

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS DE cDNA
PARA ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA E
DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Ana Paula Carneiro dos Santos

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

**DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS DE cDNA
PARA ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA E
DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Ana Paula Carneiro dos Santos

Prof. 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

**DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS DE cDNA
PARA ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA E
EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Ana Paula Carneiro dos Santos

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Instituto de Genética e Bioquímica

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


Vera Lúcia de Campos Brites

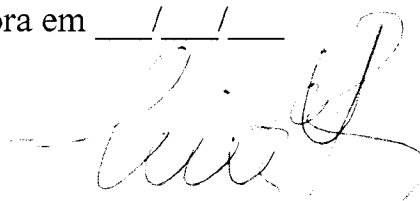
Uberlândia – MG
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

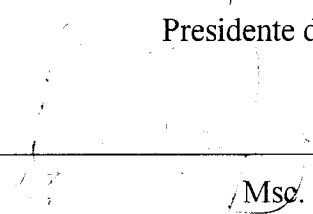
**DESENVOLVIMENTO DE BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS DE cDNA
PARA ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA E
EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Ana Paula Carneiro dos Santos

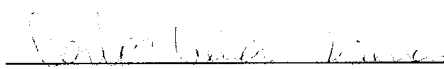
Aprovada pela banca examinadora em 1/1 Nota



Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Presidente da Banca Examinadora



Msc. Adriana Freitas Neves
2º membro da Banca Examinadora



Dr. Carlos Ueira Vieira
3º membro da Banca Examinadora

Uberlândia-MG

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) tem se manifestado como uma das causas mais comuns de doenças entre homens mais velhos. É o segundo tipo de câncer mais diagnosticado nos Estados Unidos e no Brasil após o câncer de pele, não melanoma. Para auxiliar a compreensão de diversas doenças têm surgido novas técnicas para o estudo da expressão gênica diferencial, que possibilita a identificação de genes relacionados com diversas patologias, inclusive o câncer. Este trabalho teve como objetivo analisar os genes diferencialmente expressos em sangue periférico, por RaSH (*Rapid Subtraction Hybridization*), entre os grupos câncer de próstata e controle saudável, sendo que foi um “pool” de cada grupo formado por 10 pacientes. O novo procedimento do RaSH pode ser dividido em três principais fases: produção por PCR de fragmentos representativos chamados *Tester* e *Driver*, partindo do RNA de cada população; hibridização subtrativa desses fragmentos e por fim a clonagem e sequenciamento dos diferentes produtos obtidos. Nas análises por bioinformática utilizou-se o programa Analisa, via Phred, resultados do Megabace. Posteriormente, as seqüências adquiridas foram analisadas em BlastN (nucleotídeos) e no PTC (Protein Classification Tool) para a tradução do cDNA. Foram encontradas 63 seqüências de alta qualidade, entre elas 25 corresponderam ao grupo câncer de próstata e 38 ao grupo controle saudável. No programa PTC foram obtidos as seguintes proteínas: catalase, beta hemoglobina e citocromo c. Na análise do BlastN foram encontradas ESTs (*Expressed Sequence Tags*) expressa em estômago e em biblioteca de câncer de próstata. O novo procedimento do RaSH foi eficaz para isolar clones diferencialmente expressos, mas é necessário obter um número maior de clones e também para confirmar a expressão diferencial dos cDNAs com Northern blot.

Palavras chave: Câncer de próstata, RaSH (*Rapid Subtraction Hybridization*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A glândula prostática.....	1
1.2 Doenças relacionadas à próstata.....	2
1.3 Aspectos epidemiológicos.....	2
1.4 Diagnóstico clínico.....	3
1.5 Hibridação subtrativa.....	4
 2. MATERIAL E MÉTODOS.....	 8
2.1 Obtenção das amostras.....	8
2.2 Extração do RNA total de sangue periférico.....	8
2.3 Síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR).....	9
2.4 Síntese da dupla fita de cDNA por LD-PCR.....	9
2.5 Purificação do cDNA dupla fita amplificado.....	10
2.6 Digestão do cDNA dupla fita com XhoI (Preparação do Tester).....	10
2.7 Hibridação subtrativa.....	11
2.8 Precipitação da solução de hibridação.....	11
2.9 Digestão com XhoI e desfosforilação e purificação do plasmídeo.....	11
2.10 Preparo das células eletrocompetentes	12
2.11 Clonagem.....	12
2.12 Extração de DNA plasmidial.....	13
2.13 Sequenciamento	13
2.14 Análise das seqüências.....	13

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
3.1 Preparação do cDNA.....	15
3.2 Preparação do plasmídeo.....	17
3.3 Análise das seqüências.....	18
4. CONCLUSÃO.....	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ANEXO.....	27

DEDICATÓRIA

À minha mãe Adagmar, pelo exemplo de vida, amor e o incentivo de todos dias.

Ao meu irmão Guilherme, pelo apoio e força em todos os momentos.

e toda minha família que sempre estiveram presentes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares e amigos que sempre me acompanharam e torcem pelo meu sucesso.

Ao Prof. Luiz Ricardo pela oportunidade que me foi oferecida, apoio e confiança, que foram primordiais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos do grupo de Pesquisa do Câncer de Próstata: Fabiana, Washington, Thaíse, em especial à Adriana pelos ensinamentos, paciência e exemplo de vida, e à Carol pelo grande apoio em todos os momentos de minha vida. Muito obrigada!

Ao Carlos Ueira, que foi muito importante para a realização deste trabalho, muito me ensinou sobre biblioteca subtrativa e análises de bioinformática, sempre com muita paciência e atenção. Muito obrigada!

À Juliana e Sílvia pela ajuda com os sequenciamentos.

À Fabiana e Guilherme, por tantos ensinamentos sobre a clonagem.

A equipe médica do Hospital de Clínicas da Universidade federal de Uberlândia, em especial Dr. Danielo.

À todos os meus colegas do Laboratório de Genética Molecular, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Às minhas companheiras de graduação: Carol, Gisela e Francielle.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A glândula prostática

A próstata é um órgão fibromuscular e glandular masculino, com formato esférico situada abaixo da bexiga urinária (Figura 1) (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).

Anatomicamente a próstata é dividida em cinco zonas: zona fibromuscular anterior, que contém 30% do volume da próstata, não apresenta elemento glandular e praticamente composta somente de músculo liso; zona periférica, considerada a maior subdivisão anatômica, contém 75% de tecido glandular da próstata, sendo o local onde ocorre quase todos os carcinomas; zona central, que contém 25% de tecido glandular, sendo diferenciada da zona periférica pela arquitetura da glândula e detalhes das células, incomum a carcinogênese; zona pré-prostática, que tem função de esfíncter durante a ejaculação para prevenir o refluxo do líquido seminal para a bexiga e a zona de transição, que apresenta pelo menos 5% da massa glandular normal da próstata, entretanto tem importante função por ser local de origem da hiperplasia prostática benigna (Coffey, 1992).

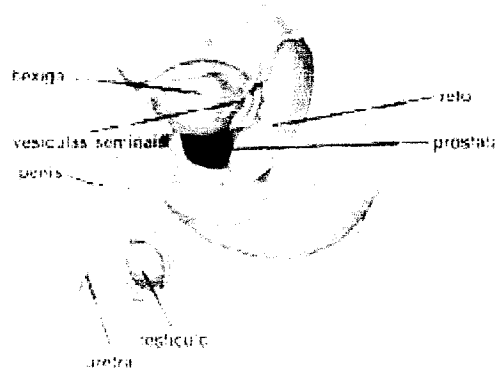


Figura 1: Localização da glândula prostática (INCA 2007)

1.2 Doenças relacionadas à próstata

Algumas doenças clinicamente importantes podem afetar a próstata nos homens adultos, como as prostatites, a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata. Estas apresentam grande significado clínico, não só pelas suas conseqüências mas, também, pela alta freqüência com que se manifestam (Srougi; Cury, 1998).

