UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Quantificação Relativa dos níveis transcricionais dos genes LSP1 e *RNASEL em tecido prostático e sangue periférico de pacientes com Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna*

Washington João de Carvalho

Uberlândia – MG
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

WASHINGTON JOÃO DE CARVALHO

Quantificação Relativa dos níveis transcricionais dos genes LSP1 e *RNASEL em tecido prostático e sangue periférico de pacientes com Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde (Área Genética Molecular)

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Uberlândia – MG
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C331q Carvalho, Washington João de, 1983-
Quantificação relativa dos níveis transcricionais dos genes LSP1 e RNASEL em tecido prostático e sangue periférico de pacientes com câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna / Washington João de Carvalho.. - 2009.
65 f. : il.

Orientador:.Luiz Ricardo Goulart.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Próstata - Câncer - Teses. 2. Genética molecular - Teses. 3. Próstata - Hipertropia - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 616.65-006.6

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Quantificação Relativa dos níveis transcricionais dos genes LSP1 e *RNASEL em tecido prostático e sangue periférico de pacientes com Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna*

Washington João de Carvalho

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart

Examinadores Titulares: Dra. Adriana Freitas Neves (UFG)

Dr. Omar Pacheco Simão (UFU)

Dr. Rodrigo Aparecido Fernandes Redondo (UFU)

Data da Defesa: 27/07/2009

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGCS para o formato da dissertação foram contempladas.

_____

Dr. Luiz Ricardo Goulart

Uberlândia, 27/07/2009

Dedico este trabalho,

aos meus pais, Iolanda e Valter, pela educação, amor, carinho, confiança, e por todo apoio dedicados à mim, o que me tornou a pessoa que hoje sou.

Dedico também ao meu irmão Warley, exemplo de homem, e à minha sobrinha Clarice que veio ao mundo como o sol a iluminar nossas vidas!!!

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a DEUS pelo dom da vida, pelo cuidado comigo, por sempre me ajudar nos momentos difíceis, pelos milagres concedidos à mim, por sempre estar olhando por mim e minha família!

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, por esse exemplo de otimismo, confiança e incentivo, e por disponibilizar seu tempo e seu laboratório para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Nanobiotecnologia, Paty (Neusa), Ana Paula (Arósio), Fausto, Carol, Angela, Prof. Carlos Ueira pelos momentos de discussão, troca de conhecimento, ajuda em momentos difíceis, pelos desabafos, pelos momentos de brincadeiras e descontração, e pela amizade.

Também agradeço o apoio da paulinha (Paula Cristina), Fabs (Fabiana), Rone, Paula Souza, Carol Siquierolli, Flavinha, Karina, Thaíse, Carlos Prudêncio e a Tamiris (Norminha).

À minha família, tia Lourdes, tio Péricles, tio João, tia Lusdalva, tia izalé, tia Meire e todos os meus primos e primas, em especial tia Carmem, tia Silda e tio Ari, primos Madalena e Ronaldo, pelo apoio incondicional, pela confiança e carinho depositados em mim!!!

RESUMO

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de descobrir novos biomarcadores capazes de diferenciar o câncer de próstata da hiperplasia benigna, com objetivo de auxiliar ou mesmo suplantar os métodos de triagem diagnóstica atual, níveis de PSA total sérico e o exame de toque retal, principalmente por suas deficiências.

Este estudo teve como objetivo avaliar, por PCR em tempo real, o potencial dos genes *LSP1 (Leukocyte Specific Protein 1)* e *RNASEL (Ribonuclease L 2',5' – oligoisoadenilato – sintetase dependente)* como biomarcadores para o câncer de próstata em amostras de tecido e sangue periférico de pacientes com CaP, HPB e de sangue de voluntários saudáveis (grupo controle); e verificar sua eficiência como possível método complementar de diagnóstico para essa doença.

A partir de uma triagem de 630 homens, foram selecionados 170 indivíduos com mais de 45 anos e com exame de toque retal suspeito e/ou PSA > 2,5 ng/mL, sendo indicados à biópsia prostática. Dentre estes, 60 pacientes foram diagnosticados com câncer de próstata (CaP) e 30 com hiperplasia prostática benigna (HPB). Adicionalmente, um grupo de 60 homens voluntários saudáveis com idade média de 22 anos foi utilizado como grupo controle. O RNA total dessas amostras foi extraído e convertido em cDNA e os níveis transcricionais de ambos os biomarcadores foram obtidos por quantificação relativa na PCR em tempo real. O *cutoff* de todas as análises foi estabelecido a partir da curva ROC.

Não houve diferença estatística nos níveis de expressão em tecido prostático, contudo, os níveis relativos dos genes *LSP1* e *RNASEL* no sangue periférico, analisados individualmente para um *cutoff* de 1.79 e 1.25, apresentaram, respectivamente, chances 3,5 vezes maiores para a ocorrência de HPB quando comparado ao CaP e 3,2 para a ocorrência do CaP em comparação à HPB. O uso combinado destes marcadores apresentou chances 4,5 vezes maiores para a ocorrência do CaP quando comparado à HPB; com 80% de sensibilidade, 96% de especificidade e 91% de acurácia, utilizando os mesmos valores de *cutoff*.

Este é o primeiro relato da aplicação destes dois genes no diagnóstico do câncer de próstata, e também a primeira vez que se usa dois genes com aplicações contrastantes, sendo que o *LSP1* detecta principalmente o HPB e o *RNASEL* detecta o câncer, e juntos têm a capacidade de discriminar os casos de câncer de próstata com 91% de precisão. Esses fatos demonstram seu potencial de aplicabilidade na prática clínica, com redução das biópsias negativas e sem causar desconforto aos pacientes.

ABSTRACT

Several studies have been conducted in an attempt to discover novel biomarkers that are able to distinguish prostate cancer (PCa) from benign prostatic hyperplasia (BPH) with the purpose of helping or even supplant the current diagnostic methods, the total serum PSA levels and the digital rectal examination (DRE), mainly due to their deficiencies.

Our study aimed to evaluate, by real time PCR, the potential use of the *LSP1 (Leukocyte Specific Protein 1)* e *RNASEL (Ribonuclease L 2',5' – oligoisoadenilato – sintetase dependent)* genes as biomarkers of prostate cancer in tissue samples of patients with PCa and BPH, and also in the peripheral blood of patients and healthy volunteers (control group); and verify their efficiency as a possible diagnostic method for this disease.

A prior screening of 630 men, 170 men over 45 years old were included in the sampling because of suspicious DRE and/or PSA>2.5 ng/mL, with indication of prostatic biopsy, which 60 were PCa and 30 BPH patients. A group of 60 healthy volunteers men with a mean age of 22 years was used as control. Total RNA from these samples were converted into cDNA and transcriptional levels of biomarkers were measured by relative quantification in real-time PCR. The cutoff value was established for all tests from a ROC curve estimation.

There was no statistical difference in the levels of expression in the prostate tissues between PCa and BPH groups. However, in the peripheral blood, higher *LSP1* levels presented a 3.5-fold higher odds to occur in BPH than in PCa. Similarly, higher levels of *RNASEL* presented a 3.2-fold more likely to occur in PCa samples than in BPH ones. Considering the cut-off values for both genes, the duplex analysis (*LSP1* negative and *RNASEL* positive; 1.79 and 1.25, respectively) generated an odds ratio of 4.5-fold for PCa diagnostics, with 80% sensitivity, 96% specificity, and 91% accuracy.

This is the first report on the application of the *LSP1* and *RNASEL* genes in prostate cancer diagnostics, and also the first to use contrasting differential responses of the two genes, where the *LSP1* detects mainly the BPH status and the *RNASEL* detects the cancer, which together are able to discriminate the prostate cancer cases with 91% precision. These factors showed the ability for applicability in clinical practice of these biomarkers, reducing the negative biopsy and without causing discomfort to patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da amplificação pela PCR em tempo real com detecção pelo fluoróforo *SYBRGreen* (BUSTIN, 2000).....16

Figura 2: Foto representativa da análise da qualidade do RNA total extraído de amostras de sangue periférico e tecido prostático por eletroforese em gel de agarose 1,5%.....37

Figura 3: Foto representativa do produto amplificado de 534 pb (indicado pela seta) do gene *B2M* por PCR convencional em amostras de sangue. Detecção por eletroforese em gel de agarose 1,5%, onde M – Marcador de peso molecular de 100 pb; 1 a 5 cDNA de amostras CaP; 6 a 8 cDNA de amostras HPB; 9 e 10 cDNA de amostras voluntários saudáveis.....37

Figura 4: Resultado da PCR multiplex em amostras de sangue periférico detectado por eletroforese em gel de agarose 1,5%. As setas indicam os fragmentos de 534 pb e 271 pb para os genes *B2M* e *RNASEL*, respectivamente. 1 - 11 amostras de indivíduos saudáveis, 12 - 21 amostras de pacientes com câncer de próstata e de 22 - 27 amostras de hiperplasia prostática benigna; M: marcador de peso molecular 100 pb; Br: controle da reação sem cDNA.....38

Figura 5: Box Plot das medianas e quartis para os níveis relativos de expressão, por PCR semi-quantitativa, do gene *RNASEL* em amostras de sangue periférico de pacientes com Câncer de Próstata (Pca), Hiperplasia Prostática Benigna (BPH) e voluntários saudáveis.....39

Figura 6: Eficiência das reações de PCR em tempo real obtida após diluição seriada de um pool de cDNA (tecido) e uma amostra de cDNA (sangue). A e C – curvas geradas para os ensaios em sangue e tecido, respectivamente, para o gene *RNASEL*; B e D – curvas geradas para os ensaios em sangue e tecido, respectivamente, para o gene *LSP1*. Sendo que o valor de "*a"* na equação da reta (em destaque) está entre -0.1 e + 0.1 (Applied Biosystems).....40

Figura 7: Curvas de dissociação e de amplificação por PCR em tempo real para os genes *LSP 1*(A), *RNASEL* (B)e *B2M* (C). Controle da reação, indicado pela seta, não mostrou picos de amplificação.....41

Figura 8: Expressão relativa dos genes *LSP1* (A) e *RNASEL* (B) em amostras de sangue periférico de pacientes com CaP, HPB e voluntários saudáveis.....42

Figura 9: Curva ROC determinada por regressão logística univariada dos *scores* de cada biomarcador em sangue periférico. A – *RNASEL* (*cutoff* 1.25); B – *LSP1* (*cutoff* 1.79). Os valores AUC estão dispostos dentro da figura.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos pacientes conforme as características clínico-histopatológicas.....30

Tabela 2. Parâmetros diagnósticos para os testes realizados com base nos *scores* dos genes *LSP1* e *RNASEL*.....45

Tabela 3. Associação entre a expressão e os dados clínico-histopatológicos com base nos *scores* dos biomarcadores pelo teste Exato de Fisher.....46

Tabela 4. Seqüência dos primers (Apêndice A).....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIP - atrofia inflamatória da próstata

Amplicon – produto amplificado da reação de PCR

B2M - *ß-2-microglobulina*

CaP – câncer de próstata

Cutoff – ponte de corte

cDNA - DNA complementar

C_T – *cycle threshold*

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTPs - desoxirribonucleotídeos

DTH **–** dihidrotestosterona

HPB – hiperplasia prostática benigna

kDa – Kilodaltons

LSP1 – *Leukocyte-Specific Protein 1*

mM – milimolar

ng- nanogramas

NIP - neoplasia intraepitelial prostática

PCR – reação em cadeia da polimerase

Primers – oligonucleotídeos iniciadores

PSA - antígeno prostático específico

qPCR – PCR em tempo real

RQ-PCR – *Relative quantification PCR*

RNASEL/HPC1 (*Ribonuclease L 2',5' – Oligoisoadenylate synthetase-dependent*)

RNA – ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

RT- transcriptase reversa

RT-PCR – reação de transcrição reversa

Taq – DNA polimerase termus aquaticus

TNM – T-tumor, N-linfonodos, M-metástase

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

μL - microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 12

1.1 Principais características da Hiperplasia Prostática Benigna e do Câncer de Próstata 12

1.2 – PCR em tempo real 15

2 REFERENCIAL TEÓRICO 19

2.1 Biomarcadores para o Câncer de Próstata 19

2.2 Antígeno Prostático Específico (PSA) 21

2.3 – Os Biomarcadores *LSP1* e *RNASEL* (*HPC1*) 23

3 OBJETIVOS 27

4 MATERIAL E MÉTODOS 28

4.1 Obtenção das amostras 28

4.2 Extração RNA total de Sangue Periférico e Tecido Prostático 30

4.3 RT-PCR (Transcrição Reversa) 31

3.4 PCR Multiplex Semiquantitativa para o gene *RNASEL* 32

3.5 Construção da Curva Padrão Relativa 34

3.6 PCR em Tempo Real 35

3.7 Análise Estatística 36

4 RESULTADOS 37

4.1 Ensaios por PCR em tempo real 40

5 DISCUSSÃO 47

6 CONCLUSÃO 52

7 REFERÊNCIAS BIOBLIOGRÁFICAS 53

APÊNDICES 60

Apêndice A 60

ANEXOS 61

Anexo I 61

Termo de Consentimento 61

ANEXO II 62

PROTOCOLO EXTRAÇÃO DE RNA SANGUE 62

ANEXO III 64

PROTOCOLO EXTRAÇÃO DE RNA TECIDO 64

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Principais características da Hiperplasia Prostática Benigna e do Câncer de Próstata

Algumas das patologias mais comuns, como as prostatites, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata, acometem, principalmente, homens acima dos 50 anos de idade (SROUGI; CURY, 1998).

