessa mesma região analisada, cujo papel em doenças prostáticas ainda devem ser reavaliados. Posteriormente esses produtos serão seqüenciados para determinar a posição dessa nova mutação.

Os pacientes com novos padrões de conformação foram genotipados por PCR-RFLP e incluídos na amostragem de acordo com o genótipo dado pela restrição, sendo que os indivíduos DC (Figura 7) foram genotipados como CC e os indivíduos DT como CT. Isso significa que mesmo tendo um padrão diferenciado no LIS-SSCP, é possível diferenciar CC de CT.

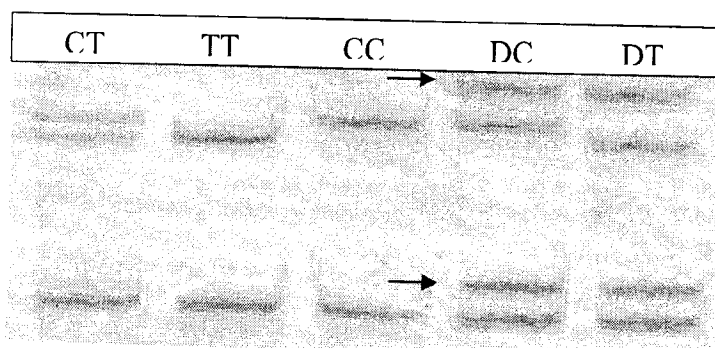


Figura 7: Diferentes padrões de genótipos para o polimorfismo C748T do gene KLK2 obtidos em gel de LIS-SSCP 12%. D: padrões diferentes. CC: homozigoto normal. CT: heterozigoto mutante. TT: homozigoto mutante. As setas evidenciam as bandas diferenciadas.

A maior parte dos genótipos foram apenas confirmados pela duplicata com análise do tecido prostático, contudo 3 pacientes tiveram genótipos diferenciados entre sangue e tecido, sendo 2 pacientes com HPB e 1 com CaP (Tabela 1). Esses pacientes foram retirados da análise estatística.

Tabela 1: Pacientes que tiveram genótipos diferenciados para o polimorfismo C748T do gene KLK2 em amostras de sangue periférico e tecido prostático.

Paciente	Cirurgia/Laudo	Genótipo sangue	Genótipo tecido
1	RTU/HPB	CC	CT
2	RTU/HPB	CC	CT
3	RAD/CaP	CT	CC

RTU: Ressecção transuretral. RAD: Prostatectomia Radical

Autores como Stamey e McNeal, (1992) sugerem que a hiperplasia prostática benigna é uma das etiologias do câncer de próstata, portanto, o fato do alelo T ser encontrado no tecido analisado como HPB, pode significar que este paciente está evoluindo de HPB para câncer. Esta mudança pode estar associada à progressão ou desenvolvimento deste tumor, sendo um evento precoce ou intermediário, porém não obrigatório. Mas são necessários mais estudos e aumento da amostra de tecidos para que se possa chegar a maiores conclusões.

Sendo os tumores de próstata heterogêneos e multifocais (NARAYAN, 1994), o fato do alelo T não ter sido encontrado no tecido pode significar que naquela amostra

analisada não havia mudanças de C para T, mas em um outro ponto da próstata o alelo T já pode ser observado, já que o alelo T foi encontrado no sangue.

A distribuição geral dos genótipos CC, CT e TT foi respectivamente de 44,97%, 48,25% e 6,78%. As frequências genotípicas e alélicas obtidas estão descritas na Tabela 2, juntamente com os respectivos valores de p obtidos pelo teste do qui-quadrado (χ^2). A população analisada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores de p foram significativos apenas quando comparamos a amostra CaP com a HPB, significando que há diferença significativa entre os genótipos dos pacientes com câncer e com hiperplasia da próstata, havendo assim uma associação entre genótipos e câncer.

A frequência encontrada para o alelo C foi de 64,23% no câncer, 73,15% em doença benigna e 70,31% no grupo controle. Para o alelo T, a frequência observada foi de 35,77% no grupo CaP, 26,85% na HPB e 29,69% na população. Observamos que a maior frequência do alelo C foi no grupo de doença benigna (HPB) e a maior frequência de T foi no grupo CaP, mostrando a ligação do alelo C à HPB e do alelo T ao câncer ($P=0,037$).