A prostatite é uma doença prostática comum, sendo rara em adolescentes, mas freqüente em homens adultos. Ocorre em formas distintas ou síndromes, as quais têm causas, características clínicas e seqüelas diferentes. As formas mais comuns são: prostatites bacterianas agudas e crônicas, prostatites não bacterianas e prostatodinia (próstata dolorida) (Meares, 1992).

A hiperplasia ocorre em quase 80% dos homens por volta dos 80 anos de idade, é um aumento no volume da próstata, resultante de um crescimento das glândulas periuretrais e não de uma simples hipertrofia (aumento no número de células) (LAPIDES, 1979; WALSH; WORTHINGTON, 1998).

Já o câncer de próstata (CaP) corresponde a uma alteração no balanço entre a proliferação e a morte celular. Durante os estágios do crescimento do câncer, as células irão responder aos mesmos fatores regulatórios (hormônio-dependentes), embora as taxas de proliferação celular sejam maiores do que as de morte celular. A disfunção no processo regulatório associada a mutações genéticas, gera um processo que leva a formação de clones autônomos de células malignas, com crescimento promovido por via autócrina que passa a não responder ao controle androgênico (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

1.3 Aspectos epidemiológicos

Nas últimas décadas, o câncer de próstata tem emergido como uma das causas mais comuns de doenças entre os homens mais velhos. Nos Estados Unidos e no Brasil é o segundo mais comumente diagnosticado após o câncer de pele, não melanoma (GRIFFITHS; MORTON, 1999; INCA, 2007) e a segunda causa de morte (COFFEY, 1993; ALBRIGHT; EELES, 1995) depois do câncer de pulmão (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

De acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), deveriam ocorrer, em 2006, 47.280 novos casos de câncer de próstata no Brasil. O aumento observado nas taxas

de incidência pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida do brasileiro (INCA, 2007).

O Sudeste do Brasil apresenta alta incidência do câncer de próstata, sendo que Minas Gerais é o segundo em casos diagnosticados e em número de óbitos (INCA, 2007). A alta mortalidade é causada pelo retardo no diagnóstico, que favorece a ocorrência de tumores com alta capacidade de invasão local e de metástase, que é a disseminação para outros órgãos (POSTE; FILDER, 1980; INCA, 2007).

A urbanização, a industrialização e o aumento na expectativa de vida são os principais fatores que contribuem para o aumento da incidência das doenças crônico-degenerativas, entre elas o câncer, visto que contribuem para o aumento de agentes cancerígenos ambientais ou para uma maior e mais prolongada exposição dos seres humanos a esses agentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

Assim como em outros cânceres, a idade é um fator de risco importante, ganhando um significado especial no câncer da próstata, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumenta exponencialmente após a idade de 50 anos (INCA 2007).

A história familiar é um importante fator de risco, embora 90% do CaP sejam atribuídos a fatores ambientais (esporádicos) e apenas 10% a fatores hereditários (ALBRIGHT; EELES 1995; CHAN et al., 1998; RUIJTER et al., 1999).

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, não só pode ajudar a diminuir o risco de câncer, como também de outras doenças crônicas não transmissíveis (INCA, 2007).

1.4 Diagnóstico clínico

O rastreamento de anomalias prostáticas é realizado principalmente por três etapas: o exame físico da próstata (toque retal), dosagem do antígeno próstata específico (PSA) e ultrassonografia transretal da próstata (USTR).

O antígeno prostático específico (PSA), uma glicoproteína de peso molecular de 34000 Da que pertence à família das calicreínas, é secretado no fluido prostático (COFFEY, 1993) e elevações nos níveis desse marcador é amplamente utilizado para o diagnóstico e

monitoramento de pacientes com o câncer de próstata. Contudo, o PSA, apesar de indicar alterações na próstata possui baixo valor preditivo, pois não é um marcador apenas de CaP, podendo seus níveis apresentar elevados em prostatites e HPB (DILLIOGLUGIL et al., 1997; CATALONA et al., 1998).

A *American Cancer Society*, juntamente com a *American Urology Association*, recomendam a realização anual do toque retal e da dosagem do PSA em todos os homens a partir de 50 anos. Nos grupos de alto risco, como em homens com história familiar desta neoplasia, as avaliações devem iniciar aos 40 anos de idade (CHAMBERLAIN et al., 1996; SELLY et al., 1996).

1.5 Hibridação subtrativa

Para auxiliar a compreensão de diversas doenças têm surgido novas técnicas para o estudo da expressão gênica diferencial, que possibilita a identificação de genes relacionados com diversas patologias, inclusive o câncer. Essas técnicas permitem a detecção de mudanças na expressão em RNA mensageiros (RNAm), entre as mais comuns incluem: *Differential Display* de RNAm, SAGE (*Sequential Analysis of Gene Expression*), RDA (*Representational Difference Analysis*) microarranjos de DNA (*DNA Microarrays*) e RaSH (*Rapid Subtraction Hybridization*) (DECKMANN, 2004).

Neste trabalho foi utilizado o protocolo de RaSH descrito por Jiang (2000), mas com modificações que possibilitaram maior rapidez e eficiência na metodologia. A técnica RaSH original é preparada com cDNAs de dupla fita que são enzimaticamente digeridos em pequenos fragmentos, ligados a adaptadores e amplificados por PCR, para posterior hibridação. Já na técnica otimizada não é necessária a ligação dos adaptadores, diminuindo o tempo de realização dos experimentos, eliminando uma etapa que poderia resultar em perda de material pela precipitação e diminuindo o custo do experimento (KUVBACHIEVA; GOFFINET, 2002).

A hibridação subtrativa é uma técnica poderosa que permite a comparação de duas populações de RNAs mensageiros e a obtenção de clones que são expressos em uma delas mas na outra não. Não é necessária nenhuma informação sobre um gene específico, o que se pretende é o isolamento de clones de cDNA correspondentes a transcritos expressos preferencialmente em uma das situações. Existem vários métodos para a geração de bibliotecas subtrativas, mas o princípio básico em todos os casos é o mesmo. Inicialmente,

purifica-se o RNA poliA⁺ de cada população de células e faz-se a síntese de cDNA. Uma das populações de cDNA é aquela que vai ser testada (teste, digerido com enzima de restrição) a outra é a que vai dirigir a subtração (driver). O cDNA teste é colocado em contato com excesso do cDNA de referência em condições que permitam o anelamento de moléculas complementares. Desse modo, os transcritos expressos em ambas as populações formarão híbridos, enquanto que os cDNAs exclusivos da situação teste não. Somente os cDNAs da população teste puderam ser clonados, pois foram digeridos previamente com a mesma enzima utilizada na digestão do vetor. Assim, obtém-se uma biblioteca de cDNA dos genes expressos na situação de interesse (PASTORIAN; HAWEL; BYUS, 2000).

Como representado na Figura 2, o novo procedimento do RaSH pode ser dividido em três principais fases: produção por PCR de fragmentos representativos chamados Tester e Driver, partindo do RNA de cada população; hibridização subtrativa desses fragmentos e por fim a clonagem e sequenciamento dos diferentes produtos obtidos.