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é caracterizada por um aumento notório do componente acinar prostático em relação aos componentes intersticial e capsular, acarretando, por conseqüência, aumento volumétrico da próstata (SROUGI; CURY, 1998). Ocorre em quase 80% dos homens por volta dos 80 anos, sendo responsável por infecções urinárias a partir dos 50 anos de idade, mas esse aumento benigno ocorre sempre após os 35 anos de idade, sendo responsável por vários sintomas do trato urinário inferior em homens (CATALONA et al., 2002; CATALONA et al., 2004b; KRUMHOLTZ et al., 2002; STAMEY; McNEIL, 1992). A patogênese da HPB ainda não é claramente entendida, mas alguns mecanismos interativos envolvendo o estímulo pela testosterona, a dihidrotestosterona (DHT) na liberação alguns fatores de crescimento pela sinalização intracelular desencadeada por sua ligação ao receptor de andrógeno (AR) são provavelmente responsáveis pelo desenvolvimento da HPB (SROUGI; CURY, 1998; WALSH; WORTHIGTON, 1998).

O Câncer de Próstata (CaP), assim como qualquer outro câncer, é decorrente da disfunção no processo regulatório entre a proliferação e a morte celular. Essa disfunção quando associada às mutações genéticas reflete em graus anormais de respostas aos fatores de crescimento, gerando clones autônomos de células malignas que passam a não responder ao controle androgênico.

Durante os estágios iniciais do tumor, as células respondem aos mesmos fatores regulatórios (hormônio-dependentes), embora as taxas de proliferação celular sejam maiores que as de morte celular (GRIFFITHS; MORTON, 1999).

Tem sido sugerido que a Atrofia Inflamatória da Próstata (AIP) e Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP) de alto grau sejam precursores para muitos carcinomas prostáticos, por serem altamente freqüentes nas próstatas com adenocarcinoma e por apresentarem alterações moleculares genéticas em comum. A NIP também apresenta características morfológicas semelhantes, alterações genéticas e apresentação multifocal. Por essas e outras características, a NIP tem sido hipotetizada como precursora do CaP (BOSTWICK, 1996; JARMULOWICZ, 1999; KELLOFF et al., 2004).

O câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais freqüente em todas as regiões do Brasil, representando cerca de 10% do total de cânceres. É a segunda causa de morte após o câncer de pulmão e o tipo de câncer não cutâneo mais comum nos Estados Unidos (EUA) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, RJ - INCA, 2008).

As taxas de incidência do CaP são cerca de seis vezes maiores nos países desenvolvidos, se comparadas às taxas dos países em desenvolvimento. É considerado o câncer da terceira idade, uma vez que, cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos (INCA, 2008).

O número de casos novos de câncer de próstata estimados para o Brasil, no ano de 2008, foi de 49.530, sendo que esses valores correspondem a um risco estimado de 52 casos novos a cada 100 mil homens; é o mais prevalente em homens e o segundo mais incidente após o câncer de pele não melanoma. O câncer de próstata tem sido tratado como um problema de saúde pública e o aumento que vem sendo observado nas taxas de incidência é resultado, principalmente, do rastreamento feito pelo teste Antígeno Prostático Específico (PSA) (INCA, 2008; MAKAROV et al., 2009)

Embora os fatores que contribuam para o desenvolvimento do CaP não sejam completamente compreendidos, candidatos a fatores de risco incluem a idade acima de 50 anos, historia familiar, altos níveis de testosterona sérico, dieta rica em gordura, e as prostatites (KELLOFF et al., 2004), sendo que a história familiar é um dos fatores mais importantes para o risco de desenvolvimento do câncer de próstata, aumentando em aproximadamente 10-15% o risco no caso de história positiva em familiares de primeiro grau (WHITTEMORE et al., 1995). A dieta tem sido apontada em alguns estudos como fator importante na etiologia desse tipo de câncer. Uma alimentação com base em gordura animal, carne vermelha e cálcio tem sido associada ao aumento no risco de desenvolver câncer de próstata. Já uma dieta rica em vegetais, selênio, vitaminas D e E, licopeno e ômega-3 tem indicado proteção para o desenvolvimento dessa neoplasia. Alguns estudos apontam a obesidade como fator de risco para a mortalidade por câncer de próstata (INCA, 2008).

Embora o CaP e a HPB confiram risco e prognóstico bastante diferentes aos pacientes, essas patologias incidem sobre a mesma faixa etária (KRUMHOLTZ et al., 2002). A neoplasia prostática, em estágios iniciais, apresenta alterações clínicas e laboratoriais semelhantes à hiperplasia benigna (CATALONA et al., 2004b). Além disso, o fato de ambas poderem co-existir complica ainda mais o diagnóstico e leva a mais de um milhão de biópsias prostáticas desnecessárias (OUYANG et al., 2009). Esses fatos dificultam o diagnóstico diferencial dessas patologias.

Devido à característica multifocal do câncer de próstata, em situações em que HPB e CaP coexistam o PSA sérico emitido pela HPB mascara o PSA proveniente de pequenos focus de câncer. Somente o exame de toque retal não consegue discriminar entre a patologia benigna e maligna como também não consegue detectar o tumor não-palpável e consequentemente não consegue detectar a doença em seu estágio inicial, onde as chances de cura são maiores (GERBER et al., 1993). Atualmente a triagem diagnóstica do CaP é realizada em conjunto, principalmente,

pela análise dos níveis de PSA sérico total e livre (ou sua razão) e o resultado do exame de toque retal para indicação de biópsia (LANDERS et al., 2005).

Contudo, muitas biópsias negativas tem sido realizadas em virtude da baixa sensibilidade do teste PSA, sendo que o exame de toque retal possui, isoladamente, uma sensibilidade de 53% e valor preditivo positivo de 18% na detecção do câncer de próstata e que o *cutoff* para o PSA de 4.0 ng/ml pode detectar somente 62% dos casos (MISTRY; CABLE, 2003).

1.2 – PCR em tempo real

A RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) consiste em uma técnica na qual são produzidas cópias de cDNA (DNA complementar) a partir da fita simples de RNAm, amplamente utilizada nos estudos de expressão gênica. A fita de DNA complementar é formada basicamente pela ação de uma enzima (RT) *Transcriptase Reversa* e *primers* randômicos que maximiza o número de moléculas de RNAm que podem ser analisadas a partir de uma pequena amostra de RNA (BUSTIN, 2000). O cDNA é utilizado como amostra biológica para amplificação de um determinado fragmento de um gene alvo na reação de PCR.

A PCR em tempo real (qPCR) é um método extremamente sensível e reprodutível de quantificação da expressão gênica e a ferramenta mais utilizada em pesquisa básica, medicina molecular e biotecnologia. É altamente específica, pois se baseia na detecção de fluorescência emitida por sondas fluorogênicas ou corantes intercalantes, como o *SyBRGreen*. A medida em que o produto amplificado aumenta, o sinal de fluorescência também aumenta proporcionalmente. Os corantes intercalantes como este emitem fluorescência apenas quando associados ao DNA de fita dupla (dsDNA) (BUSTIN, 2000; PETERS, et al. 2004; VELDEN et al., 2003).

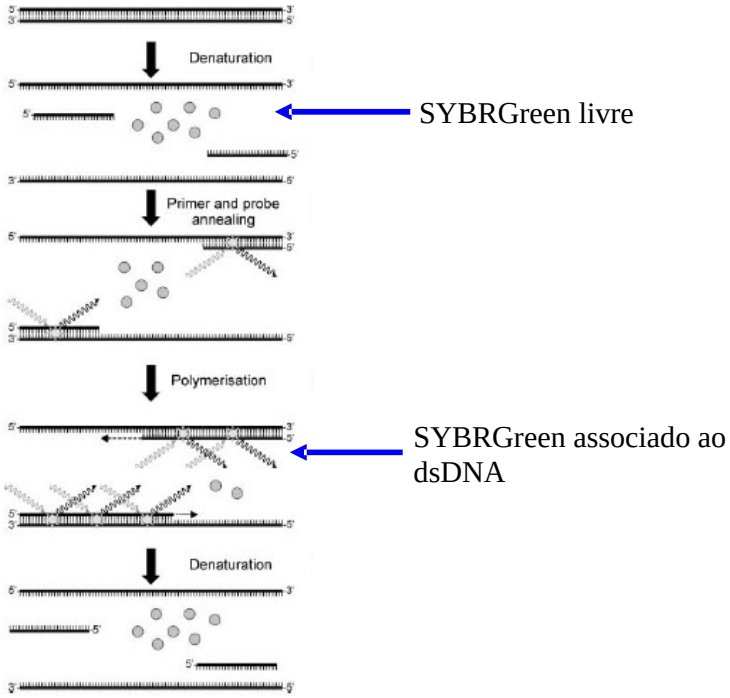

Figura 1: Representação esquemática da amplificação pela PCR em tempo real com detecção pelo fluoróforo *SYBRGreen* (BUSTIN, 2000).

A quantificação dos *amplicons* ocorre durante a fase exponencial da reação, e o limiar desta fase é determinado pelo ciclo no qual é detectada emissão de fluorescência significativa, denominado de *cycle threshold* (C_T) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

A fluorescência é detectada pelo aparelho quando o *SYBRGreen* está associado ao dsDNA. A fluorescência emitida pelas moléculas de *SYBRGreen* em suspenção no meio, quando ocorre a desnaturação, é pequena e subtraída pelo software durante a reação (BUSTIN, 2000) (figura 1). Durante a polimerização catalisada pela enzima DNA polimerase as moléculas de *SYBRGreen* se ligam ao produto recém sintetizado, e um aumento da fluorescência é observado em tempo real, o que possibilita o monitoramento contínuo da reação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004). No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do fluoróforo são liberadas e uma queda no sinal da fluorescência é observada. Apesar de o *SYBRGreen* não ser específico, podendo se ligar à dímeros de *primers*

ou outros produtos inespecíficos, é possível monitorar essas situações pela análise da curva de dissociação observando a temperatura *melting* (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

No sistema em que se utiliza de sondas, o método de detecção mais comum é a utilização de sondas marcadas com um corante reporter na extremidade 5' e um quencher na 3'. Quando a sonda está intacta o quencher capta a energia emitida pelo reporter, devido a proximidade dos dois corantes, através da transferência de energia por ressonância de fluorescência através do espaço (FRET). Quando a sonda é clivada pela atividade exonuclease 5' da DNA polimerase os fluoróforos são separados aumentando o sinal da fluorescência que é detectado pelo aparelho (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

A quantificação dos produtos da PCR é realizada, principalmente, por dois métodos, a quantificação absoluta e relativa. Pelo método da quantificação absoluta utiliza-se uma curva padrão, previamente padronizada, que deve estar presente em todas as placas de ensaio. Interpolando as quantidades da amostra alvo com base na curva padrão, o software fornece a quantidade exata de moléculas alvo contidas na amostra (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

A quantificação relativa é subdividida em dois métodos, o método da curva padrão e o método do CT comparativo. Com base no método CT comparativo deve-se, primeiramente, avaliar se as eficiências das amplificações do alvo e do controle endógeno são equivalentes. A eficiência da reação é calculada pela construção de uma curva padrão que é graficamente representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inical do ácido nucléico. Um *slope* da curva padrão próximo de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência e produzirá um aumento de 10 vezes no *amplicon* a cada 3,32 ciclos durante a fase exponecial de amplificação ($\log_2$ 10 = 3,3219) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004). Valores que diferem muito desses podem indicar má qualidade da amostra ou erro de pipetagem. Para cada curva padrão o software procura o melhor ajuste entre os pontos, calcula a regressão linear e fornece o R^2 que mede quão próximo é o ajuste

entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de C_T das amostras padrão (ideal R^2 = 0.99), o *slope* e o y-intercept que indicam o valor esperado de C_T para uma amostra com quantidade 1 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004). Para esse método é também necessário utilizar uma amostra padrão em todas as placas de ensaio, o calibrador, que deve ser uma amostra concentração conhecida. Durante a reação de qPCR, o alvo é normalizado com um gene *housekeeping* (controle endógeno) e comparado diretamente com o calibrador, contabilizando uma quantidade maior ou menor de RNAm (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

São várias as vantagens da PCR em tempo real em relação à convencional, dentre elas destacam-se, a maior sensibilidade, pois a PCR em tempo real utiliza a fluorescência para detecção do *amplicon*, maior reprodutibilidade, pois fornece a quantificação em números, enquanto a convencional utiliza gel de agarose e corantes intercalantes como o brometo de etídio altamente tumorigênicos e cálculo da densidade óptica para quantificação, o que diminui sua sensibilidade e reprodutibilidade (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

Para ambos os sistemas o desenho do experimento e a padronização da reação são essenciais para a obtenção de bons resultados (BUSTIN, 2000; LIVAK; SCHMITTEGEN, 2001).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biomarcadores para o Câncer de Próstata

Em virtude das limitações do PSA, muitos trabalhos descritos na literatura objetivam a descoberta de novos biomarcadores que possam suprir essas limitações (HUGHES et al., 2005; POEL, 2007; RHODES et al., 2002; STANGELBERGER et al., 2007), como por exemplo, a incapacidade do PSA de detectar a doença em seu estágio inicial e o fato de que baixos níveis de PSA não é garantia de que o paciente esteja livre da doença. Além disso, frequentemente, pacientes com altos níveis de PSA são submetidos à biópsia prostática, mas com resultado negativo para câncer (THOMPSON et al., 2004; THOMPSON; ANKERST, 2007).