Tabela 2: Frequência alélica e genotípica do polimorfismo C748T do gene KLK2 dentro de cada grupo analisado: câncer (CaP), hiperplasia benigna (HPB) e controle populacional.

	Valores de p					
	CaP	HPB	Controle	CaPxControle	HPBxControle	CaPxHPB
No alelo(%)						
C	167 (64.23)	158 (73.15)	225 (70.31)	0.1196	0.4758	0.0374
T	93 (35.77)	58 (26.85)	95 (29.69)			
No genótipo(%)						
CC	49 (37.69)	57 (52.78)	73 (45.62)	0.2094	0.3715	0.0651
CT	69 (53.08)	44 (40.74)	79 (49.38)			
TT	12 (9.23)	7 (6.48)	8 (5.00)			
No genótipo(%)						
CC/CT	118 (90.77)	101 (93.52)	152 (95.00)	0.1574	0.6048	0.4359
TT	12 (9.23)	7 (6.48)	8 (5.00)			
No genótipo(%)						
CC	49 (37.69)	57 (52.78)	73 (45.62)	0.1736	0.2505	0.0197
CT/TT	81 (62.31)	51 (47.22)	87 (54.38)			
Total	130	108	160			

Valores de p conforme teste Qui-quadrado de independência.

O Odds Ratio (OR) para o alelo T foi de aproximadamente 1.52 vezes maior no câncer quando comparado ao HPB ($IC_{95\%}=1,02-2,25$; $P=0,04$). Por outro lado, quando juntamos os genótipos CT+TT o OR foi de 1.85 vezes maior no CaP ($IC_{95\%}=1,10-3-10$; $P=0,03$), mostrando que a presença de apenas um alelo T predispõe a maior chance de câncer.

Na Figura 8, foi observada a distribuição dos genótipos nos grupos em estudo. O genótipo CT é o mais freqüente em CaP e no controle, isso pode ser explicado devido ao desequilíbrio das freqüências genotípicas dentro do grupo controle ($P<0,02$), indicando estar sob efeito de seleção, e não se sabe quais desse indivíduos desenvolverão o câncer futuramente. Interessantemente, após a população ser estratificada nos grupos HPB e CaP, estas atingem o equilíbrio das freqüências ($P>0,05$).

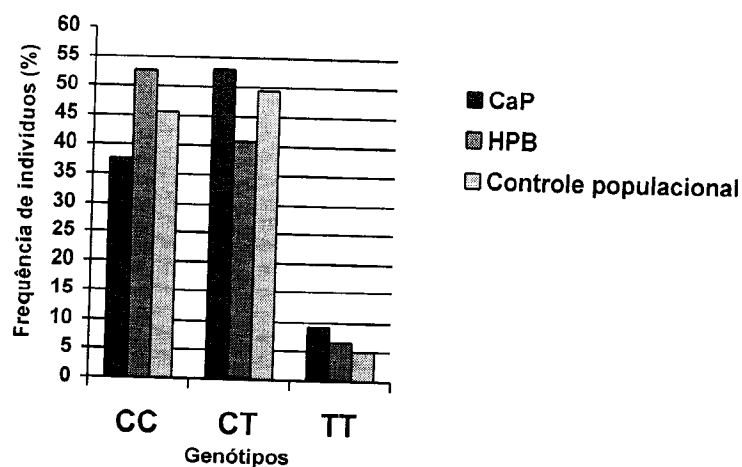


Figura 8: Distribuição da freqüência genotípica CC, CT e TT do polimorfismo C748T do gene KLK2 entre os indivíduos com câncer de próstata (CaP), hiperplasia prostática benigna (HPB) e controle populacional masculino.

Para melhor esclarecer a influência do alelo T no câncer de próstata, dividiu-se os genótipos em 2 grupos CC e CT+TT (Tabela 2 e Figura 9), o contrário também foi feito: CC+CT e TT (Tabela 2).