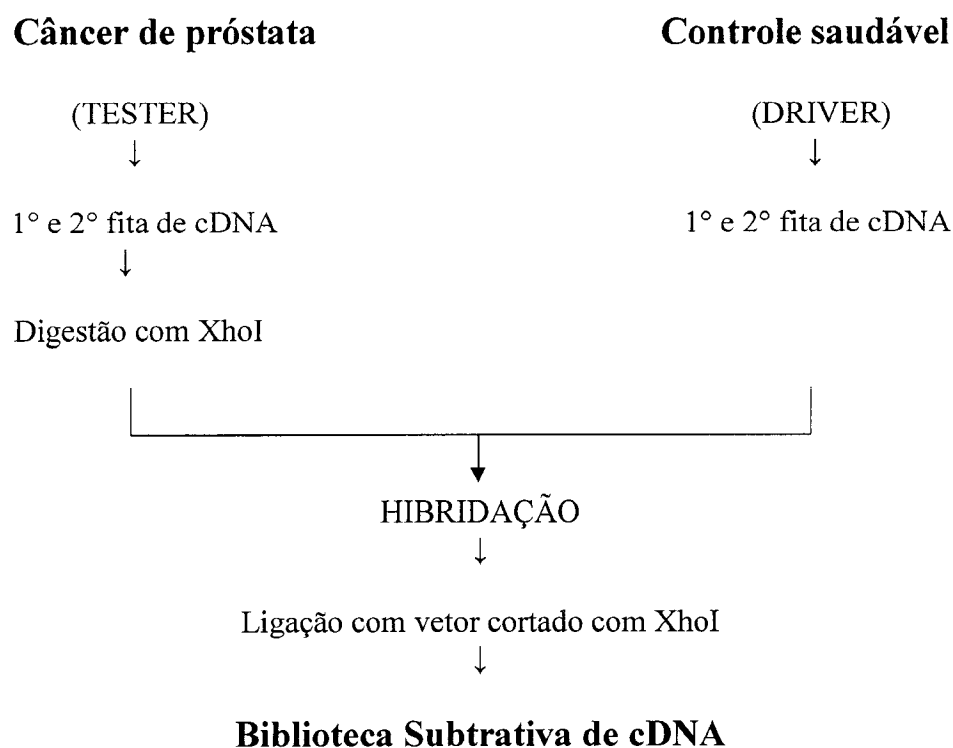


Figura 2: Representação esquemática do novo protocolo do RaSH. Esse esquema envolve a construção do Tester (Câncer de próstata) e o Driver (Controle saudável), seguida pela digestão de somente o Tester com a enzima XhoI. Após a hibridização, seqüências diferencialmente expressas são clonadas em vetor digerido com XhoI, resultando na Biblioteca subtrativa de cDNA.

A reação RT-PCR foi baseada no protocolo do kit PCR cDNA Synthesis BD SMART™ (Clontech), utilizando um primer ancorador oligodT (CDS Primer) com sequência de reconhecimento de enzima de restrição XhoI e curta sequência adaptadora (A1), e um primer (Oligo II A) apresentando um oligo-dG seguida pela sequência de reconhecimento de enzima de restrição XhoI e a mesma curta sequência adaptadora (A1). Esses primers foram modificados para que tivessem o sítio de restrição da XhoI. O primer Oligo II A se anela ao local onde foi realizada a adição de oligo-dC pela transcriptase reversa possibilitando a realização do “template switching” e a extensão da transcrição reversa (Figura 3).

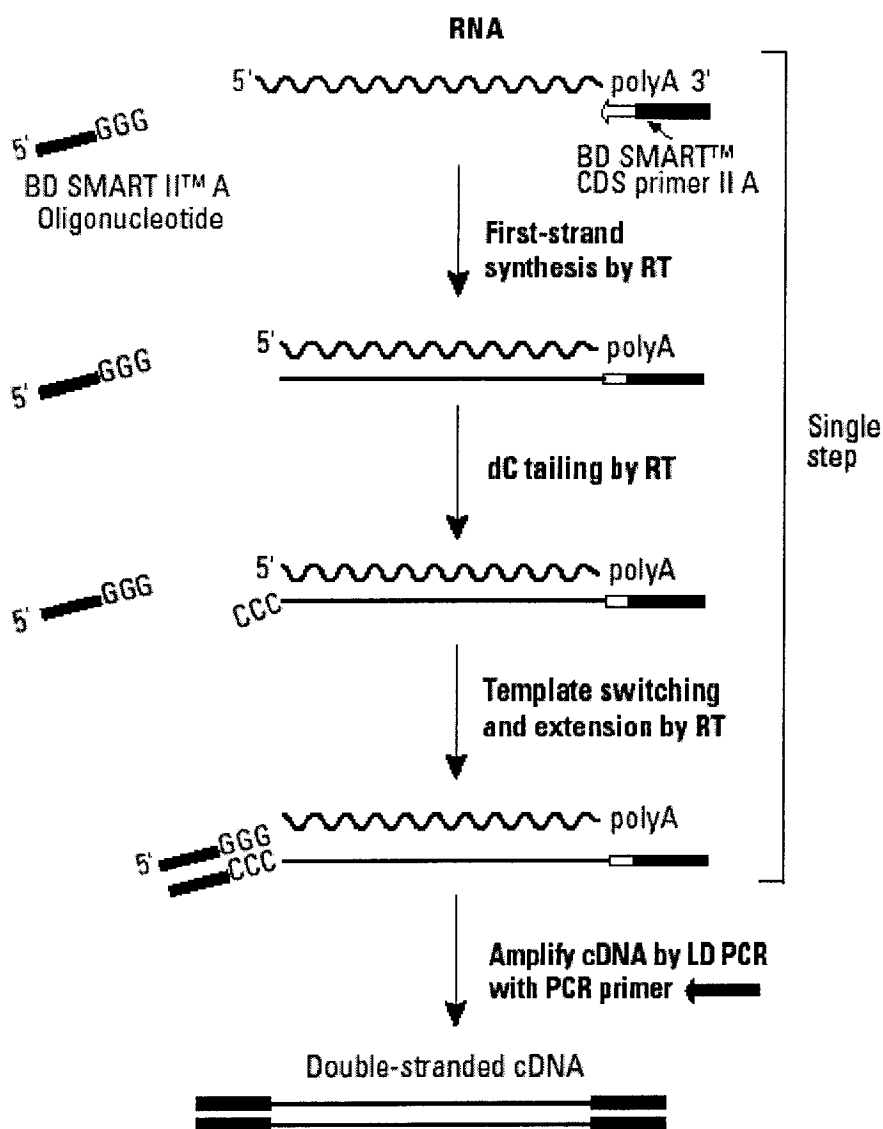


Figura 3: BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit
User Manual

A identificação de genes diferencialmente expressos tem sido usada como uma importante abordagem experimental para conhecer não somente a função gênica, mas também para compreender como os mecanismos moleculares estão relacionados com processos biológicos (Vedoy et al., 1999).

Devido à elevada incidência do câncer de próstata, o estudo molecular é importante pois permite a detecção precoce e a avaliação do estágio dessa patologia, possibilitando o aumento das chances de cura do câncer. E também poderá auxiliar no diagnóstico clínico reduzindo o uso de técnicas invasivas, que, durante muito tempo, fez com que os homens optassem por não fazer a análise clínica.

Este trabalho teve como objetivo a identificação de genes diferencialmente expressos entre pacientes com câncer de próstata e pacientes sem alterações prostáticas, definidos como controle saudável. Possibilitando a identificação de genes que possam servir como marcadores de cada processo, auxiliando no prognóstico desse câncer.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) da Universidade Federal de Uberlândia. As amostras de sangue foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia, mediante autorização dos pacientes, os quais assinaram um Termo de Consentimento (Anexo 1). O sangue foi coletado em tubo tipo vacutainerTM, e após a coleta, o material foi levado para o LABGEM e armazenado na câmara fria à -4°C, para posterior processamento. Todas as técnicas de manipulação do material biológico seguem normas do Código de Ética Médica. O projeto obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Anexo 2).

Amostras de sangue periférico foram coletadas de dois grupos distintos: o primeiro grupo câncer de próstata foi composto por pacientes com adenocarcinoma da próstata, e o segundo grupo controle saudável, formado por homens jovens com idade entre 18 e 24 anos.

A realização da técnica *rapid subtraction hybridization* (RaSH) ocorreu em paralelo para as populações câncer de próstata e controle negativo, o método segue várias etapas, que estão sendo citadas abaixo:

2.2 Extração do RNA total de sangue periférico

O RNA total do sangue periférico foi extraído conforme protocolo otimizado no Laboratório de Genética Molecular da UFU (ANEXO 3).

A qualidade do RNA foi analisada em gel de agarose numa concentração de 1,5%, corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio, submetido à voltagem de 100 volts por aproximadamente 1 hora, em tampão TBE 0,5 X (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA), em seguida, visualizado no sistema de vídeo documentação- VDS (Amersham Bioscience).