Tão importante quanto a descoberta de novos biomarcadores específicos para o câncer de próstata, é a descoberta em fluídos corpóreos como a urina e o sangue, pois assim, o método de coleta do material em que será quantificado o biomarcador não trará nenhum desconforto ao paciente. Inúmeros são os genes e proteínas estudados, e várias são as formas como eles são estudados com o intuito de avaliar o desempenho como biomarcador para o CaP.

Aqui são citados biomarcadores frequentemente referenciados na literatura e alguns deles possuem valor prognóstico e diagnóstico promissores.

Bai e colaboradores (2007) desenvolveram um painel de 286 genes diferencialmente expressos no CaP utilizando a técnica de *Differential Display* (técnica também utilizada na descoberta do marcador *LSP1*, validado neste trabalho). Desses, 44 foram seqüenciados,

sendo que 31 não tinham sido descritos anteriormente. Alguns dos principais genes encontrados foram: *TRPM8, ADAMTS9, KB208E9, rp11-442e11, HERV-K* e *KIAA0999*.

Outro estudo tem quantificado a proteína ß-catenina como potencial biomarcador para o CaP (HUANG et al., 2007).

Liu e colaboradores (2007) avaliaram a expressão em tecido prostático por PCR em tempo real de vários genes, e correlacionou com os dados clínico-histopatológicos dos pacientes e encontrou correlação significativa nos genes *NPY, PTEN, AR, AMACR, DD3* e *GSTP1*.

Um estudo de revisão de biomarcadores revela inúmeros candidatos tais como: as isoformas do PSA (fPSA, proPSA, BPSA), hK3, hK2, marcadores epigenéticos avaliados por hipermetilação das ilhas CpGs (*GSTP1*–já descrito, *APC, DAPK, ECDH1, MGMT, ARF, RARß2, RASSF1a e TIMP3*). Este mesmo estudo ainda descreve os resultados da literatura sobre os níveis transcricionais dos genes *DD3* e *AMACR*, também já citados, além de outros como *EPCA2*, *PSMA* e *PSCA* (WRIGHT; LANGE, 2007).

Um novo gene foi descoberto por *microarray* (*GalNAC-T3*) em outro estudo que o avaliou em combinação com os genes *DD3, PSMA e Hepsin*, demonstrando sua capacidade em distinguir CaP de HPB. Além desse gene outros foram descritos em vários outros trabalhos tais como: *CaSm, PTPN3, PLA2, POV1PB39, HPC2, PCTA-1* e *VEGFA* (WRIGHT; LANGE, 2007; LANDERS et al., 2005).

A expressão de um potencial biomarcador, o gene *SRD5A2*, ainda não mencionado, foi avaliado no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU. A expressão desse gene foi quantificada por RT-PCR semi-quantitativa e foi encontrado superexpresso em HPB (NEVES et al., 2008).

2.2 Antígeno Prostático Específico (PSA)

O PSA é uma kalicreína humana de 33kD consistindo de 240 aminoácidos que é especificamente secretada por células prostáticas epiteliais, e é um componente normal da ejaculação (THOMPSON; ANKERST, 2007).

Há duas décadas o PSA tem sido amplamente usado na prática clínica como marcador para a detecção do câncer de próstata, no entanto o PSA possui várias limitações, como a baixa especificidade para distinguir CaP de outras desordens tais como HPB e prostatites (MAZZUCCHELLI et al., 2000; SCHAMHART et al., 2005). Além disso, o PSA necessita de sensibilidade para detectar o tumor em sua fase inicial, pois estudos indicam que mais de 15% dos homens com PSA sérico normal tem biópsia positiva para câncer de próstata (THOMPSON et al., 2004).

Em 1994, a *FDA (U.S. Food and drug Administration)* aprovou como *cutoff* o valor de 4.0 ng/mL para o PSA, porém, não raramente tem-se detectado casos de câncer com PSA abaixo desse nível, e muitos deles são tumores de alto grau. Apesar da alteração do *cutoff* para 2.5 ng/mL para indicação de biópsia (HIGASHIHARA et al, 1996; MAKAROV et al., 2006; MAKAROV et al., 2009; THOMPSON et al., 2004), há estudos que comprovam que este novo *cutoff* possui similar nível de detecção dos casos de câncer 4.0 ng/mL (CATALONA; SMITH; ORNSTEIN, 1997; LABRIE et al., 1992).

Os métodos de rastreamento disponíveis atualmente, como o PSA, não mostraram, até o momento, sucesso em reduzir a mortalidade, além de levarem a realização de muitas cirurgias desnecessárias, causando prejuízos tanto financeiros quanto de qualidade de vida (INCA, 2008). Ainda, cerca de 15% a 20% dos pacientes com biópsia negativa serão diagnosticados

com CaP em biópsias subseqüentes, além disso cerca de 30% dos pacientes com HPB possuem níveis de PSA alterados (CUPP; OESTERLING, 1993; STAMEY et al., 2004).

Para tentar contornar as limitações do PSA vários estudos descrevem o uso de diferentes formas moleculares do PSA e suas combinações no diagnóstico do câncer de próstata. As formas PSAD (*density*), tPSA (*total*), fPSA (*free*) foram comparadas, em sangue periférico, na detecção da doença em um *cutoff* de 4.0 a 10.0 ng/mL, mas nenhuma diferença foi encontrada (GREGORIO et al., 2007). Utilizando o mesmo *cutoff* outro estudo comparou as formas tPSA, cPSA (*complexed*), fPSA e foi encontrada diferença de expressão entre CaP e HPB somente para fPSA com uma especificidade de 41%. Quando as formas moleculares do PSA foram associadas uma diferença de expressão entre esses grupos foi encontrada para a razão fPSA/tPSA, apresentando uma sensibilidade de 95% e especificidade de apenas 35% com cutoff de 0.2; e para fPSA/cPSA, contudo, com *cutoff* de 0.32, a especificidade aumentou de 41% (forma individual fPSA) para 45% (fPSA/cPSA) somente (FILLELA et al., 2004).

Outros estudos com base na velocidade do PSA (PSAV), que mede as alterações dos níveis de PSA por ano – ng/mL/ano, também tem sido realizados, embora Carter e colaboradores (2006) demonstraram associação entre o CaP e PSAV > 0.75 ng/mL/ano, o que também é encontrado para o tPSA à 4.0-10.0 ng/mL. D'Amico e colaboradores (2004) descreveram que um PSAV>2.0 ng/mL/ano pré-operatório aumenta em 9 vezes o risco de morte por câncer depois da prostatectomia radical.

Uma outra forma molecular do PSA que tem mostrado associação com o CaP é a proPSA, que pode ser encontrada na sua forma nativa ou truncada. Em homens com PSA total 4.0 a 10.0 ng/mL também são encontrados elevados níveis de proPSA. Níveis estes consideravelmente maiores do que em controles negativos. Além disso, a proPSA parece estar associada ao CaP de alto grau (KHAN et al., 2003; CATALONA et al, 2004a).

2.3 – Os Biomarcadores *LSP1* e *RNASEL* (*HPC1*)

A relação entre o câncer de próstata e os estágios fisiológicos que possuem componentes inflamatórios, tais como AIP e HPB, ainda não está esclarecida. Contudo, há uma ampla evidência do papel da inflamação no desenvolvimento do CaP e que a aquisição de características tumorigênicas por células com HPB é acompanhada por uma diminuição do estímulo de genes sensíveis a interferon. Assim, biomarcadores baseados em genes envolvidos com a resposta imune/inflamatória e sinalização por interferon que possam fornecer um melhor entendimento dessas interações e, principalmente, que possam fornecer um diagnóstico diferencial entre CaP e HPB é de grande interesse. Com base nessas considerações e nas funções dos genes *LSP1* e *RNASEL*, motivaram o estudo desses genes nesse trabalho.

O gene *LSP1 – **L**eukocyte-**S**pecific **P**rotein **1*** codifica uma fosfoproteína citoplasmática conhecida como WP34, pp52, LSP1 (KADIYALA; McINTYRE; KRENSKY, 1990; MAY et al., 1993). Esta proteína está expressa em linfócitos, células B, neutrófilos, macrófagos, timócitos estimulados por concavalina A, granulócitos e células endoteliais (JONGSTRA et al., 1988; LIU et al., 2005; MAY et al., 1993; WONG et al., 2003). Seu tamanho encontra-se em torno de 52-54 kDa e possui dois resíduos de serina na posição 204 e 252 e uma seqüência consenso de aminoácidos na porção C-terminal que são potenciais sítios de ligação à F-actina (HUANG et al., 1997); além disso possui um domínio amino-terminal com dois sitos Ca^{2+} ligantes que funcionam como alvo para as proteínas kinase C (PKC), MAPKAP kinase 2 e ERK2 que participam de uma cascata de transdução de sinal e vias de sinalização, ativando fatores de transcrição envolvidos na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (HARRISON; SIKORSKI; JONGSTRA, 2004; KLEIN et al., 1989; WU et al., 2007). Assim,

a proteína LSP1 desempenha importante papel como mediadora nas vias de sinalização intracelular, principalmente em linfócitos, na composição do citoesqueleto, regulação da motilidade e quimiotaxia de neutrófilos, aderência da Imunoglobulina M – IgM à membrana celular, e indução de apoptose mediada por células B. (HARRISON; SIKORSKI; JONGSTRA, 2004; JONGSTRA-BILEN et al., 1992, JONGSTRA-BILEN et al., 2000; KLEIN et al., 1989; WU et al., 2007)

Em algumas neoplasias do sistema imune, como linfomas, leucemias e doença de Hodking, o *LSP1* é descrito como marcador específico, sendo, em alguns casos, superior ao CD45 (JONGSTRA-BILEN et al., 1999; MARAFIOTI et al., 2003). Uma mutação recentemente descoberta nesse gene foi associada ao aumento do risco de desenvolver câncer de mama (EASTON et al., 2007)

Vários estudos demonstraram que o *LSP1* está intimamente relacionado à resposta imune do organismo, atuando em diferentes níveis. Este potencial se relaciona não apenas às neoplasias do sistema imune, mas também em situações de inflamações sistêmicas inespecíficas. O *LSP1* modula a resposta imune de leucócitos em peritônio normal e inflamado (JONGSTRA-BILEN, et al. 2000; LIU, et al. 2005). Atua também como indutor de apoptose mediada por células B em situações anormais em que linfócitos com atividade auto-imune e células do baço imaturas permaneçam na circulação (JONGSTRA-BILEN et al., 1999). Smith e colaboradores (2007) descreveram a atuação do *LSP1* como um ligante específico ao domínio citoplasmático da DC-SIGN das células dendríticas, direcionando a internalização do vírus HIV-1.

Recentemente, foi descoberta a expressão do *LSP1* em células endoteliais na microcirculação, sendo este o primeiro sítio identificado fora dos leucócitos. Sua função, contudo, está intimamente relacionada a estes, promovendo a formação de “gaps” com a

passagem dos leucócitos para locais específicos do organismo facilitando, assim, a resposta imunológica local (LIU et al., 2005).

Oliveira Jr. et al. (2003) identificaram pela primeira vez o *LSP1* por *differential mRNA display* no sangue periférico de pacientes portadores de HPB e CaP. Este estudo inovador despertou interesse para outra opção de biomarcadores no diagnóstico diferencial destas patologias. Saba (2006) avaliou a expressão deste gene por RT-PCR semi-quantitativa em sangue periférico e tecido prostático de pacientes com CaP e HPB; encontrando uma maior expressão do *LSP1* em pacientes com HPB (Odds = 11.0, p=0.0021 – IC 95%), expressão intermediária em CaP e uma expressão menor no grupo controle. Contudo, sua expressão ainda não foi avaliada por PCR em tempo real, que se trata de uma técnica mais sensível.