Foi observado que o genótipo CC foi mais freqüente nos pacientes com doença benigna enquanto os genótipos CT/TT foi mais freqüente em pacientes que apresentavam carcinoma (Figura 9), sugerindo assim que T está relacionado ao câncer ($P=0,019$), Herrala *et al.* (1997) demonstraram que *in vitro*, Arg²⁵⁰-hK2 (genótipo CC) tinha atividade, enquanto Trp²⁵⁰-hK2 (genótipo TT) não mostrava atividade enzimática,

considerando que *in vivo*, a troca de C por T pode tornar a proteína inativa, esta poderá não ser reconhecida e assim não desempenhar seu papel funcional, contribuindo para o desenvolvimento do câncer. Mas o papel funcional da Trp²⁵⁰-hK2 e da Arg²⁵⁰-hK2, ainda não são bem conhecidos.

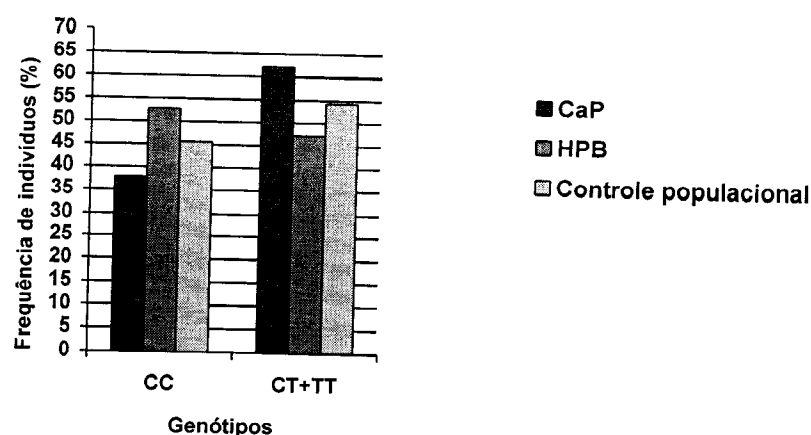


Figura 9: Distribuição da frequência genotípica comparando CC com CT+TT do polimorfismo C748T do gene KLK2 entre os indivíduos com câncer de próstata (CaP), hiperplasia prostática benigna (HPB) e controle populacional masculino.

Altos níveis séricos de hK2 se relaciona com câncer não confinado ao órgão, podendo distinguir antes da cirurgia os estágios T2a/b de T3a (HAESE *et al.*, 2000). NAM *et al.* (2003) demonstraram que os genótipos TT e CT estão relacionados a altos níveis séricos de hK2. Isto pode sugerir que a proteína inativa está se acumulando por não ter atividade enzimática, ou seja, a proteína não é reconhecida, não atua normalmente em sua via o que contribui para o desenvolvimento do câncer.

Bostwick (1999) estudou o comportamento do hK2 na HPB, no PIN de alto grau e no CAP obtendo valores superiores aos normais de 51%, 73% e 88% respectivamente. Reafirmando, então, o conceito de que o PIN de alto grau é uma lesão pré-maligna, também concluiu que a hK2 está associada à expressão de tumor, contrariamente ao PSA, que também se altera em fenômenos não tumorais.

Ao compararmos o grupo de pacientes com CaP da população brasileira, analisada no presente estudo, com aqueles da população norte-americana (USA) (NAM *et al.*, 2005) e da chinesa (CHIANG, 2005), observamos (Teste KAPPA) que para o genótipo TT (Figura 10 e Tabela 3), a frequência desses pacientes foram mais semelhantes àqueles de população norte-americana e divergente da chinesa. Contudo, essas são três populações bem diferentes, estando em um dos extremos a chinesa e no

outro a brasileira, sendo que a norte-americana ocupa uma posição intermediária (Figura 10).

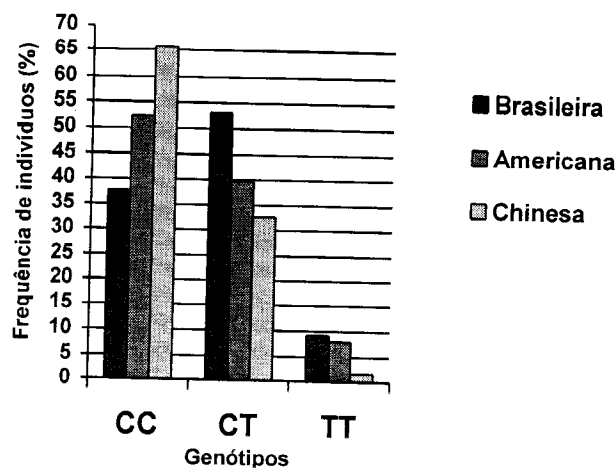


Figura 10: Distribuição da frequência genotípica CC, CT e TT do polimorfismo C748T do gene KLK2 no grupo de indivíduos com câncer de próstata (CaP), analisando as populações chinesa, americana e brasileira (este estudo).