Posteriormente, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro (Amersham Bioscience) a um comprimento de onda de 260nm e 280nm. Após avaliação, o ácido ribonucléico foi armazenado à -80°C.

2.3 Síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR)

Para cada um dos grupos, câncer de próstata e controle negativo, foi feito um “pool” de RNAs da seguinte maneira, misturou-se em um tubo 1 µL de RNA de cada paciente (total de 10 pacientes) e desse pool foi retirado 1 µg para a realização da RT-PCR.

Sequência dos primers utilizados na síntese da primeira fita de cDNA:

CDS Primer:

5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA CTC GAG TTT TTT TTT TTT TTT-3'

Oligo A:

5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA CTC GAG GCG GG- 3'

A reação foi submetida às seguintes condições: 1 µg de RNA, 12,0 pmoles dos primers CDS e Oligo II A, e água DEPC (Dietilpirocarbonato) para completar 5,0 µL de volume final. As amostras foram incubadas em termociclador PTC-150 (MJ Reaserch, Inc.) à 72°C por 2,0 minutos e colocadas imediatamente no gelo por 3 minutos.

Em seguida foi adicionada a cada reação uma mistura de: 1X tampão da primeira fita, 20 mM de DTT, 200µM de cada dNTP (Desoxirribonucleotídeos Trifosfato) e 1,0 µL da enzima PowerScript RT. A reação foi gentilmente homogenizada e posteriormente incubada em termociclador a 42°C durante 1 hora.

O cDNA foi estocado à -20°C para posterior amplificação.

2.4 Síntese da dupla fita de cDNA por LD-PCR (Long distance- Polymerase Chain Reaction)

O molde gerado na reação da primeira fita foi utilizado na PCR com um único primer (SMART PCR), reconhecendo a seqüência adaptadora (A1) nos dois terminais, não sendo necessária a ligação de adaptadores para realizar a PCR. A reação seguiu o protocolo do kit PCR cDNA Synthesis SMART (Clontech).

Dois µL da fita de cDNA de fita simples foi utilizada como molde nestas reações, adicionando 1X Tampão da Taq DNA Polimerase (50 mM KCL; 10 mM Tris-HCL, ph 8,3);

2,0 µL de dNTPs (10mM); 12,0 pmoles do primer (SMART PCR) 5'- AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA CT- 3'; 2,5 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As reações foram completadas com água ultrapura para 25 µL.

O programa de PCR utilizado foi de 95°C- 1 min; 95°C- 15 seg; 65°C- 30 seg. e 72°C – 6 min, durante 25 ciclos. Foram realizadas 2 reações por biblioteca (Câncer e Controle saudável), para atingir a massa mínima de cDNA para os próximos passos.

Após a amplificação, 5 µL de cada produto de PCR misturados com 2 µL de *Loading Dye* (12,5 mg de azul de bromofenol, 4,0 g de sacarose e 5,0 mL de água) foram analisados, por eletroforese, em gel de agarose 1,5% por 45 min a 100 volts em tampão TBE 0,5x (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10mM EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo e, em seguida, visualizados e fotografados pelo sistema de vídeo documentação- VDS (Amersham Bioscience).

2.5 Purificação do cDNA dupla fita amplificado

O cDNA dupla fita foi purificado pelo kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega), segundo instruções do fabricante e, em seguida, armazenado a -20°C.

2.6 Digestão do cDNA dupla fita com XhoI (Preparação do Tester)

Após purificação, o cDNA dupla fita foi quantificado por espectrofotometria utilizando-se 260 nm como comprimento de onda para leitura. Posteriormente, o DNA foi submetido à digestão com enzima de restrição XhoI. Um micrograma de cDNA dupla fita foi digerido usando as seguintes condições: 1 µg de cDNA dupla fita, 1X Tampão R+ (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10mM MgCl₂; 100mM KCl; 0.1 mg/mL BSA), 5 U da enzima XhoI (Fermentas) e água Mili-Q para um volume final de 20 µL. A reação foi incubada em banho-maria a 37° C overnight.

2.7 Hibridação subtrativa

Cem microgramas do cDNA digerido com XhoI foi utilizado como tester, juntamente com 3 µg do cDNA *driver*, que é o produto intacto de PCR, ou seja, não sofreu digestão.

Na mistura tester e driver foram acrescentados 10 µL da solução de hibridação [0,5M NaCl; 50mM Tris, pH 7,5; 0,2% SDS; 40% (vol/vol) formamida]. Posteriormente, a mistura foi fervida por 5 minutos e depois incubada a 42°C por 48 horas em banho- maria.

2.8 Precipitação da solução de hibridação

A mistura de hibridação foi completada com água milli-Q para volume final de 100µL. Em seguida, foi adicionado à mistura para a precipitação do material: 1/10 do volume de Acetato de amônia 7,5 M, 10µL do volume de glicogênio (100 mg/mL) recém preparado e 2 volumes de etanol 100% (gelado). A precipitação ocorreu a -20° C overnight.

Posteriormente, o material foi centrifugado nas seguintes condições: 14.000g por 20 min a 4°C, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µL de etanol 70% (gelado). O produto foi novamente centrifugado sob as mesmas condições, mas por apenas 5 min, em seguida, o etanol foi retirado e os tubos colocados para secar. O precipitado da hibridação foi ressuspendido em 10 µL de água milli-Q.

2.9 Digestão com XhoI e desfosforilação e purificação do plasmídeo

O plasmídeo pBluescript II SK+ foi digerido nas seguintes condições: 2 µg de plasmídeo, 1 X Tampão R+ (10mM Tris-HCl, pH 8,5; 10mM MgCl₂; 100mM KCl; 0.1 mg/mL BSA), 2 U da enzima XhoI (Fermentas) e água Mili-Q para um volume final de 20 µL. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C overnight.

A eficiência da digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % com 10 µL das amostras digeridas e não digeridas, como controle da reação enzimática. Após verificar a digestão do plasmídeo, este foi submetido a desfosforilação com SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*).

Para a desfosforilação foi acrescentado ao produto de digestão plasmidial 1 U de SAP e incubado em termociclador por 1 hora a 37° C e a 65° C durante 20 minutos (desnaturação da SAP).

Depois da digestão e desfosforilação do plasmídeo, este foi purificado seguindo protocolo otimizado no LAGBEM (ANEXO 4). Em seguida, a eficiência da purificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5 % com tampão TBE 0,5 %.

2.10 Preparo das células eletrocompetentes de E. coli

O preparo das células eletrocompetentes foi realizado de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 5.

2.11 Clonagem

O produto da hibridação subtrativa foi ligado ao vetor pBluescript SK+ pela ação da enzima T4 DNA ligase (Fermentas). As reações de ligação foram incubadas em termociclador a 22°C por 2 horas e a 65°C por 10 minutos, utilizando-se 3µL de inserto, 50ng de vetor, 5 U de T4 DNA ligase, 1X Tampão (400mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 5mM ATP pH 7.8 a 25°C) e água milli-Q para um volume final de 10 µL.

Após a incubação, as misturas de ligação foram mantidas a -20°C antes de serem usadas em experimentos de eletro- transformação.

Aos tubos contendo alíquotas de 100 µL de células eletrocompetentes foram adicionados 3 µL de reação de ligação, misturados gentilmente e mantidos no gelo. O eletroporador MicroPulser (Bio Rad) foi ajustado no programa 2 (Ec2). A suspensão de células contendo o DNA foi transferida para cubetas de eletroporação geladas, que foram encaixadas ao aparelho e submetidas à corrente elétrica. A eletroporação seguiu os seguintes parâmetros elétricos: 2,5kV, 25µF e 200Ω e o τ esperado nessas condições é de 4,0 a 5,0 ms.

Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado meio SOC à cubeta (foi realizado três lavagens com 1mL de meio para assegurar a remoção total das células eletroporadas), sendo que o volume final de 3 mL de produto de transformação foi transferido para tubo estéril tipo

Falcon de 50mL. As culturas transformadas foram mantidas a 37°C por 1 hora, sob agitação de 250 rpm.