O gene *RNASEL* (*Ribonuclease L 2',5' – Oligoisoadenylate synthetase-dependent*) foi identificado recentemente como um candidato ao câncer de próstata hereditário (HPC1) e codifica uma endoribonuclease citoplasmática (RNase L) de 83 kDa, que regula as atividades antivirais, de proliferação e apoptóticas através da via 2-5A interferon-regulada (CARPTEN et al., 2002; ROKMAN et al., 2002 WIKLUND et al., 2004), além de desempenhar um papel no controle do crescimento e diferenciação celular (LENGYEL, 1993).

A RNAse L é expressa constitutivamente em baixos níveis em uma grande variedade de células. Estudos têm sugerido que a RNAse L esteja diretamente ou indiretamente suprimindo um ou mais passos na tumorigênese ou metástase do câncer de próstata (LENGYEL, 1993; LI; TAI, 2006). Mutações encontradas no gene *RNASEL* tem sido associadas ao câncer de próstata hereditário e esporádico, causando alterações nas atividades da RNAse L e afetando o equilíbrio entre o crescimento (hormonalmente regulado) e morte das células prostáticas, portanto, possivelmente associadas ao desenvolvimento do CaP.

Essa proteína é ativada enzimaticamente após ligação à 5' fosforilada da 2-5A que induz sua atividade apoptótica em células tumorais da próstata de humanos, entretanto, a RNAse

L_{R462Q}, uma variante presente em mais de 13% dos casos de câncer de próstata, tem a função da RNAse L diminuída em 3 vezes para os indivíduos que carregam os dois alelos (CASEY et al., 2002). A deficiência da atividade da RNAse L_{R462Q} está correlacionada com a redução da sua habilidade em dimerizar na sua forma cataliticamente ativa. Sua deficiência em causar apoptose na resposta pela via 2-5A pode estar envolvida no desenvolvimento do câncer de próstata (XIANG et al., 2003).

Mutações no gene *RNASEL* também estão associadas à perda de heterozigose e da atividade da proteína RNase L. Em linfoblastos de indivíduos heterozigotos mutados a sua atividade é reduzida pela metade quando comparada com indivíduos homozigotos da mesma família com o respectivo alelo selvagem (CARPTEN et al., 2002; KRUGER et al., 2005; XIANG et al., 2003).

Bettoun e colaboradores (2005) demonstraram interação entre as vias de sinalização de andrógeno e interferon, das quais o receptor de andrógeno (AR) e a RNAse L fazem parte. Este estudo demonstrou que a ativação do AR afeta diretamente a sobrevivência celular pela sinalização intracelular iniciada pelo AR e que também reduz a supressão tumoral induzida pela sinalização por IFN quando o balanço entre andrógeno e interferon, em condições normais, é afetado. Além disso, fornece um modelo molecular de como a RNAse L mutada pode levar ao CaP e como citocinas inflamatórias e a sinalização hormonal pode contribuir para o desenvolvimento do tumor.

De todos os biomarcadores já mencionados, os avaliados neste trabalho (*LSP1* e *RNASEL*) ainda não foram descritos ou não foram estudados pelo mesmo método no câncer de próstata, fato este que torna esse trabalho inovador e que abre mais um caminho para a melhoria do diagnóstico dessa doença.

3 OBJETIVOS

Avaliar o potencial uso dos genes *LSP1* e *RNASEL* como biomarcadores que possam atuar como ferramenta complementar ao PSA no diagnóstico do câncer de próstata, tanto em biópsias prostáticas quanto no sangue periférico de pacientes com CaP e HPB.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras

As amostras 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 Livre e Esclarecido (Anexo I). Todas as técnicas de manipulação do material biológico seguem normas do Código de Ética Médica, conforme aprovação parecer nº 005/2001.

Os pacientes selecionados ingressaram no estudo baseando-se nos seguintes critérios:

Critérios de inclusão: foram incluídos no estudo todos pacientes acima de 45 anos de idade com o exame de toque retal suspeito e/ou níveis séricos de PSA = 2.5 ng/mL que foram submetidos ao rastreamento ambulatorial realizado pelo setor de Urologia do Hospital de Clínicas da UFU. O rastreamento também considerou esses pacientes com ou sem história familiar de câncer de próstata.

A avaliação incluiu análise de sintomas do trato urinário inferior que frequentemente estão relacionados à presença de HPB. Todos pacientes seguiram a rotina do serviço, com exames laboratoriais e avaliação cárdio-anestésica para realização da biópsia.

Raios-x da bacia, coluna lombo-sacral, fêmures ou cintilografia óssea por radioisótopos foram realizados naqueles pacientes com PSA = 10 ng/mL, e nos com dor óssea independente dos níveis de PSA.

Para os pacientes com câncer também foram obtidos o grau de Gleason e o estadiamento TNM.

Critérios de exclusão: foram excluídos do estudo pacientes com história prévia de irradiação pélvica, quimioterapia, terapia hormonal ou qualquer outro tipo de tratamento para o câncer de próstata, evidência de infecção urinária nos últimos três meses; uroanálise e/ou urocultura alterados, febre de origem não definida, instrumentação endoscópica urinária nas últimas duas semanas; portadores de próteses em geral, portadores de doenças valvulares, vigência de antibioticoterapia e pacientes em profilaxia para endocardite bacteriana e pacientes em uso de cateter vesical de demora.

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos *vacuntainer*^{TM} contendo K_2EDTA 7,2 mg e amostras de tecido prostático foram coletadas em microtubos 2,0 mL contendo solução de *RNA holder*® (BioAgency) que impede a atuação das RNases. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Nanobiotecnologia (INGEB/UFU), armazenadas à 4ºC e o RNA foi extraído em até 24 horas.

Um total de 630 homens acima de 45 anos foi rastreado, dos quais 170 com PSA sérico acima de 2,5 ng/mL ou exame de toque retal anormal foram submetidos à prostatectomia radical ou transvesical. De acordo com as análises histopatológicas das biópsias desse subgrupo, 60 pacientes foram diagnosticados com câncer de próstata (CaP) e 30 com hiperplasia prostática benigna (HPB). As análises em sangue periférico foram realizadas nas amostras dos 60 pacientes com câncer de próstata e dos 30 pacientes com HPB que foram biopsiados, destes, 43 amostras CaP e 15 HPB foram analisadas em tecido prostático. Um grupo composto por 60 indivíduos voluntários saudáveis com idade média de 22 anos (mínima de 14 e máxima de 29 anos) foi utilizado como grupo controle nas análises em sangue periférico. A triagem dos pacientes, conforme acima, foi realizada pelo serviço de Urologia do Hospital de Clínicas da UFU de acordo com os parâmetros clínicos-histopatológicos, tais como níveis de PSA sérico total, exame de toque retal, grau de Gleason e estadiamento TNM. Os pacientes que foram submetidos à biópsia estavam livres de

radioterapia, quimioterapia ou terapia hormonal antes da cirurgia. As características clínico-histopatológicas desses pacientes estão relacionadas na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos pacientes conforme as características clínico-histopatológicas

	Amostras Sangue No. (%)		
	CaP	HPB*	Voluntários saudáveis
	60	30	60
Média idade ± SEM	65 ± 1.0	69 ± 1.4	22 ± 0.63
PSA sérico ng □ ml			
< 2.5	1/52 (2.0)	0/17 (0)	
2.5 < PSA < 4.0	2/52 (4.0)	4/17 (23.5)	
4.0 < PSA < 10.0	32/52 (61.3)	7/17 (41.0)	
PSA = 10.0	17/52 (32.7)	6/17 (35.5)	
Grau Gleason			
5 – 7	51/54 (94.5)		
8 – 9	3/54 (5.5)		
TNM			
T1	3/52 (6.0)		
T2	39/52 (75.0)		
T3	10/52 (19.0)		

*Status determinado na biópsia final

4.2 Extração RNA total de Sangue Periférico e Tecido Prostático

A extração do RNA total das amostras de sangue foi realizada da camada de leucócitos de sangue periférico de acordo com Chomczynski and Sacchi (1987) com modificações (Anexo

II) e o RNA total das amostras de tecido prostático foi extraído utilizando-se o Trizol Reagent® (INVITROGEN), de acordo com protocolo Anexo III.

A qualidade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose numa concentração de 1,5% (1,5g agarose /100mL tampão TBE) corado brometo de etídio 0,5 μg/ml (SAMBROOK et al., 1989), submetido à voltagem de 120 volts por aproximadamente 40 minutos em tampão TBE (450 mM de TRIS, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, 1 L água mili-Q, pH 8,0) diluído 20 vezes e depois visualizado em sistema de videodocumentação - VDS versão 2.0 (Pharmacia Biotech). Posteriormente, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro de alta sensibilidade Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE USA) a um comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. Em seguida, o ácido ribonucléico foi armazenado à –80°C para subseqüente análise.

4.3 RT-PCR (Transcrição Reversa)

A transcrição reversa (RT) foi padronizada à 126 μM de oligonucleotídeos hexâmeros como primers randômicos (Invitrogen), 1 μg de RNA total como *template*, 40 U de *Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase* MMLV-RT (USB), 4 μL de 5X *MMLV reaction buffer* (USB), 250 μM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen), e 10 U de inibitor de Rnase (USB), 0.5 mM de DTT. O volume final da reação foi completado para 20 μL com água mili-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Em seguida a reação foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) a 37°C por 1 hora e então o cDNA foi estocado à -20ºC até o uso.

A qualidade do cDNA foi avaliada pela amplificação de um fragmento de 534 pb do gene constitutivo *ß-2-Microglobulin* (*B2M*), a sequência dos *primers* estão descritas no apêndice A (B2M1F e B2M2R). As condições desta reação foram: 10X *PCR buffer* (20 mM Tris-HCl – pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 50% v/v) (Invitrogen), 200 μM de dNTPs (Invitrogen), 5 μM de *primers* (Invitrogen), 1 U *Platinum®Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 2 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 2 μL de cDNA, água mili-Q utilizada para completar o volume final da reação para 20 μL. A reação ocorreu em 28 ciclos, sendo cada ciclo composto de 95ºC por 4 min, 94ºC por 40 s, 59ºC por 40s, 72ºC por 50s e 72ºC por 5 min em termo ciclador PTC-100 (MJ Research Inc.). O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,5g agarose /100mL tampão TBE) corado com brometo de etídio 0,5 mg/mL a uma voltagem de 140 Volts em tampão TBE (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, 1 L água mili-Q, pH 8,0) diluído 20 vezes por 40 minutos. Para cada 10 μL de produto amplificado foram adicionados 2 μL loading dye (12,5 mg de azul de xileno cianol, 4 g de sacarose e 5 mL de água mili-Q) e em seguida aplicados no gel.

3.4 PCR Multiplex Semiquantitativa para o gene *RNASEL*

Um estudo semiquantitativo preliminar avaliou a expressão do gene *RNASEL* em 152 pacientes submetidos à biópsia prostática, sendo 56 CaP, 28 HPB e 68 voluntários saudáveis por PCR semiquantitativa. O gene da *ß-2-microglobulina* foi utilizado como constitutivo para caracterizar a qualidade do RNA e normalizar os níveis de expressão.

Uma reação de PCR multiplex convencional foi realizada para quantificação dos transcritos do gene *RNASEL* e os *primers* para essa reação resulta na amplificação de um fragmento de 271 pb. Foram utilizados *primers* que delimitam um fragmento de 534 pb para gene *ß-2-microglobulina* (*B2M*). A reação foi padronizada nas seguintes condições: 10 μM de *primers* para o gene *RNASEL* e 5 μM para o *B2M* (Invitrogen), 1 U *Platinum®Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 10X *PCR buffer* (20 mM Tris-HCl – pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 50% v/v) (Invitrogen), 200 μM de dNTPs (Invitrogen), 2 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 2 μL de cDNA e água ultrapura foi usada para completar o volume final da reação para 20μL. A ciclagem foi padronizada com: 95ºC por 5 minutos, 27 ciclos a 94ºC por 40 segundos, 59 ºC por 40 segundos, 72°C por 50 segundos e incubação final de 72°C por 10 minutos. As sequências dos primers utilizados (RNASEL1F e RNASEL2R; B2M1F e B2M2R) estão descritas no apêndice A. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,5g agarose /100mLtampão TBE) corado brometo de etídio 0,5 mg/mL a uma voltagem de 140 Volts em tampão TBE (450 mM de Tris, 450 mM de ácido bórico, 10 mM EDTA, 1 L água mili-Q, pH 8,0) diluído 20 vezes por 40 minutos. Para cada 10 μL de produto amplificado foram adicionados 2 μL loading dye (12,5 mg de azul de xileno cianol, 4 g de sacarose e 5 mL de água mili-Q) e em seguida aplicados no gel. O fragmento esperado foi visualizado em sistema de videodocumenteção *Image Master-VDS* (Amersham Bioscience). A quantificação foi realizada pela leitura da densidade óptica das bandas calculadas no programa *Image Master VDS Software* versão 2.0. As leituras foram submetidas á razão de RNAm *RNASEL*/RNAm *ß2M* para se obter a abundância relativa dos transcritos do gene alvo.