Tabela 3: Frequência alélica e genotípica do polimorfismo C748T do gene KLK2 do grupo CaP nas populações: Brasileira (BRA, desse estudo), Chinesa (CHI) e Norte-americana (USA).

	BRA	CHI	USA
No alelo(%)			
C	167 (64.2)	417 (82.1)	1438 (72.2)
T	93 (35.8)	91 (17.9)	554 (27.8)
No genótipo(%)			
CC	49 (37.7)	167 (65.7)	522 (52.4)
CT	69 (53.1)	83 (32.7)	394 (39.6)
TT	12 (9.2)	4 (1.6)	80 (8.0)
No genótipo(%)			
CC/CT	118 (90.8)	250 (98.4)	916 (92.0)
TT	12 (9.2)	4 (1.6)	80 (8.0)
No genótipo(%)			
CC	49 (37.7)	167 (65.7)	522 (52.4)
CT/TT	81 (62.3)	87 (34.3)	474 (47.6)
Total	130	254	996

Sendo assim o genótipo CC foi mais presente na população chinesa (65,7%), e o CT e TT, na população brasileira (62,3%), ou seja as duas populações são o oposto, assim como a incidência do câncer que é baixa entre os chineses e alta nos brasileiros. Mas a incidência do câncer de próstata é maior na população norte-americana do que na brasileira. Isso pode ser parcialmente explicado pela diferença étnica e pelos hábitos de vida, Nam *et al.* em 2005 revelaram que na população dos Estados Unidos 5,7% dos brancos, 17,5% dos negros e apenas 1% dos asiáticos apresentam genótipo TT no polimorfismo C748T.

Considerando que na população americana 77,4% da população é de origem branca, 11,4% negros e 11,2% têm outra origem, podemos explicar os baixos índices dessa mutação nos USA, já que lá não ocorre grande mistura de raças como no Brasil onde 53,8% são brancos, 39,1% parda, 6,2% negros, 0,5% amarela e 0,4% indígenas, ou seja, devido a dificuldade de classificação entre branco e negro, foi necessário subdividir mais essa população (IBGE, 2004).

O alelo C é mais comum na população chinesa (82,1%), e o alelo T mais freqüente na brasileira (35,8%). A população americana tem proporção alélica intermediária devido a baixa mistura racial, que tem aumentado nos últimos anos assim com os índices da doença.

Futuramente aumentaremos a amostragem de tecidos para verificar a perda de heterozigose, e faremos o sequenciamento das bandas incomuns do gel de acrilamida, para verificar se há novas mutações não descritas.

Uma outra etapa do trabalho será fazer a correlação entre genótipos e estadiamento anatomo-patológico dos adenocarcinomas e o grau histológico do tumor proposto por Gleason, para verificar se o polimorfismo C748T está relacionado com o desenvolvimento e avanço do câncer.

4- CONCLUSÕES

Embora os resultados das frequências CC e CT brasileiras sejam contraditórios com os da população americana e significativamente diferentes ($P < 0,05$), as conclusões finais para ambas as populações sugerem que o alelo T seja o responsável pela predisposição ao CaP.

Este estudo contradiz os resultados chineses, que indicam o alelo C como responsável pelo maior risco em desenvolver o CaP, nos sugerimos que o alelo T, que aparentemente codifica uma proteína inativa, está associado ao câncer de próstata, predispondo 1.85 vezes mais os portadores de CT ou TT ao desenvolvimento desse câncer (IC 95%, 1,10-3,10; $P = 0,02$).