Decorrido este período, alíquotas das culturas foram plaqueadas com meio LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina, na presença de 200 µg/mL de X-Gal e IPTG, para a seleção dos transformantes e incubadas em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas. Estas alíquotas foram diluídas para a obtenção de colônias isoladas para posterior extração do DNA plasmidial e sequenciamento.

2.12 Extração de DNA plasmidial

O procedimento de extração de DNA plasmidial (mini-preparação) foi realizado de acordo com o protocolo descrito no ANEXO 6.

2.13 Sequenciamento

As amostras de DNA plasmidial dos grupos Câncer e Controle saudável, foram submetidas a sequenciamento automatizado no MegaBace 1000, utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Biosciences). Nesta reação, foi usado o primer universal M13 direto.

2.14 Análise das seqüências

O sequenciamento realizado no Laboratório de Genética Molecular da UFU gerou seqüências que foram armazenadas em arquivos no formato esd, que são provenientes dos eletroferogramas obtidos após o término de cada sequenciamento. Os arquivos contendo os eletroferogramas foram compactados (.zip) e analisadas no programa Analisa, via Phred, resultados do Megabace (disponível na Internet: <http://www.biomol.unb.br>), que removeu a seqüência do vetor e, posteriormente, agrupou as seqüências similares. Com o agrupamento

foram obtidos os contigs (grupos de mais de uma sequência) e os singlets (grupos com uma única sequência).

As seqüências obtidas foram comparadas em termos de similaridade utilizando-se o programa o BlastN contra ESTs (fragmentos de seqüências expressas), disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, e também foram traduzidas utilizando o programa PTC (Protein Classification Tool), disponível no site <http://biodados.icb.ufmg.br>.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Preparação do cDNA

A Figura 5 mostra a qualidade do RNA total extraído de sangue periférico do grupo câncer de próstata e controle saudável.

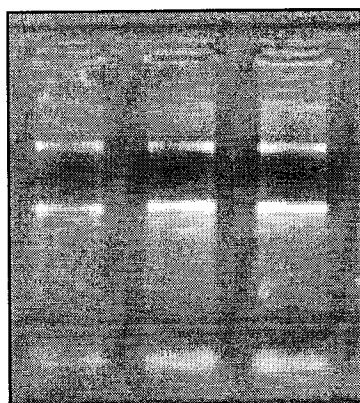


Figura 5: Pad
eletroforético do RNA to
extraído de sangue perifér

A Figura 6 representa o resultado da síntese da dupla fita de cDNA por PCR dos grupos câncer de próstata e controle saudável utilizando o kit PCR cDNA Synthesis BD SMART™ (Clontech). O kit foi eficiente e rápido para a produção de uma quantidade satisfatória da segunda fita de cDNA, podendo perceber a formação dos dois rastros fortes que representa a formação da segunda fita.

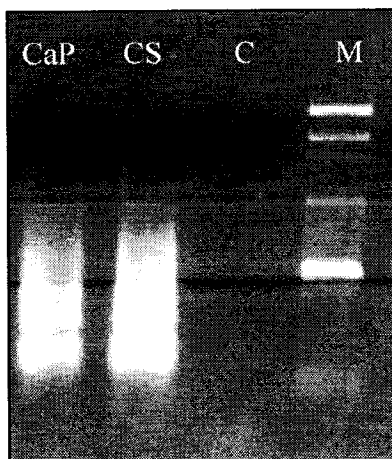


Figura 6: Análise da síntese da segunda fita de cDNA. CaP- câncer de próstata, CS- controle saudável, C- controle negativo da reação, M- marcador de 100 pb (Invitrogen).

A Figura 7 mostra o resultado da purificação do produto de PCR do câncer de próstata pelo kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega). A purificação do produto foi necessária para eliminar excessos de reagentes utilizados na PCR que poderiam inibir a reação de digestão do cDNA com a enzima XhoI.

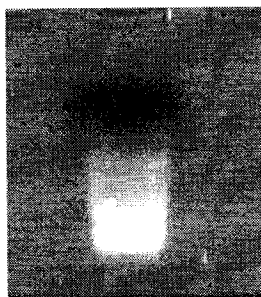


Figura 7: Análise da eficiência da purificação de produto de PCR em gel de agarose 1,5%. PCR da população câncer de próstata.

3.2 Preparação do plasmídeo

Segundo De-Souza (2003), o padrão eletroforético (Figura 8) do plasmídeo intacto é formado por três bandas, forma I: circular supernovelada, a forma II: circular relaxada e a forma III: linear. A motilidade eletroforética das diferentes formas podem variar de acordo com o tamanho da molécula de DNA e depende de uma diversidade de fatores, tais como diâmetro dos poros do gel, voltagem e força iônica do tampão de corrida.

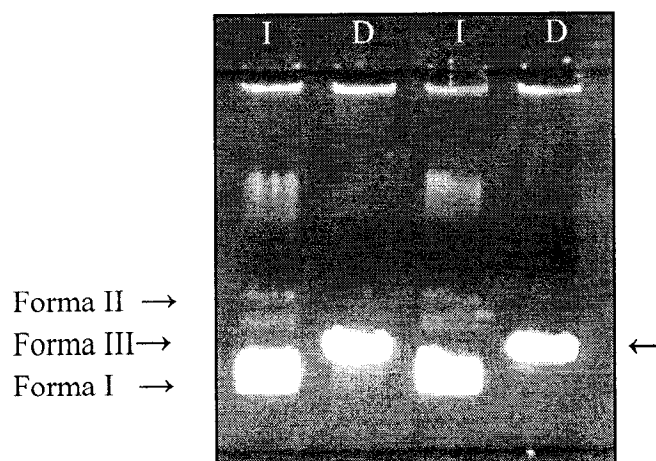


Figura 8: Análise de DNA plasmidial. Gel de agarose 0,8%, comparando o DNA do plasmídeo pBluescript SK+ intacto (I) e o digerido(D) pela enzima de XhoI.

Após a digestão do plasmídeo, este foi ligado com o produto da hibridação pela ação da enzima T4 DNA ligase. Em seguida, essa ligação foi clonada em *Escherilia coli* por eletroporação e, posteriormente, plaqueado em meio LB contendo IPTG e XGAL.

Para a realização do sequenciamento foi necessária a seleção das colônias brancas, as quais possuem os insertos clonados. Após isso, foi realizada a extração do DNA plasmidial (mini-prep) dessas colônias. A Figura 9 apresenta um gel de eletroforese onde a extração foi satisfatória.

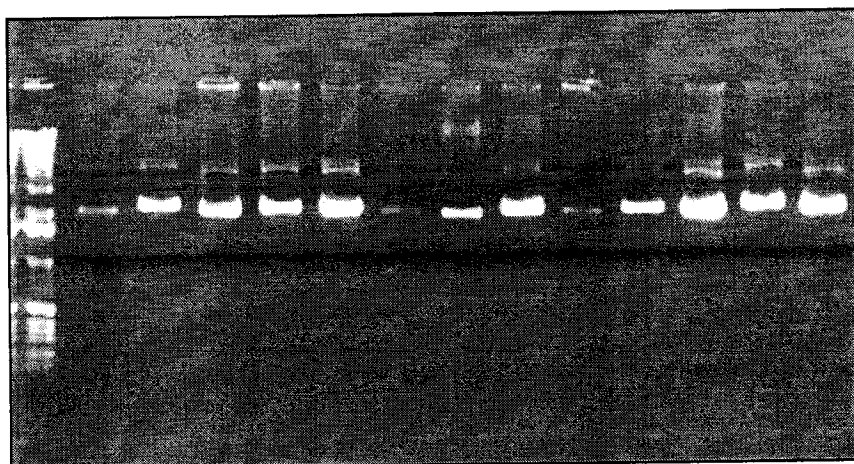


Figura 9: Análise da qualidade de DNA plasmidial em gel de agarose 1,5%, no primeiro pocinho um marcador de 1 kb (BioLabs).