3.5 Construção da Curva Padrão Relativa

Para validar o método C_T comparativo de quantificação relativa a eficiência de amplificação do alvo e do controle endógeno foi calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\mathbf{E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100}$$

O *slope* da curva de amplificação relativa e o R^2 foram utilizados nos passos iniciais de padronização dos experimentos para estimar a eficiência da reação. Para gerar os gráficos de regressão linear foram admitidos um *slope* próximo de -3.32 e um $R^2 = 0.98$.

Com base nesses critérios as curvas padrões para os genes alvos e endógeno foram construídas utilizando um pool composto de 10 amostras de cDNA escolhidas aleatoriamente para os ensaios em tecido prostático e uma amostra de cDNA aleatória para os ensaios em sangue periférico, provenientes de 1 µg de RNA total, amplificadas em duplicata. Essas amostras foram diluídas em série na ordem de 4X, conforme as seguintes concentrações: 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256; e três pontos ou quatro pontos foram usados na construção dos gráficos de regressão linear.

A compatibilidade das eficiências de amplificação entre alvo e endógeno foi considerada quando o ΔC_T ($C_{TMédioAlvo}$- $C_{TMédioEndógeno}$) sofreu pequenas variações, com o valor de “a”, na fórmula y = ax + b, entre -0,1 e + 0,1.

3.6 PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real para amplificação dos genes alvo *LSP1* e *RNASEL* e endógeno *B2M* foram realizadas a partir do cDNA proveniente de 1µg de RNA total. Para as análises em tecido prostático as reações foram padronizadas a partir desse cDNA diluído na proporção de 1:4. Todas as amostras foram amplificadas em duplicata, sendo que as duplicatas que diferiram mais de 1,5 C_T foram reamplificadas ou excluídas das análises. A detecção do alvo durante a amplificação ocorreu pela emissão de fluorescência pelo fluoróforo *SYBRGreen* contido no Master Mix *SYBR®Green PCR Core Reagents* (Applied Biosystems) para ambos os genes. O Master Mix é composto por: AmpliTaq *Gold® DNA Polymerase LD*, dNTPs com dUTP/dTTP, referência passiva e tampão otimizado. Para cada reação foram usados: 1X Master Mix, 5 µM de *primer* para os genes alvo e 3 µM para o endógeno (IDT Tecnologies), 2 µl de cDNA e água de ultrapura para completar um volume final de 10 µl. O programa utilizado para amplificação de todas as reações foi o *Universal Program* (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

Como exigência da técnica, novos *primers* foram desenhados para o genes *LSP1*, *RNASEL* e *B2M* que delimitam fragmentos de 124 pb, 75 pb e 94 respectivamente. O programa utilizado para desenhar os *primers* foi o *Primer Express* versão *3.0* - Applied Biosystems e as sequências destes encontram-se no apêndice A. A viabilidade dos primers foi verificada em uma reação de PCR convencional antes do seu uso na PCR em tempo real.

Todas as reações foram processadas no aparelho 7300 Real *Time PCR Systems* (Applied Biosystems) e seu *software* foi utilizado para as análises das reações pós-amplificação. A quantificação foi fornecida pelo *software* ao fim da reação, utilizando o C_T e a *baseline* automáticos, e os níveis transcricionais do alvo foram obtidos em relação ao endógeno de

acordo com a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta C_T = (C_{TMédioAlvo} - C_{TMédioEndógeno}) - C_{TMédioCalibrador}$ (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

3.7 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares *SPSS® 10.0* e *BioEstat® 5.0*, admitindo um nível de significância estatística quando $P<0.05$. O teste não-paramétrico *Mann-Whitney* foi realizado para avaliar as diferenças nos níveis de expressão. Em virtude do pequeno número de pacientes com 2,5 ng/mL < PSA < 4,0 ng/mL, para avaliar a expressão dos biomarcadores nesse grupo foi utilizado o Test t. Os scores considerados *outliers* foram removidos da análise, conforme descrito previamente por Burns e colaboradores (2005).

A curva ROC foi utilizada para determinar o melhor *cutoff* e os parâmetros dos testes diagnóstico. A especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia foram calculados com base no *cutoff* pré-estabelecido de acordo com as seguintes expressões: sensibilidade = VP(verdadeiros positivos)/VP+FN (falsos negativos), especificidade = VN (verdadeiros negativos)/VN+FP (falsos positivos), VPP = VP/VP+FP, VPN = VN/VN+FN. O teste de odds ratio foi calculado após estabelecimento do *cutoff* para obter-se a probabilidade de ocorrência da doença quando os biomarcadores *LSP1* e *RNASEL* foram positivos, individualmente ou em conjunto. A correlação entre a expressão dos marcadores e os dados clínico-histopatológicos foi avaliada pelo teste de correlação de *Spearman*. A associação entre a expressão e os dados clínico-histopatológicos estratificados com base no *cutoff* de cada biomarcador foi realizada pelo teste Exato de Fisher.

4 RESULTADOS

O RNA total extraído das amostras de sangue periférico e tecido prostático utilizado nas reações de RT-PCR apresentou ótima qualidade, conforme mostra a figura 2, e o cDNA resultante deste foi utilizado nas reações de PCR convencional e tempo real.

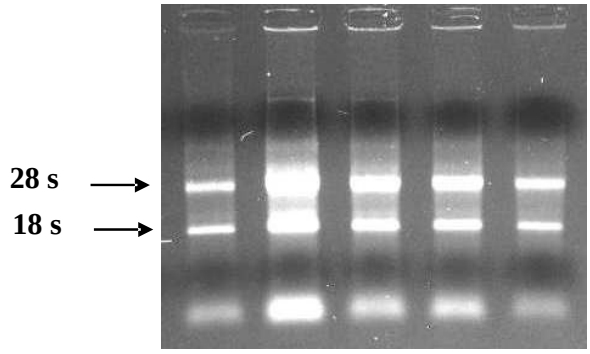

Figura 2: Foto representativa da análise da qualidade do RNA total extraído de amostras de sangue periférico e tecido prostático por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

A figura 3 demonstra a excelente qualidade do cDNA utilizado nas reações de PCR, em que um fragmento de 534 pb do gene *B2M* foi amplificado e visualizado em gel de agarose.

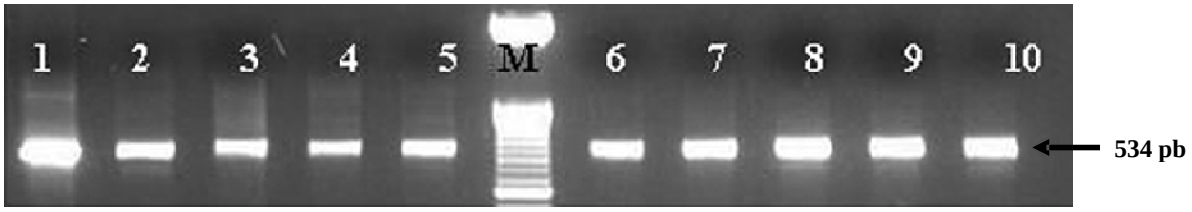

Figura 3: Foto representativa do produto amplificado de 534 pb (indicado pela seta) do gene *B2M* por PCR convencional em amostras de sangue. Detecção por eletroforese em gel de agarose 1,5%, onde M – Marcador de peso molecular de 100 pb; 1 a 5 cDNA de amostras CaP; 6 a 8 cDNA de amostras HPB; 9 e 10 cDNA de amostras voluntários saudáveis

A figura 4 representa o resultado de um estudo preliminar que avaliou os níveis de expressão do gene *RNASEL* em amostras de sangue periférico. Os dados semiquantitativos desse gene demonstraram haver um baixo nível de expressão do gene alvo nos indivíduos saudáveis, uma expressão intermediária em pacientes com HPB e uma maior expressão em pacientes com CaP, confirmados pela análise estatística.

As análises da densidade óptica demonstraram que a expressão desse gene foi sete e três vezes maiores quando comparada com os grupos voluntários saudáveis e HPB, respectivamente. No grupo HPB, a expressão foi duas vezes maior comparada com voluntários saudáveis ($p<0,001$) (Figura5).

Figura 4: Resultado da PCR multiplex em amostras de sangue periférico detectado por eletroforese em gel de agarose 1,5%. As setas indicam os fragmentos de 534 pb e 271 pb para os genes *B2M* e *RNASEL*, respectivamente. 1 - 11 amostras de indivíduos saudáveis, 12 - 21 amostras de pacientes com câncer de próstata e de 22 - 27 amostras de hiperplasia prostática benigna; M: marcador de peso molecular 100 pb; Br: controle da reação sem cDNA.

No sangue periférico os pacientes *RNASEL* positivo apresentaram uma chance 38 vezes maior de desenvolver câncer em relação aos voluntários saudáveis e 9 vezes maior em relação aos pacientes com HPB, utilizando o *cutoff* = 0,12 ($p < 0,001$). Com base nesse *cutoff*, os parâmetros diagnósticos dos testes apresentaram os seguintes valores: sensibilidade de 75%, especificidade de 94% e acurácia de 85% para CaP *versus* voluntários saudáveis; e

sensibilidade 75%, especificidade 71%, VPP 84%, VPN 59% e acurácia 74% para CaP *versus* HPB.

Os níveis transcricionais do gene *RNASEL* não foram significativamente correlacionados com os parâmetros clínico-histopatológicos, tPSA pré-operatório (r = 0.12), Gleason (r = 0.23), TNM (r = 0.29) (*Spearman*, p > 0.05). Contudo, houve correlação positiva entre a idade e os níveis transcricionais desse gene (*Spearman*, r = 0.59, p < 0.0001).

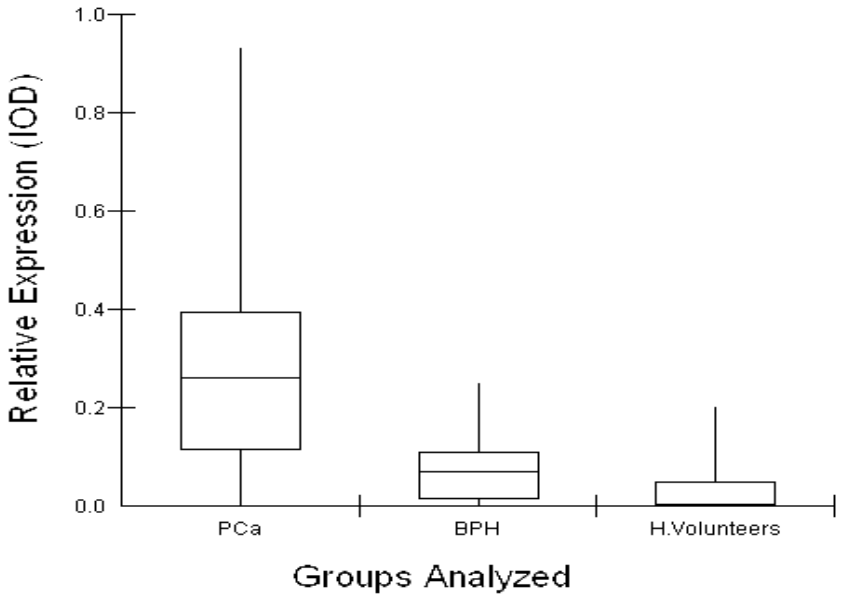

Figura 5: Box Plot das medianas e quartis para os níveis relativos de expressão, por PCR semi-quantitativa, do gene *RNASEL* em amostras de sangue periférico de pacientes com Câncer de Próstata (PCa), Hiperplasia Prostática Benigna (BPH) e voluntários saudáveis.

4.1 Ensaios por PCR em tempo real

A priori a eficiência das reações foram calculadas para os ensaios em tecido e sangue e os gráficos de regressão linear foram gerados no software Microsoft Excel®. Os gráficos de regressão linear demonstraram que as eficiências das amplificações do alvo e do controle endógeno são aproximadamente iguais, pois o valor de "a" para todos os ensaios estão entre -0.1 e +0.1 (Figura 6); assim os resultados obtidos permitiram utilizar a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$ para a quantificação dos transcritos dos biomarcadores.