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYRES, M.; AYRES-JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat. Aplicações bioestatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Versão 3.0. Belém, Pará, Brasil, 2003.
- BECKER, C.; PIIRONEN, T.; PETTERSSON, K.; BJORK, T.; WOJNO, K.J.; OESTERLING, J.E. et al: Discrimination of men with prostate cancer from those with benign disease by measurements of human glandular kallikrein 2 (HK2) in serum. *J Urol* . 2000, v.163, p.311.
- BHoola, K.D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikrein, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.*, 1992, p.44.
- BORGONÃO, C. A.; MICHAEL, I. P.; DIAMANDIS, E. P.; Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res*. 2004, v. 2(5), p.257-280.
- BOSTWICK DG Prostatic intraepithelial neoplasia. In *Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment*, Eds AV Kaisary, GP 1999, p. 35-50.
- CENTRO DE TERAPIAS. Disponível em: <<http://www.centrodeterapias.com.br>>. Acesso em: 20 janeiro 2007.
- CHAN JM, STAMPFER MJ ; GIOVANNUCCI EL What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. *Seminars in Canc Biol* 1998, v.8, p. 263-273.
- CHIANG, C; HONG, C.; CHANG, Y.; CHANG, L.S.; CHEN, K. Human kallikrein-2 gene polymorphism is associated with the occurrence of prostate cancer. *The Journ of Urol*, 2005, v.173, p. 429-432.
- 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*. v. 1, p. 880-886, W. B. Saunders Company , 6. ed. Philadelphia. 1992.
- COFFEY, D. S. Prostate Cancer an Overview of an Increasing Dilema. *Cancer*, 1993, v. 71, p. 880-886.
- CORREO-CERRO, L.; BERTHON, P.; HÄUSSLER, J.; BOCHUM, S.; DRELON, E.; MANGIN, P.; FOURNIER, G.; PAISS, T.; CUSSENOT, O.; VOGEL, W. Vitamin D receptor polymorphisms as markers in prostate cancer. *Hum Genet*, 1999, v. 105, p. 281-287.
- COTRAN, R.; ROBBINS ,S; KUMAR, V. Robbins Pathologic Basis of Disease, 5th edition, 1994. W.B Saunders Company.
- CUSSENOT, O.; VALERI, A. Heterogeneity in genetic susceptibility to prostate cancer. *Europ Journ of Inter Medi*, 2001, v. 12, p. 11-16.
- DARSON, M. F.; PACELLI, A., ROCHE, P., RITTENHOUSE, H. G., WOLFERT, R.L., YOUNG, C. Y. et al: Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. *Urology*, 1997, v. 49, p. 857.
- DIAMANDIS, E. P., YOUSEF, G. M. Human Tissue Kallikreins: A Family of new cancer biomarkers. *Clinic Chem*, 2002, v.48:8, p.1198-1205.
- ERHART, E. A. *Elementos de Anatomia humana*. 8 ed. São Paulo: Atheneu, 1992, p.272.
- FRENETTE, G.; TREMBLAY, R. R.; LAZURE, C.; DUBE, J. Y. Prostatic kallikrein hK2, but not prostate-specific antigen (hK3), activates single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Int J Cancer*, 1997, v.71, p. 897

- GOSLING, J. A.; HARRIS, P. F.; HUMPHERSON, J. R.; WHITMORE, I.; WILLAN, P. L. T. Pelve e Períneo. In: *Anatomia Humana*. 5^ª ed. São Paulo: Manole, 1992, 5.16-5.17.
- GRIFFITHS, K.; MORTON, M. S. Aspects of the cell biology of prostate cancer. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. (Ed). *Textbook of prostate cancer: pathology, diagnosis and treatment*. Londres: Martin Dunitz, 1999, p. 51-74.
- HAESE A, BECKER C, NOLDUS J, GRAEFEN M, HULAND E, HULAND H, LILJA H. Human Glandular Kallikrein 2: A Potential Serum Marker for Predicting the Organ Confined Versus NonOrgan Confined Growth . 2000, *J Urol*; v.163(5), p.1491-1497
- HERRALA, A.; KURKELA, R.; PORVARI, K.; ISOMAKI, R.; HENTTU, P.; VIHKO, P.; Human prostate-specific glandular kallikrein is expressed as an active and an inactive protein. *Clin Chem*, 1997, 43 (2) p. 279-284.
- HOSHINO, S.; KIURA, A.; FUKUDA, K.; SASAZUKI, T. Polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA 1 and DPB1 genes: a simples, economical and rapid method form histocompatibility testing. *Hum Immunol*, 1992, v. 33, p. 98-107
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 01 fevereiro 2007
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Câncer de próstata*. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/câncer/tipos/próstata>>. Acesso em: 20 janeiro 2007.
- ISAACS, J, T. Molecular makers for prostate cancer metastasis: developing diagnostic methods for predicting the aggressiveness of prostate cancer. *American Journ of Pathol*. 1997, v. 150, p. 1511-1521.