Foi realizado a restrição do DNA plasmidial das colônias brancas e como esperado após a restrição foi liberado os fragmentos clonados (Figura 10). Após essa análise os clones foram seqüenciados.

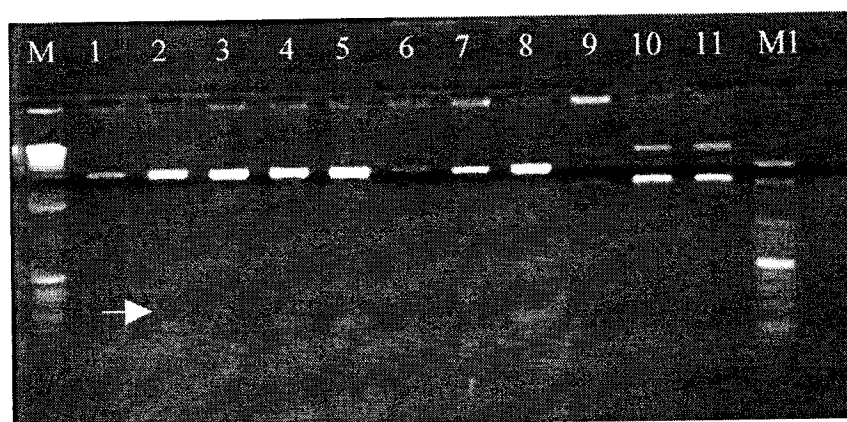


Figura 10: Análise da clonagem dos produtos de hibridação subtrativa para o CaP versus CS. M-marcador de 1 Kb (BioLabs); clones de 1 a 8 restringidos, presença do fragmento clonado; clones de 9 a 11 não restringidos, presença das três bandas do plasmídeo; M1- marcador de

3.3 Análise das seqüências

O sequenciador possui alguns programas que geram um resultado avaliativo de cada sequenciamento. Neste caso, o programa associado ao sequenciador é o PHRED que gera o Scorecard, onde é mostrada a qualidade de cada seqüência de acordo com a quantidade de

bases seqüenciadas. A cor vermelha é mostrada quando o número de bases seqüenciadas está entre 0 a 100, a cor amarela aparece quando o número está entre 101 e 400 bases, a cor verde aparece quando o número está acima de 401 bases seqüenciadas, e a cor branca mostra quando o seqüenciamento falhou (Figura 11).

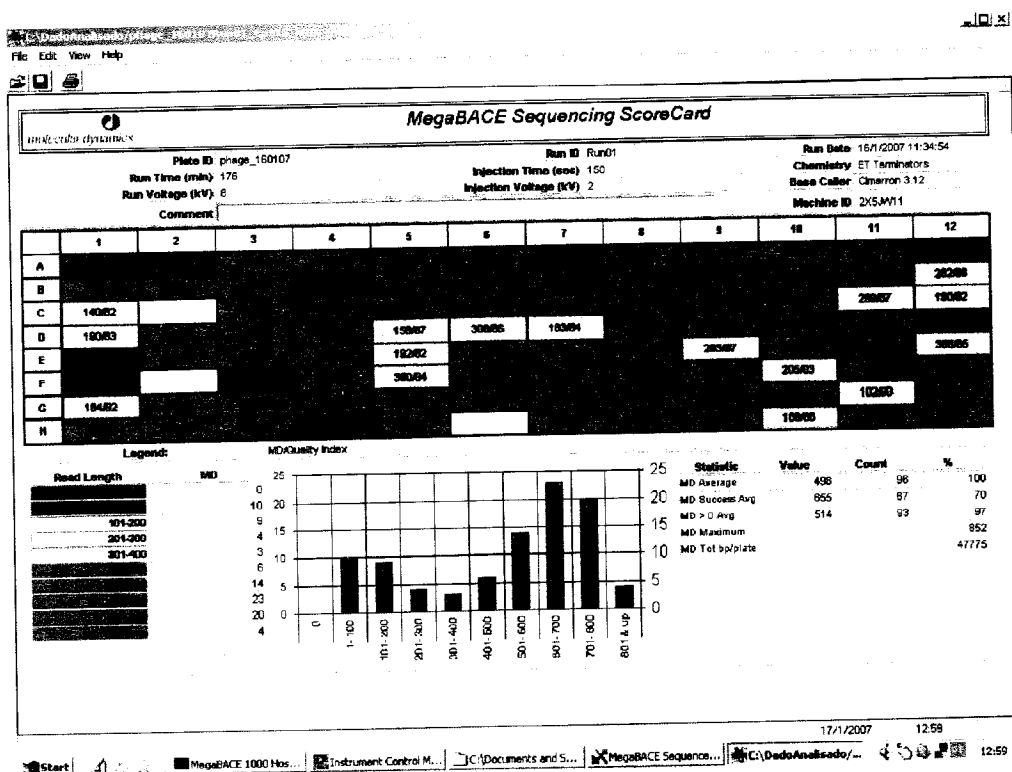


Figura 11: Scorecard das seqüências dos grupos câncer e controle saudável.

Posteriormente, as *reads* da coluna 1 a 6, derivadas do PHRED foram submetidas a um processo de filtragem feito pelo programa *Cross_match* para remoção das seqüências de vetores. Após a remoção do vetor as seqüências obtiveram um tamanho médio de 300 pb. As *reads* validadas foram submetidas a clusterização (CAP 3), ou seja, as seqüências foram agrupadas de acordo com a similaridade de suas bases. Dessa forma foram obtidos os *contigs* (grupos com mais de uma seqüência) e os *singlets* (grupos com uma única seqüência).

Foram obtidas 64 seqüências de alta qualidade, sendo 25 do grupo câncer de próstata e 39 do grupo controle saudável. Dessas 64 seqüências obtidas, 10 foram caracterizadas em *contigs* e 53 *singlets*. Sendo que, todos os *contigs* foram referentes ao grupo controle saudável e deram similaridade com RNA mitocondrial.

As seqüências de cDNA foram traduzidas para análise das proteínas com o programa PTC (Protein Classification Tool). Para os grupos controle saudável e câncer, representado na

tabela 1, foram obtidos elevado número de seqüências não similares, maior número de citocromo c e beta hemoglobina no grupo saudável, e em relação aos valores da catalase houve pouca diferença entre os grupos.

Tabela 1: Biblioteca de subtração obtida entre o grupo de CaP versus controle saudável, isolados por RaSH

Grupo	Catalase	Citocromo c	Beta Hemoglobina	Não encontrado	Total
Câncer de próstata	7	4	0	14	25
Controle saudável	9	14	1	15	38

O citocromo c é uma proteína componente da cadeia de transporte de elétrons da membrana interna da mitocôndria. Segundo Chauffaille (2005), o citocromo c tem papel importante na indução de morte celular, pois ativa uma rede complexa de moléculas que regulam a apoptose, em destaque as caspases (enzimas proteolíticas). A apoptose é a contraposição à mitose para a regulação da homeostase e, conseqüentemente, o crescimento de um tecido, seja ele normal ou maligno, é resultante do equilíbrio entre a taxa de proliferação e de destruição celulares, portanto um balanço delicado entre reguladores de vias pró e antiapoptóticas que controlam o processo mantendo a homeostase. Há a promoção do processo de carcinogênese quando este equilíbrio é alterado em favor do prolongamento de sobrevivência celular, situação que ocorre após uma série de alterações moleculares para que a célula adquira o fenótipo maligno.

Devido a maior expressão do citocromo c (ativador da apoptose) no grupo saudável pode-se supor que esta proteína esteja relacionada com inibição da formação do tumor. Contudo, é necessária a análise de maior número de clones para se obter uma conclusão mais precisa. Foi obtida também grande porcentagem da enzima Catalase, que é uma oxidoredutase intracelular presente na organela peroxissoma. É responsável pela detoxificação do peróxido de hidrogênio que está associado com patologias ligadas ao estresse oxidativo, como o câncer, doenças cardiovasculares e grande parte das doenças degenerativas (OLIVEIRA, 2007). Mas

não se pode afirmar a relação da catalase com o câncer devido ao baixo número de seqüências obtidas.