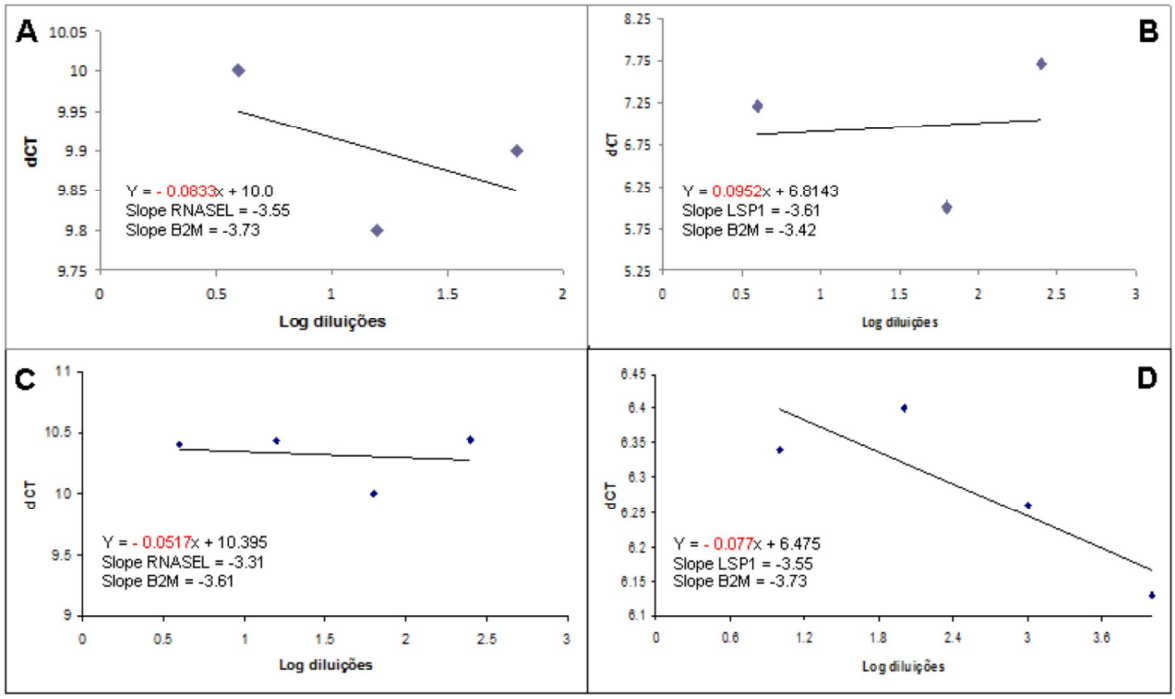

Figura 6: Eficiência das reações de PCR em tempo real obtida após diluição seriada de um pool de cDNA (tecido) e uma amostra de cDNA (sangue). A e C – curvas geradas para os ensaios em sangue e tecido, respectivamente, para o gene *RNASEL*; B e D – curvas geradas para os ensaios em sangue e tecido, respectivamente, para o gene *LSP1*. Sendo que o valor de "a" na equação da reta (em destaque) está entre -0.1 e + 0.1 (Applied Biosystems).

A curva de dissociação gerada ao final de cada reação demonstrou que não houve amplificações inespecíficas, formação de dímeros de *primers* ou contaminação das amostras, demonstrando que as amostras utilizadas nos experimentos foram de excelente qualidade. Conforme mostra a figura 7, as curvas de dissociação apresentaram apenas um único pico em uma única temperatura e o controle da reação (seta), conforme esperado, não amplificou. As curvas de amplificação demonstraram a mesma cinética, pois seguiram o mesmo padrão não havendo excesso ou falta de *primers* ou de amostra inicial que poderia inibir a reação

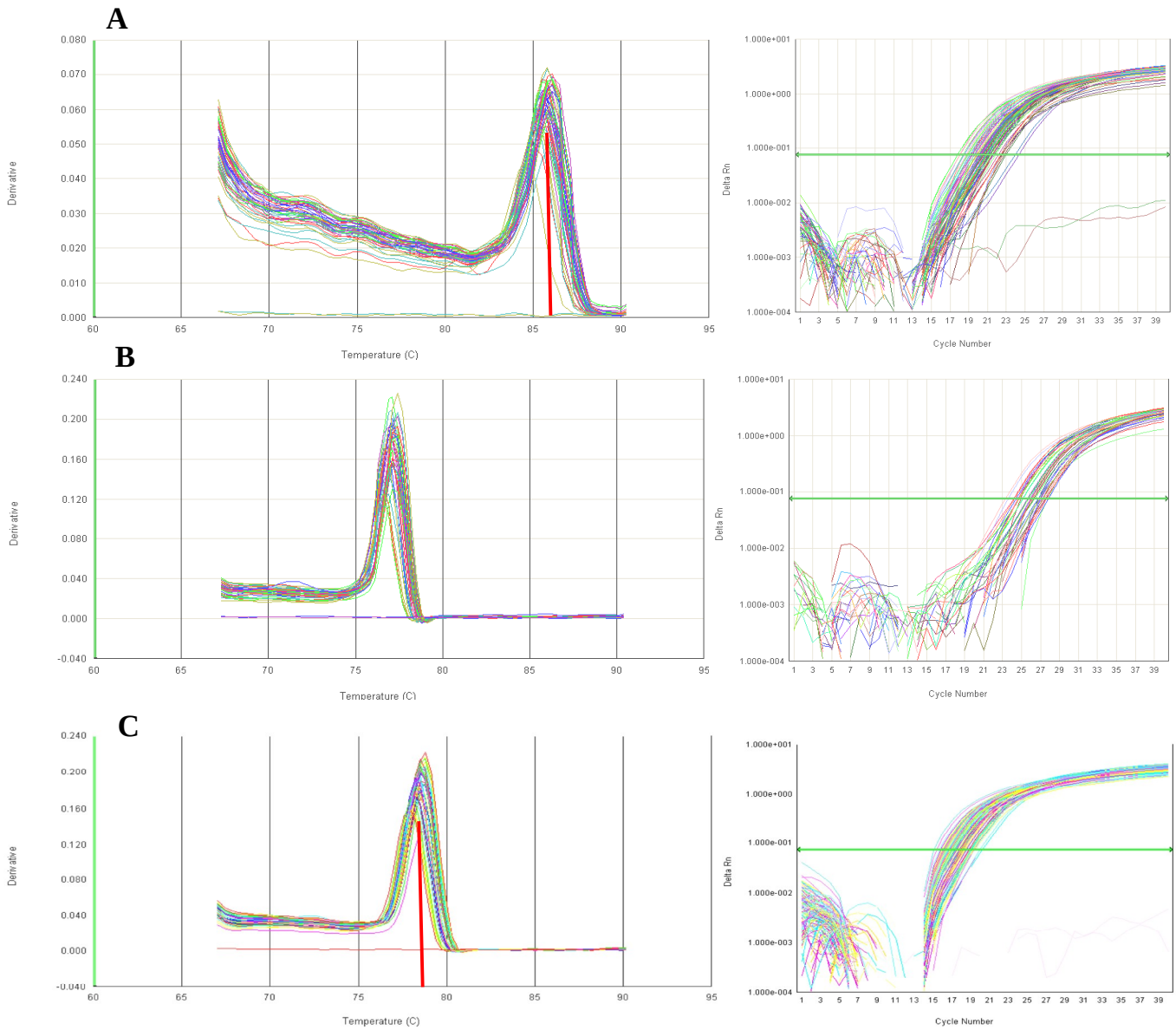

Figura 7: Curvas de dissociação e de amplificação por PCR em tempo real para os genes *LSP 1*(A), *RNASEL* (B) e *B2M* (C). Controle da reação, indicado pela seta, não mostrou picos de amplificação.

A análise descritiva demonstrou distribuição não normal dos dados e foram utilizados testes não-paramétricos nas análises de expressão. Com base nos *scores* fornecidos pela RQ-PCR para cada gene, não foi encontrada diferença de expressão nas análises em tecido prostático [*LSP1* (*P*=0.2) e *RNASEL* (*P*=0.07), Mann-Whitney]. As análises em sangue periférico demonstraram haver diferenças significativas de expressão entre todos os grupos em ambos os genes. Foi encontrada diferença estatística entre CaP vs HPB (*LSP1*, p = 0.02; *RNASEL*, p = 0.01), HPB vs voluntários saudáveis (*LSP1*e *RNASEL*, p < 0.0001) e entre CaP vs voluntários saudáveis (*LSP1* e *RNASEL*, p < 0.0001) (Figura 8). Contudo, não foram encontradas diferenças de expressão no grupo de pacientes com 2,5 ng/mL < PSA < 4,0 ng/mL para ambos biomarcadores (Test t, p > 0.05). Os níveis transcricionais do controle endógeno (*B2M*) foram avaliados com base nas análises do C_T médio e não foram encontradas diferenças de expressão entre os grupos para nenhum dos marcadores analisados (p > 0.05; Mann-Witney).

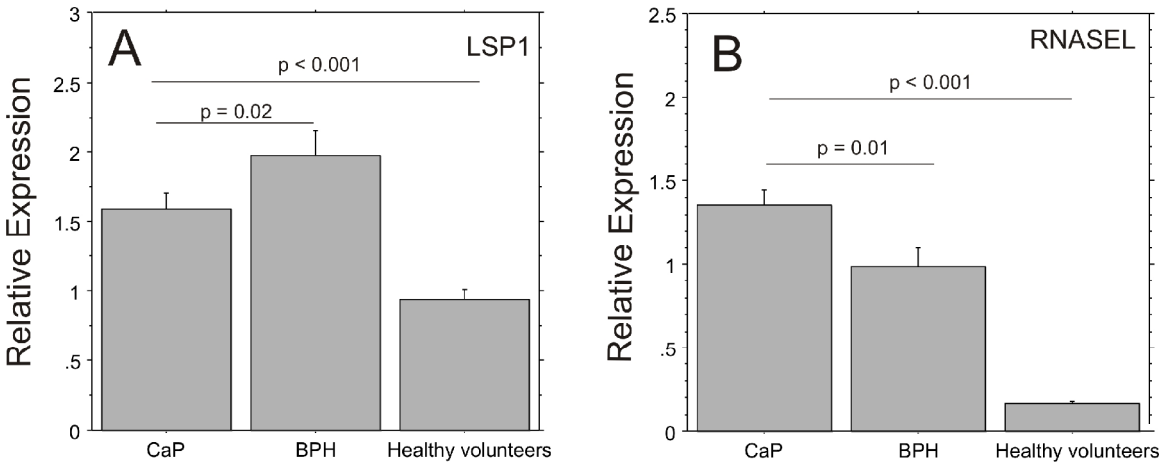

Figura 8: Expressão relativa dos genes *LSP1* (A) e *RNASEL* (B) em amostras de sangue periférico de pacientes com CaP, HPB e voluntários saudáveis.

Os *cutoff* fornecidos pela curva ROC e que indicaram uma melhor sensibilidade e melhor especificidade foram: 1.79 para o gene *LSP1* e 1.25 para o gene *RNASEL* (Figura 9). A partir desses valores os *odds ratio*, sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia, para os biomarcadores individualmente e combinado, foram calculados. Para as análises individuais foram considerados positivos os pacientes que tiveram valores de expressão iguais ou maiores que os seus respectivos *cutoff*.

Foi encontrada uma chance 3.5 vezes maior para ocorrência de HPB naqueles pacientes *LSP1* positivo em relação aos pacientes com CaP (p = 0.01, CI 95% 1.42-8.63), 19 vezes em relação aos indivíduos saudáveis (p = 0.0018, CI 95% 1.88-15.70); e foi observada uma chance de 5.4 vezes maior para ocorrência de CaP quando comparado com indivíduos saudáveis (p < 0.0001, CI 95% 5.93-60.85). Em relação ao gene *RNASEL* foi encontrada 3.2 vezes maiores chances para ocorrência do CaP em pacientes *RNASEL* positivo comparado aos pacientes com HPB (p = 0.02, CI 95% 1.30-8.08), 78 vezes em relação aos indivíduos saudáveis (p < 0.0001, CI 95% 10.17-597.55); e quando comparado HPB e indivíduos saudáveis foi encontrado 24 vezes maiores chances para ocorrência de HPB (p < 0.0003, CI 95% 2.89-201.73). Quando as análises foram realizadas para um teste duplo-marcador (*Duplex assay*), as chances para ocorrência do CaP em indivíduos que apresentaram os biomarcadores *LSP1* negativo e *RNASEL* positivo, em relação aos indivíduos com HPB aumentaram para 4.5 vezes (p = 0.003, CI 95% 1.22-16.65).