- JARMULOWICZ MR The role of pathology in biopsy, diagnosis and management of prostate cancer. In *Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment*, 1999. p. 16-33. Eds AV Kaisary, GP Murphy, Denis L ; K Griffiths. London: Martin Dunitz Ltd.
- KUMAR, A.; MIKOLAJCZYK, S.D., GOEL, A.S.; MILLAR, L.S. SAEDI, M. S. Expression of pro forma f prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Res*, 1997, v.57, p.3111.
- MEARES-JUNIOR, E. M. Prostatitis and related disorders. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. *Campbell's Urology*. v.1, p. 807-822. W. B. Saunders Company: 6 ed. Philadelphia. 1992.
- MEOLA, J.; GOULART, L.R. OLIVEIRA, J. D.D.; NEVES, A.F.; *et al.* Differential expression of the KLK2 and KLK3 genes in peripheral blood and tissues of patients with prostate cancer. *Genet and mol biol*, 2006. v.29.
- MOVAT, H. Z.; The plasma kallikrein-kinin system and its interrelationship with other components of blood. In: *Bradykinin, kallidin and kallikrein*. EDS ERDOS, E. D. Berlim: New York, 1979, p.1-89.
- NAM, R. K.; ZHANG, W.W.; *et al.* Single nucleotide polymorphism of the human kallikrein-2 gene highly correlates with serum human kallikrein-2 levels and in combination enhances prostate cancer detection. *Journ of Clin Onc*. 2003, v. 21, p.2312
- NAM, R. K.; ZHANG, W.W.; *et al.* The use of genetic markers to determine risk for prostate cancer biopsy. *Clin Cancer Res*. 2005, v. 11(23), p.8391.
- NARAYAN, P. Neoplasias da próstata. In: Tanagho, E.A. ; Mcaninch, J.W. Smith-*Urolog ger*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 292-293.
- NATIONAL CENTER BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 20 janeiro 2007.

- PARTIN, A.W.; CATALONA, W.J.; FINLAY, J.A.; DARTE, C.; TINDALL, D.J.; YOUNG, C.Y. et al: Use of human glandular kallikrein 2 for the detection of prostate cancer: preliminary analysis. *Urol*, 1999, v. 54, p. 839.
- REHAULT, S.; MONGET, P.; MAZERBOURG, S.; TREMBLAY, R.; GUTMAN, N.; GAUTHIER, F. ET AL: Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as potencial physiological substrates for human kallikreins hK2 and hK3. *Eur J Biochem* 2001, v. 268, p. 2960.
- ROHR, H. P.; BARTSCH, G. H benign prostatic hyperplasia: a stromal disease? New perspectives by quantitative morphology. *Urol*. 1980, v. 16, p. 625-633.
- RUIJTER, E.; VAN DE KAA, C.; MILLER, G.; RUITTER, D.; DEBRUYNE, F.; SCHALKEN, J. Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endoc Rev*, 1999, v.20, p. 22-45.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A Laboratorial Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring: 2^a ed. New York, 1989, v. 1.
- SCHEDLICH, L. J.; BENNETS, B. H.; MORRIS, B. Primary Struture of a human glandular kallikrein gene. *DNA*, 1987, 6(5), p. 429-437.
- SMITH, D. R. *Urologia Geral*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979, p. 505.
- SROUGI, M. Câncer de próstata. In: SCHOR, N.; SROUGI, M. *Nefrologia, Urol, Clín*. p. 510, Ed. Sarvier: São Paulo 1998.
- SROUGI, M.; CURY, J. Hiperplasia benigna da próstata. In.: SCHIR, N.; SROUGI, M. *Nefrologia, Urol Clín*. São Paulo: Savier, 1998, cap. 6, p. 501-506.
- STAMEY, T. A.; McNEAL, J. E. Adenocarcinoma of the prostate. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. *Campbell's urology*. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992, v. 2, p. 1159-1221.