Outra proteína encontrada foi a beta hemoglobina no grupo saudável. Foi descrito por ONDA (2005), que existe a expressão diminuída do gene beta hemoglobina (HBB) em carcinoma de tireóide, e a perda do heterozigose (LOH) desse gene foi relatada em vários tipos de cânceres, foi sugerida a possibilidade de HBB como um gene supressor de tumor. A seqüência traduzida em beta hemoglobina foi também analisada no BlastN (nucleotídeos) e foram encontrados valores que confirmam a similaridade do transcrito com a beta hemoglobulina (Tabela 2). Mas, para confirmar a hipótese da diferença de expressão entre as duas populações é necessário fazer o experimento de Northern blot.

Tabela 2: Análise de um transcrito isolado por RaSH e analisado no BlastN

Descrição	Acesso	Score	E-value	Max ident
<i>Homo sapiens</i>				
hemoglobin,beta (HBB), mRNA	NM_000518.4	658	0	99%

Na análise das seqüências no BlastN foram consideradas apenas as similaridades com um *E-value* baixo, abaixo de 35, para tentar garantir a correta identidade da seqüência. E quando o *E-value* tem o valor igual a 0 significa que não tem erro. Portanto, as seqüências com *E-value* inadequado foram excluídas da análise. Os clones CaP e CS foram nomeados para facilitar a identificação como, por exemplo CaP 1, CaP 2.

No estudo do grupo câncer de próstata foi obtido alguns resultados (Tabela 3), tais como: o clone CaP 1 foi encontrado por Sugano (2004, não publicado), em biblioteca de câncer de próstata. Já os clones CaP 2, 5 e 8 foram similares a uma seqüência encontrada em biblioteca subtrativa de câncer de estômago, podendo indicar que esse gene possa estar relacionado também com o câncer de próstata. O clone 15 foi similar a um EST encontrado por HUANG (1999), em análise comparativa de biblioteca de cDNA de tecido prostático tumoral e tecido normal, as EST (*Expressed Sequence Tags*) de cada biblioteca foram comparadas utilizando um programa especial, o *Oracle*. Neste trabalho não foi feita uma hibridação subtrativa de cDNA, e sim uma comparação de ESTs das duas bibliotecas diferentes feitas separadamente.

Tabela 3: Análise dos clones CaP isolados por RaSH e analisados no BlastN

Clones	Acesso	Score	E-value	Max ident	Proteína	Função
CaP 1	BP326233	385	1e-52	98%	Tetraspanina 4	Estrutural
CaP 2, 5, 8	CN654980	155, 270, 232	6e-36, 3e-70, 6e-59	96%, 100%, 98%	Citocromo c	Oxidoredutase
CaP 15	AI557220	266	4e-69	98%		

Em relação ao grupo controle saudável, na análise no BlastN foram obtidos similaridade com diversos clones que não tinham relação com o câncer. Para melhor julgamento do papel desses transcritos, é necessária uma análise de bioinformática mais detalhada, que forneça a função das ESTs, para a compreensão do papel da baixa expressão ou ausência desses transcritos em relação ao câncer.

4. CONCLUSÃO

O novo procedimento do RaSH foi eficaz para isolar clones diferencialmente expressos, mas é necessário obter um número maior de clones para se alcançar uma conclusão mais precisa dos dados. É preciso também para confirmar a expressão diferencial dos cDNAs nos grupos câncer de próstata e controle negativo fazer um Northern blot.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Analisa, via Phred, resultados do Megabase. Disponível em: <http://www.biomol.unb.br>. Acesso em: 15 jan. 2007.

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

BRASIL. Ministério da saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. 3 ed. INCA. Rio de Janeiro RJ, 1999, 304p.

CHAN, G.T.G; STAMPFER, M. J; STEENBEEK, M.; SCHIPPERS, E.; BLOK, L.J. A novel gene on human chromosome 2p24 is differentially expressed between androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. **European journal of cancer**, n. 37, p.2129-2134, 2001.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. The proposal of apoptosis in chronic myeloid leukemia: promising studies. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São José do Rio Preto. v.27, n.2, jun. 2005.

CHAMBERLAIN, J.; MELIA, J.; MOSS, S.; BROWN, J. **The diagnostics, management, treatment and cost of cancer in England and Wales**. London: Sutton Cancer screening evaluation Unit, Institute of cancer research, 1996.

COFFEY, D.S. The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; STAMEY, T. A.; VAUGHAN, E. D. **Campbell's Urology**. 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**, v. 71, p. 880-886, 1993.

DECKMANN, A. C. **Busca por genes diferencialmente expressos em resposta à indução de hipertrofia ventricular em rato (*Rattus norvegicus*) através da técnica de microarranjos de DNA**. 2004. 115 f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

GOSLING, J. A., HARRIS, P. F., HUMPHERSON, J. R., WHITMORE, I., WILIAN, P. L. T. **Pelve e Períneo**. In: Anatomia Humana, 5. ed. São Paulo, SP: Manole. p.16-17, 1992.

GRIFFITS, K.; MORTON, M. S. Aspects of the cell biology of prostate cancer. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITS, K. **Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnostic and Treatment**. London, Martin Dunitz Ltda, p.16-33, 1999.

HUANG, G.M.; NG, W-P.; FARKAS, J.; HE, L.; LIANG, H.A.; GORDON, D.; YU, J.; HOOD, L.H. Prostate Cancer Expression Profiling by cDNA Sequencing Analysis. **Genomics**. n.59, p.178-186. 1999.

Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de próstata**. Disponível em : <<http://www.inca.org.br/cancer/tipos/prostata>>. Acesso em: 11 jan. 2007.

JIANG, H.; KANG, D.C.; ALEXANDRE, D.; FISHER, P. RaSH: a rapid subtraction hybridization approach for identifying an cloning differentially expressed genes. **PNAS**. v. 97, n. 23, p.12684-12689, set. 2000.

KUVBACHIEVA, A. A.; GOFFINET, A. M. **A modification of representational difference analysis, with application to the cloning of a candidate in the reelin signaling pathway**. **BMC Molecular Biology**. n.3, p.1-5, abri. 2002.

LAPIDES, J. **Urologia**. Rio de Janeiro, RJ: Intramericana Ltda, p. 376, 1979.

MEARES JUNIOR, E. M. J. Prostatitis and related disorders. In: WALSH, P. C., RETIK, A.B., STAMEY, T. A., VAUGHAN, E. D. **Campbells Urology**. v.1. 6ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, p.807-822, 1992.

ONDA, M ; AKAISHI, J; ASAKA, S; OKAMOTO, J; MIYAMOTO, S; MIZUTANI, K; YOSHIDA, A; ITO, K; EMI, M. Decreased expression of haemoglobin beta (HBB) gene in anaplastic thyroid cancer and recovery of its expression inhibits cell growth. **British Journal of Cancer**, n.92, 2005. p.2216-2224.

OLIVEIRA, D.V.N.P. **Extresse oxidativo e doenças relacionadas**. Apostila curso de verão de genética, p. 41, 2007.

POSTE, G.; FILDR, J. J. The pathogenesis of cancer metatasis. **Nature**. n. 283, p.139-146, 1980.

PTC- Protein Classification Tool. Disponível em:< <http://biodados.icb.ufmg.br>>. Acesso em: 17 jan. 2007.

ROHR, H.P.; BARTSCH, G. Human benign prostatic hyperplasia: a stromal disease? New perspectives by quantitative morphology. **Urology**. v.16, p. 625-633, 1980.

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

SELLY, S.; DONOVAN, J.; FAULKNER, A.; COAST, J.; GILLAT, D. **Diagnosis, management and screening of early localized prostate cancer: a systematic review**. Bristol: Health Care Evaluation Unit, University of Bristol, 1996.