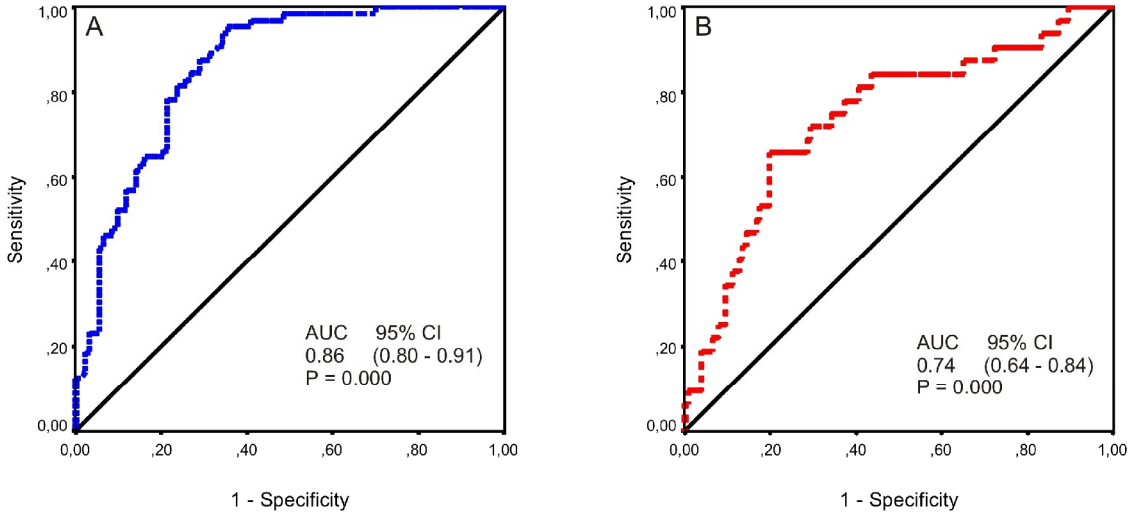

Figura 9: Curva ROC determinada por regressão logística univariada dos *scores* de cada biomarcador em sangue periférico. A – *RNASEL* (*cutoff* 1.25); B – *LSP1* (*cutoff* 1.79). Os valores AUC estão dispostos dentro da figura.

Com base nos mesmos *cutoff* os parâmetros clínicos do teste foram calculados. Em relação ao gene *LSP1* dos 30 pacientes com HPB 19 apresentaram *scores* de 1.79 ou maiores (sensibilidade 63%); e dos outros 120, 102 tinham *scores* menores que 1.79 e foram corretamente diagnosticados como pacientes sem HPB revelando uma especificidade de 85%. Em relação ao gene RNASEL dos 60 pacientes com biópsia positiva (CaP) 37 apresentaram *scores* de 1.25 ou maiores (sensibilidade 61%); e dos 90 pacientes com biópsia negativa (HPB) e voluntários saudáveis 82 foram classificados corretamente como pacientes sem câncer demonstrando uma especificidade de 91%.

Para as análises do teste duplo-marcador (*Duplex assay*) o critério de positividade foi considerado quando os pacientes apresentaram *LSP1* negativo e *RNASEL* positivo e de negatividade todas as outras combinações, com base nos seus respectivos *cutoff*. Neste teste o CaP foi comparado contra todos os outros casos e demonstrou uma sensibilidade de 80% e especificidade de 96%, com acurácia de 91%, melhorando, portanto, os parâmetros diagnósticos, conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros diagnósticos para os testes realizados com base nos *scores* dos genes *LSP1* e *RNASEL*

Marcador	*Cutoff*	Sensibilidade %	Especificidade %	VPP %	VPN%	Acurácia %
LSP1 (RNAm)	1,79	63	85	44	89	77
RNASEL (RNAm)	1,25	61	91	80	75	77
Duplex assay		80	96	87	93	91

Esses foram os melhores valores considerados de acordo com o ponto na curva ROC com a mínima distância do ponto (0,1) ou 1-especificidade=0 e sensibilidade=1

Correlações entre os níveis transcriocionais de ambos os biomarcadores e os parâmetros clínico-histopatológicos foram realizadas, porém foi encontrada correlação positiva para ambos marcadores apenas entre os níveis transcricionais e a idade, *LSP1* ($p < 0.0001$, $r = 0.44$), *RNASEL* ($p < 0.0001$, $r = 0,62$). Para os demais parâmetros não foi encontrada correlação significativa (*Spearman*, $p > 0.05$), apresentando os seguintes valores de r para o marcador *LSP1*, TNM ($r = 0.11$), PSA ($r = 0.10$), Gleason ($r = 0.04$); e para o *RNASEL*, TNM ($r = 0.18$), PSA ($r = 0.02$), Gleason ($r = 0.09$).

.....As análises entre a expressão desses marcadores e os dados clíníco-histopatológicos pelo teste Exato de Fisher, com base nos mesmos *cutoff*, demonstraram associação entre os níveis transcricionais do marcador *RNASEL* e o câncer mais avançado, T2c e T3 ($p = 0.001$ e $p = 0.004$, respectivamente). Quando o teste duplo-marcador foi avaliado, este apresentou o mesmo comportamento ($p = 0.04$ e $p = 0.01$, para T2c e T3, respectivamente), sendo que para os demais dados clínico-histopatológicos e para o marcador *LSP1* não foram encontradas associações (Tabela 3).

Tabela 3. Associação entre a expressão e os dados clínico-histopatológicos com base nos *scores* dos biomarcadores pelo teste Exato de Fisher

	MARCADORES								
Dados clínicos	**LSP1 No. (%)**		***P***	**RNASEL No. (%)**		***P***	***Duplex assay No. (%)**		***P***
PSA ng/mL	LSP1 +	LSP1 -		RNASEL +	RNASEL -		+	-	
< 4.0	4/7 (57.0)	3/7 (43.0)	0.30[a]	2/7 (29.0)	5/7 (71.0)	0.30[a]	1/7 (14.0)	6/7 (86.0)	0.44[a]
4.0 – 10.0	16/42 (38.0)	26/42 (62.0)	0.55[b]	20/42 (48.0)	22/42 (52.0)	0.26[b]	11/42 (26.0)	31/42 (74.0)	0.33[b]
> 10.0	8/20 (40.0)	12/20 (60.0)	0.36[c]	12/20 (60.0)	8/20 (40.0)	0.16[c]	7/20 (35.0)	13/20 (65.0)	0.30[c]
Gleason									
< 7.0	8/24 (33.0)	16/24 (67.0)	0.40	12/24 (50.0)	12/24 (50.0)	0.51	7/24 (29.0)	17/24 (71.0)	0.39
= 7.0	8/30 (27.0)	22/30 (73.0)		16/30 (53.0)	14/30 (47.0)		11/30 (37.0)	19/30 (63.0)	
TNM									
T1 + T2a-b	1/8 (13.0)	7/8 (87.0)	0.21[d]	0/8 (0)	8/8 (100.0)	**0.001**[d]	0/8 (0)	8/8 (100.0)	**0.04**[d]
T2c	12/34 (35.0)	22/34 (65.0)	0.31[e]	22/34 (65.0)	12/34 (35.0)	0.53[e]	13/34 (38.0)	21/34 (62.0)	0.19[e]
T3	2/10 (20.0)	8/10 (80.0)	0.60[f]	7/10 (70.0)	3/10 (30.0)	**0.004**[f]	6/10 (60.0)	4/10 (40.0)	**0.01**[f]

[a] PSA < 4.0 vs PSA 4.0 – 10.0, [b] PSA 4.0 – 10.0 vs PSA > 10.0 e [c] PSA < 4.0 vs PSA < 10.0

[d] T1 + T2a-b vs T2c, [e] T2c vs T3 e [f] T1 + T2a-b vs T3

5 DISCUSSÃO

Apesar dos ótimos resultados obtidos com a PCR convencional neste trabalho, atualmente o método mais comum de análise de expressão gênica é a PCR em tempo real. Esse método quantitativo é mais preciso e sensível (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004), além disso a PCR em tempo real tem várias outras vantagens em relação à PCR convencional.

A metodologia utilizada aliada às características de cada biomarcador, aqui avaliados, contribuíram para o desenvolvimento de um teste diagnóstico para o câncer de próstata. O gene *LSP1* está expresso nas células hematopoiéticas e endoteliais, sendo um biomarcador específico para neoplasias do sistema imune e doença de Hodgkin's, porém não há trabalhos na literatura que o descrevam no câncer de próstata. Esse gene está envolvido numa complexa função na regulação do recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação. Além disso, um SNP (*single nucleotide polimorphism*) nesse gene foi associado ao risco de desenvolvimento de câncer de mama (MARAFIOI et al. 2003; EASTON et al., 2007), sinalizando seu papel no microambiente tumoral.

O gene *RNASEL* também está envolvido com a vigilância do sistema imunológico, pois codifica uma proteína com atividade antiviral mediada por interferon. Várias mutações tem sido descritas nesse gene e algumas delas estão associadas à predisposição ao câncer de próstata (SILVERMAN, 2003). Vários são os estudos que avaliam os efeitos dos níveis de sua enzima, porém não há descrito estudos de corte que avaliam os níveis de expressão desse gene como feito no presente trabalho.

O fato de o *LSP1* ser encontrado na membrana de leucócitos e o *RNASEL* estar envolvido com atividade antiproliferativa, e ambos envolvidos com a resposta imune, o desenvolvimento

de um teste duplo-marcador para diagnóstico diferencial do CaP em sangue periférico torna-se muito promissor; além de ser um método de detecção não invasivo. Neste trabalho encontramos excelentes resultados que indicam o potencial desses genes como biomarcardores para esta doença.

Embora o PSA sérico esteja sendo usado há quase três décadas como biomarcador único para o diagnóstico do câncer de próstata, este porém, possui baixa sensibilidade além de não ser tumor específico (THOMPSON et al., 2004). Atualmente, na prática clínica, o *cutoff* utilizado para o PSA é de 2.5 ng/mL, mas há estudos que indicam que este valor possui o mesmo comportamento do 4.0 ng/mL, ou seja baixa sensibilidade e especificidade (THOMPSON et al., 2004; THOMPSON; ANKERST, 2007).

Trabalhos na literatura reportam dados de diversos potenciais biomarcadores para o CaP principalmente em sangue periférico, tecido prostático e urina (GREGORIO, 2007; MAKAROV et al., 2009; POEL, 2007; SHAPPELL, 2008), porém poucos possuem resultados tão bons quantos os apresentados nesse trabalho, incluindo o recente e mais poderoso biomarcador *PCA3* (Ouyang et al., 2009; WRIGHT; LANGE, 2007). Um método largamente utilizado em estudos que envolvem testes diagnósticos é a curva ROC; que é um gráfico que demonstra a razão entre falsos-positivos (eixo X) e verdadeiros-positivos (eixo Y); além de indicar a melhor sensibilidade e especificidade do teste, pois quanto mais próxima a curva está do eixo Y mais próximo de 1 é o valor da a*rea under curve* (AUC) e mais verdadeiros positivos o teste detecta e, portanto, melhor é o teste (AKOBENG, 2006).

Estudos que utilizaram a curva ROC para avaliar o *PCA3* na urina revelaram um desempenho pouco menor que os resultados deste trabalho, como sensibilidade que varia de 61% a 82%, especificidade de 76% a 89% e área sob a curva ROC (AUC) de 0.66 a 0.87 quando normalizado aos níveis de PSA (WRIGHT; LANGE, 2007). Apesar de esses resultados serem relativamente bons, sua aplicação na prática clínica é inviável, pois os

pacientes são submetidos à massagem prostática antes da coleta de secreções prostáticas, o que é um procedimento invasivo e desconfortante para os pacientes. Ouyang e colaboradores em estudo que avaliou os biomarcadores PSA sérico, *PCA3* e *AMACR* em urina de pacientes submetidos à massagem prostática não encontrou diferença de expressão para o PSA, e a sensibilidade foi de 70% e 72% e a especificidade de 71% e 59% para *AMACR* e *PCA3*, respectivamente. Estes parâmetros aumentaram para 81% e 84%, respectivamente quando um teste de duplo-marcador foi aplicado. Contudo, o referido estudo avaliou somente 92 pacientes classificados em câncer e não câncer, sem estratificá-los, além disso, os pacientes foram submetidos à massagem prostática.

.....Neste trabalho a curva ROC apresentou valores de AUC muito significativos (0.74 para o *LSP1* e 0.86 para *RNASEL*) para os respectivos *cutoff* de ambos marcadores. Shappell (2008) apresentou consideráveis valores AUC para o PCA3 (0.68) e AMACR (0.69), mas não para o PSA (0.52), na urina. Porém, o PSA sérico demonstrou considerável valor de AUC (0.68) à 4.0 ng/mL (THOMPSON et al., 2005).