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

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

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

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

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

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

Pelos presentes termos apresentados por este documento, Eu,

_____,
concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura

Testemunhas

ANEXO II

Extração de DNA Sangue

- 1- Centrifugar o sangue total a 5.000 rpm por 40 minutos para formar uma camada de leucócitos entre o plasma e a parte sólida do sangue.
OBS: A extração com sangue total ao invés de camada de leucócitos também fica de boa qualidade.
- 2- Remover uma alíquota de 500µL de camada de leucócitos (ou de sangue total), colocar em um tubo de 2,0mL e adicionar 1,0mL de Tampão de Lise Celular gelado a cada amostra;
- 3- Vortexar cuidadosamente por 10 segundos para ressuspender as células e completar a lise;
- 4- Centrifugar a 8.000 rpm durante 5 minutos para peletar os núcleos;
- 5- Descartar o sobrenadante cuidadosamente. Adicionar 1,0mL de Tampão de Lise Celular e repetir os passos 3 e 4 até que o pellet adquira uma cor esbranquiçada;
- 6- Adicionar 400µL de Master Mix a cada tubo e pipetar "up and down" até que o pellet se desfça. Adicionar 20µL de proteinase K;
- 7- Incubar as amostras a 55°C overnight ou deixar a 65°C por 2 horas;
- 8- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos para peletar os debris celulares;
- 9- Recolher o sobrenadante em um tubo limpo e adicionar 200µL de Cloreto de Lítio 7,5M ou Cloreto de Sódio saturado (7M) a cada uma das amostras. Vortexar por 5 segundos e incubar as amostras em gelo por 10 minutos;
- 10- Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm para peletar proteínas e outros contaminantes;
- 11- Recolher o sobrenadante em um tubo limpo e adicionar 1,0mL de etanol absoluto, misturar por inversão até que os flocos de DNA se tomem visíveis (deixar overnight se o pellet for pequeno);
- 12- Centrifugar os tubos a 13.000 rpm por 10 minutos para peletar o DNA precipitado. Adicionar 1,0mL de etanol 70% sem desfazer o pellet;
- 13- Centrifugar os tubos a 13.000 rpm por 10 minutos para peletar o DNA precipitado. Retirar o etanol, deixar o pellet secar durante pelo menos 30 minutos e ressuspender em 200µL de água.
OBS: A quantidade de água depende do tamanho do pellet formado.

ANEXO III

Extração de DNA tecido

- 1- Ressuspender 100 mg de tecido em 800 μ L de tampão TLN, á temperatura ambiente, macerando a amostra com homogeneizador elétrico.
- 2- Adicionar 50 μ L de SDS 10% e 20-40 μ L de proteinase K Incubar a 55°C overnight ou deixar a 65°C por 2 horas;
- 3-Adicionar 300 μ L de Cloreto de Sódio saturado .Homogeneizar por 5 segundos e incubar as amostras em gelo por 15 minutos.
- 4-Centrifugar a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C ;
- 5- Transferir 600 μ L do sobrenadante para tubo limpo e adicionar 800 μ L de etanol absoluto
- 6- Precipitar o pellet centrifugando 15.000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- 7- Lavar com etanol 70% e repetir o passo 4
- 8- Retirar o etanol, deixar o pellet secar durante pelo menos 30 minutos e ressuspender em 150 a 250 μ L de água.
OBS: A quantidade de água depende do tamanho do pellet formado.
- 9- Diluir o pellet em banho-maria a 60°C por 45 minutos.

Tampão de TLN:

400 mM NaCl

2 mM de EDTA pH 8,0

Tris-HCl 10mM pH 7,5

Proteinase K: 10mg/ml

NaCl 6 mM

ANEXO IV

Coloração de gel de Acrilamida com prata

- 1 - Pesar 0,2g de prata em um erlenmayer, completar para 100mL de água, colocar para agitar e deixar no escuro;
- 2 - Reservar o ácido acético e lavar o gel 2 vezes durante 2 minutos;
- 3 - Acrescentar 150 μ L de formaldeído na solução com prata e deixar no escuro 30 minutos;
- 4 - Pesar 3g de carbonato de sódio para 100mL de água, agitar e colocar no gelo;
- 5 - Tirar a solução de prata e lavar 1 vez por 30 segundos;
- 6 - Acrescentar na solução de carbonato 150 μ L de formaldeído e 20 μ L de tiosulfato;
- 7 - Colocar a solução de carbonato para revelar, parar a reação com o ácido acético;
- 8 - Lavar com água;
- 9 - Secar (papel celofane molhado, gel, glicina, papel celofane molhado).

⇒ Tiosulfato: 10mg/mL