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

SROUGI, M.C. Hiperplasia Benigna da Próstata. In: SCHOR, N., SROUGI, M. **Nefrologia, Urologia, Clínica**. São Paulo, SP: Sarvier, cap. 6. p.501-506, 1998.

VEDOY CG, BENGTON MH, SOGAYAR MC. Hunting for differentially expressed genes. **Braz J Med Biol Res** .n.32, p.877-884, 1999.

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

ANEXO 1



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 tecido normais e tumores 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 concordam 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

1.



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, estudo de polimorfismos, polimorfismos de comprimento de fragmentos de DNA e estudos de proteínas específicas		
Coordenador	Dr. Jay Ricardo Goulart Galvão		
Relator	Prof. Dr. Miguel Tannus Jorge		
Área do Conhecimento	Ciências Biológicas - Genética		
Código	2.02		
Projeto	☒ Local		
Área Temática	☐ Multicêntrico: ☐ Nacional ☐ Internacional		
	☒ Grupo I ☐ Grupo II ☐ Grupo III		
	☐ Prevenção ☒ Epidemiológico ☐ Diagnóstico ☐ Não se aplica ☐ Terapêutico		
Objetivo(s)	Criar um banco de dados de genes relacionados ao câncer de próstata. Descrever um "glacoronay" contendo os principais biomarcadores, específicos do câncer de próstata, e...		
Metodologia			

ANEXO 3

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;
- } Mesmo dia
- 4- Deixar no máximo 2,5mL no tubo. Caso o volume esteja à 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 vórtex para diluir o *pellet* de células e mergulhar no gelo;
 - 12- Adicionar 100µL de acetato de sódio 2M pH= 4;
 - 13- Adicionar 1,0 mL 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 1,0 mL 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 e ressuspender o pellet em 25µL de água.

ANEXO 4

PRECIPITAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

- 1- Adicionar 2 μ L de acetato de amônio (7,5M) para cada 8 μ L de produto
- 2- Coletar em tubo novo, acrescentar 30 μ L de etanol absoluto (ou Isopropanol) gelado, para cada 10 μ L de produto com acetato. Cuidadosamente homogeneizar como no vortex;
- 3- Incubar overnight -20° C;
- 4- Centrifugar 13.000 rpm por 15 minutos, -4° C;
- 5- Remover o sobrenadante e adicionar 250 μ L de etanol 70% (175 μ L etanol + 75 μ L água);
- 6- Centrifugar 13.000rpm por 7 minutos, -4°C. Descartar o sobrenadante e secar por 15 minutos;
- 7- Ressuspender em água ou TE (20 μ L). Se o pellet for pequeno ressuspendê-lo em 15 μ L de água;
- 8- Incubar 15 minutos no banho-maria a 37°C;
- 9- Aplicar 3 μ L de produto em gel de agarose 1,5%.

ANEXO 5

PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES

- 1- Inocular uma colônia isolada de *E. coli* em 10mL de meio SB. Cultivar as células durante a noite sob agitação de 250 rpm a 37°C;
- 2- Diluir 0,5mL dessa cultura em 500mL de meio SB, contendo 2,5mL da solução estoque de glicose 2M e 2,5mL de solução estoque de Mg 2M em um frasco de 1L. Incubar por duas a três horas sob forte agitação (250rpm) a 37°C até uma densidade óptica a 600nm de 0,7 a 0,9;
- 3- (Depois de atingir essa OD, resfriar o frasco com gelo. A amostra deverá ser mantida a 0°C, bem como se deve ter cuidado de resfriar as soluções, as pipetas, as ponteiros e as demais vidrarias e os recipientes utilizados);
- 4- Coletar as células por centrifugação a 3.000x g por vinte minutos a 4°C;
- 5- Ressuspender as células em 25mL de glicerol 10% (vol/vol) gelado, usando pipetas pré-resfriadas. A seguir, adicionar 75mL de glicerol 10% (vol/vol) e centrifugar a 3.000x g por vinte minutos a 4°C. Descartar o sobrenadante e repetir esse procedimento mais uma vez;
- 6- Ressuspender as células em 25mL de glicerol 10% (vol/vol) gelado, usando pipetas pré-resfriadas. Transferir a amostra para tubos de centrífuga de 50mL e centrifugar a 3.000x g por vinte minutos a 4°C. Descartar o sobrenadante;
- 7- Ressuspender as células para uma densidade óptica a 600nm de 200 a 250 (aproximadamente 1 a 2mL);
- 8- Neste ponto, as células são consideradas competentes e podem ser utilizadas as imediatamente, ou alíquotas de 150 µL.

ANEXO 6

EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (MINI-PREP)

- 1- Fazer estoque em glicerol. Em placa de estoque colocar 100 μ L de glicerol 50 % e 100 μ L da cultura crescida 22 horas. Estocar em freezer -70°C ;
- 2- Centrifugar a placa "*deep well*" onde está a cultura pó 6 min, 3700 rpm, 20°C ;
- 3- Descartar o sobrenadante, deixar a placa invertida em papel absorvente por 5 min;
- 4- Ligar a estufa a 90°C ;
- 5- Adicionar a cada poço 240 μ L de GET gelado, selar a placa com adesivo e vortexar por 2 in, para ressuspender bem as células;
- 6- Centrifugar 9 min, 3700 rpm;
- 7- Retirar o adesivo e descartar o sobrenadante. Deixar a placa invertida em papel absorvente por 5 min;
- 8- Adicionar a cada poço 80 μ L de GET, selar a placa com adesivo e vortexar por 2 min, até ressuspender bem as células;
- 9- Adicionar 2 μ L de RNase (10mg/ml) a cada poço de uma microplaca de fundo U, identificar a placa.
- 10- Transferir 80 μ L da suspensão de células para a microplaca já contendo RNase;
- 11- Adicionar a cada poço 80 μ L de solução NaOH 0,2N/ SDS 1% (preparar na hora do uso 20 mL para 2 placas, essa solução não pode ser estocada). 1mL NaOH 4M +2mL de SDS 10% + água MilliQ autoclavada 20 mL. OBS: Não pode ser adicionada uma solução de NaOH após SDS, use água como intermediário;

- 12- Adicionar a cada poço 80µL de KOAc 3M (acetato de potássio-estocado a 4°C). Selar a placa com adesivo e misturar cuidadosamente 30 vezes por inversão.
- 13- Incubar por 10 min em T.A., pulsar até chegar 3700 rpm.
- 14- Remover o adesivo e incubar a placa aberta em estufa a 90°C por 15 min.;
- 15- Selar a placa e resfriar em gelo picado por 10 min. Centrifugar por 9 min, 3700rpm, 20°C;
- 16- Fixar com fita adesiva uma placa Millipore filtro no topo de uma placa de fundo em V, verificando se elas estão alinhadas e firmes;
- 17- Transferir todo o sobrenadante, SEM debri celular, para a placa d Millipore e centrifugar por 6 min, 3700rpm, 20°C;
- 18- Remover e descartar a placa Millipore. Adicionar 100µL de Isopropanol ao filtrado que está na microplaca de fundo V.
- 19- Selar bem a placa com adesivo NOVO e misturar cuidadosamente 30 vezes por inversão;
- 20- Centrifugar por 45 min, 3700 rpm, 20°C;
- 21- Retirar o adesivo e descartar o sobrenadante (invertendo a placa);
- 22- Adicionar 200µL de Etanol 70 % (gelado), dispensar o etanol bem cuidadosamente para não ressuspender o *pellet*;
- 23- Centrifugar por 10 min, 3700 rpm, 20°C. Descartar o sobrenadante;
- 24- Inverter a placa sobre um papel absorvente e pulsar 900 rpm, 20°C;
- 25- Deixar a placa secar em T.A. por 30 min, coberta com papel toalha;
- 26- Ressuspender o DNA com 20 a 30 µL de água MilliQ (o volume depende do pellet de células na etapa inicial da mini-pep), cobrir com adesivo, anotar dados da placa no adesivo e deixar a T.A.overnight;
- 27- Guardar a placa no freezer -20°C.