Neste trabalho foram avaliados dois novos biomarcadores para a detecção do câncer de próstata em sangue periférico e desta forma trata-se de um método não invasivo e que não causará nenhum desconforto ao paciente, pois o método de coleta da amostra trata-se apenas da coleta do sangue. O fato de ter sido utilizado um grupo controle do estudo torna os resultados deste trabalho ainda mais robustos, visto que, outros trabalhos na literatura não utilizam de grupo controle, tais como o de Ouyang e colaboradores (2009). Os biomarcadores, aqui estudados, conseguiram distinguir consideravelmente CaP de HPB, o que é uma vantagem para o diagnóstico inicial da doença, bem como para a detecção diferencial em homens acima dos 60 anos de idade; pois estes apresentam algum grau de HPB e, normalmente, altos valores de PSA. Além disso, os pacientes que tiveram o biomarcador *LSP1* e *RNASEL* positivo apresentaram 3.5 e 3.2 maiores chances em desenvolver HPB e

CaP, respectivamente. Quando o teste duplo-marcador foi aplicado as chances em desenvolver CaP aumentaram para 4.5 vezes, melhorando o diagnóstico.

Os parâmetros clínicos encontrados nos testes realizados neste estudo superaram os descritos na literatura, demonstrando um excelente desempenho e apresentando alta sensibilidade e especificidade para ambos marcadores. Esses resultados melhoraram ainda mais quando o teste duplo-marcador foi aplicado, aumentando a sensibilidade para 80% e a especificidade para 96%; enquanto dados da literatura demonstram que o PSA sérico apresenta sensibilidade de 37% e 53% e especificidade de 73% e 72% para *cutoff* de 2.1 a 3.0 ng/mL, sendo que à 2.6 ng/mL somente 40.5% dos casos de câncer são detectados e 61% dos casos são falsos positivos à 1.1 ng/mL (THOMPSON et al., 2004, 2005).

Com bases nos excelentes resultados encontrados nesse estudo podemos sugerir o uso desses marcadores em um teste diagnóstico que possa auxiliar o PSA, ou mesmo suplantá-lo, na detecção do câncer de próstata, visando diminuir os custos com as repetidas biópsias negativas e minimizar os desconfortos causados aos pacientes, com um teste que seja minimamente invasivo. Contudo, futuros cortes, envolvendo outras populações, são esperados para fornecer a reprodutibilidade necessária para sua inserção na prática clínica.

O desenvolvimento da HPB e do CaP bem como as relações entre eles ainda não são totalmente entendidos, porém existem hipóteses que sugerem que o metabolismo androgênico atua em conjunto com eventos inflamatórios, na ocorrência da HPB e na severidade do câncer de próstata.

Fatores como infecção, exposição hormonal e injúria podem levar a inflamação das células da próstata. A inflamação pode ser um estágio pré-HPB, pois há autores que sugerem que a hiperplasia pode ser uma forma da atrofia inflamatória proliferativa (AIP); ou as duas condições podem ocorrer concomitantemente (REBBECK et al., 2008). A sinalização intracelular feita pelo receptor de andrógeno (AR) ligado à dihidrotestosterona (DHT) leva à

liberação de citocinas e fatores de crescimento resultando em uma rápida proliferação celular e, consequentemente ao desenvolvimento da HPB. Durante a cascata de sinalização o estímulo por algum fator de transcrição pode levar à expressão de genes envolvidos com a resposta imune/inflamatória, como o *LSP1*. A alta expressão do gene *LSP1* resulta no recrutamento e na passagem dos leucócitos através do endotélio para sítios específicos como a HPB. A expressão do *LSP1* em células endoteliais também contribui na formação de *gaps* no endotélio para facilitar a passagem desses leucócitos.

O gene *RNASEL* também está envolvido com a resposta imunológica. A via biológica na qual este gene participa no câncer de próstata ainda não está esclarecida, mas há trabalhos que sugerem que hormônios esteróides podem influenciar no processo de carcinogênese e o estímulo de andrógeno pode ativar a expressão de genes da família dos interferons (REBBECK et al., 2008). Os interferons, por sua vez, ativam a via da RNAse L que desempenhará suas atividades antiproliferativa e proapoptótica (SILVERMAN, 2003) na tentativa de conter o câncer, e haverá um conseqüente aumento na sua expressão. Fatos esses que suportariam os resultados encontrados no nosso trabalho. Apesar do papel dos genes *LSP1* e *RNASEL* na biologia do CaP ainda serem desconhecidos, essa pode ser uma hipótese para explicar os altos níveis de expressão desses genes.

6 CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato da aplicação destes dois genes no diagnóstico do câncer de próstata com detecção no sangue periférico, e também é a primeira vez que se usa dois genes com aplicações contrastantes, sendo que o *LSP1* detecta principalmente o HPB e o *RNASEL* detecta o câncer. Quando juntos, esses dois marcadores têm a capacidade de discriminar os casos de câncer de próstata com 96% de especificidade. Esses biomarcadores demonstraram excelente sensibilidade e acurácia, sendo que o RNASEL demonstrou melhor desempenho. Contudo, o teste duplo-marcador forneceu uma acurácia ainda melhor que os testes individuais. Os excelentes resultados levam-nos a sugerir o uso concomitante de ambos os genes na prática clínica como uma ferramenta adicional ao PSA sérico no diagnóstico diferencial do câncer de próstata, uma vez que, trata-se de um teste não invasivo e muito específico. Além disso, o teste duplo-marcador pode servir para o monitoramento de pacientes acima dos 50 anos de idade que, comumente, possuem algum grau de HPB. Assim, este teste pode contribuir para diminuição do número biópsias negativas que se tornam desnecessárias e trazem grande desconforto aos pacientes. Como se trata do primeiro estudo que avalia esses biomarcadores, outros estudos de corte devem ser conduzidos para avaliar seu real potencial em outras populações.

7 REFERÊNCIAS BIOBLIOGRÁFICAS

AKOBENG, A.K. **Understanding diagnostic tests 3: receiver operating characteristics curves.** *Acta Paediatr*, Manchester, v. 96, p. 644-647, Dez. 2006.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR**, Foster City, Califórnia, 2004.

BAI, V.U.; KASEB, A.; TEJWANI, S. et al. **Identification of prostate cancer mRNA markers by average differential expression and their detection in biopsies, blood, and urine**. *PNAS*, Boston, v. 104, n. 13, p. 2343-2348, Fev. 2007.

BETTOUN, D.J.; SCAFONAS, A.; RUTLEDGE, S.J. et al. **Interaction between the androgen receptor and RNAse L mediates a cross-talk between the interferon and androgen signaling pathways**. *J Biol Chem.*, v. 280, n. 47, p. 38898-38901, Nov. 2005

BOSTWICK, D. G. Prostatic intraepithelial neoplasia. In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. **Textbook of prostate cancer: pathology, diagnosis and treatment.** Londres: M. Dunitz Ltda, 1996, 35-50 p.

BURNS, M.J.; NIXON, G.J.; FOY, C.A. et al. **Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves**. *BMC Biotechnol.*, Teddington, v 5, n. 31, p. 1-13, Dez. 2005.

BUSTIN, S.A. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J Mol Endocrinol***,** v. 25, p. 169-193, 2000.

CARTER, H.B.; FERRUCCI, L.; KETTERMANN, A. eta l. **Detection of life-threatening prostate cancer with prostate-specific antigen velocity during a window of curability**. *J Natl Cancer Inst.*, Baltimore, v. 98, n. 21, p. 1521-1527, Feb. 2006

CASEY, G.; NEVILLE, P.J.; PLUMMER, S.J. et al. **RNASEL Arg462Gln variants is implicated in up to 13% of prostate cancer cases**. *Nat Genet*., Cleveland, v 32, n , p. 581-583, Nov. 2002.

CATALONA, W.J.; SMITH, D.S.; ORNSTEIN, D.K., et al. **Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/ml and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements.** *JAMA*, Washington, v. 277, n. 18, p. 1452-1457, Maio 1997

CATALONA, W.J.; ANTENOR, J.A.; ROEHL, K.A. et al. **Screening for prostate cancer in high risk populations.** *J Urol.*, Saint Louis, v. 168, n. 5, p. 1980-1984, Nov. 2002.

CATALONA, W.J.; BARTSCH, G.; RITTENHOUSE, H.G.et al. **Serum proprostate specific antigen preferentially detects aggressive prostate cancers in men with 2 a 4 ng/ml prostate specific antigen**. *J. Urol*.,San Diego, v. 171, n. 6, p. 2239-2244, Jun. 2004a.

CATALONA, W.J. **Prostate cancer screening.** *Br J Urol***,** v. 94, n. 7, p. 964-966, 2004b.

CARPTEN, J.; NUPPONEN, N.; ISAAC, R. S. et al. **Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1.** *Nat Genet*, Maryland, v. 30, p. 181-184 , Jan. 2002

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. **Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**. *Anal Biochem*. Cincinnati, v. 162, n. 1, p. 156 -159, Abril 1987

CUPP, M.R.; OESTERLING, J.E. **Prostate-specific antigen, digital rectal examination, and transrectal ultrasonography: Their roles in diagnosing early prostate cancer**. *Mayo Clin Proc.*, Rochester, v. 68, n. 3, p. 297-306, Mar. 1993.

D'AMICO, A.V.; CHEN, M.H.; ROEHL, K.A. et al. **Preoperative PSA velocity and risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy**. *N Engl J Med.*, Boston, v. 351, n. 2, p. 125-135, Jul. 2004.

EASTON, D.F.; POOLEY, K.A.; DUNNING, A.M. et al. **Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci**. *Nature*., Cambridge, v. 447, n. 7148, p. 1087-1093, Jun. 2007.

FILLELA, X.; TRUAN, D.; ALCOVER, J. et al. **Comparison of several combinations of free, complexed, na total PSA in the diagnosis of prostate cancer in patients with urologic symptoms**. *Urol.*, Barcelona, v. 63, n. 6, p. 1100-1104, Jun. 2004.

GERBER, G.S.; THOMPSON, I.M.; THISTED, R. et al. **Disease-specific survival following routine prostate cancer screening by digital rectal examination**. *JAMA*, Chicago, v 269, n 1, p. 61-64, Jan. 1993.

GREGORIO, E.P.; GRANDO, J.P.; SAQUETI, E.E. et al. **Comparison between PSA Density, Free PSA percentage and PSA Density in the transition zone in the detection of prostate cancer in patients with serum PSA between 4 and 10 ng/ml**. *Int Braz J Urol*., Londrina, v 33, n 2, p. 151-160. Mar-Abr. 2007.

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, 51-74 p.

HARRISON, R.E.; SIKORSKI, B.A.; JONGSTRA, J. **Leukocyte-specific protein 1 targets the ERK/MAP kinase scaffold protein KSR and MEK1 and ERK2 to the actin cytoskeleton**. *J Cell Sci*. Toronto, v 117, n 10, p.2151-2157, Abr. 2004.

HIGASHIHARA, E.; NUTAHARA, K.; KOJIMA, M. et al. **Significance of free prostate-specific antigen and gammaseminoprotein in the screening of prostate cancer**. *Prostate suppl.*, Tokyo, v. 7, p. 40-47, Dez. 1996.

HUANG, C.K.; ZHAN, L.; AI Y. et al. LSP1 **is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils**. *J Biol Chem*. Farmington, v 272, n 1, p. 17-19, jan. 1997.

HUANG, D.; CASALE, G.P.; TIAN, J. et al. **Quantitative fluorescence imaging analysis for cancer biomarker discovery: application to ß-catenin in archived prostate specimens**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, Omaha, v. 16, n 7, p. 1371-1381, Jul. 2007.

HUGHES, C.; MURPHY, A.; MARTIN, C. et al. **Molecular Pathology of prostate cancer**. *J Clin Pathol.*, Irlanda, v 58, p. 673-684, Fev. 2005.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. ***Estimativa 2008***. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/. Acesso em: 22/06/2008.

JARMULOWICZ, M. R. The role of pathology in biopsy, diagnosis and management of prostate cancer**.** In: KAISARY, A. V.; MURPHY, G. P.; DENIS, L.; GRIFFITHS, K. **Textbook of prostate cancer: pathology, diagnosis and treatment**. Londres: M. Dunitz, 1999, 16-33 p.

JONGSTRA, J.; TIDMARSH, G. F., JONGSTRA-BILEN, J. et al. "**A new lymphocyte-specific gene which encodes a putative Ca2+-binding protein is not expressed in transformed T lymphocyte lines."** *J Immunol*, Ontario, v. 141, n. 11, p. 3999-4004, 1988.

JONGSTRA-BILEN, J.; JANMEY, P. A.; HARTWIG, J. H. et al**. "The lymphocyte-specific protein LSP1 binds to F-actin and to the cytoskeleton through its COOH-terminal basic domain**."*J Cell Bio*, Ontario, v. 118, n. 6, p. 1443-1453, Set.1992.

JONGSTRA-BILEN, J.; WIELOWIEYSKI, A.; MISENER, V. L. et al. **LSP1 regulates anti-IgM induced apoptosis in WEHI-231 cells and normal immature B-cells**. *Mol Immunol.*, Ontario, v. 6, n. 36, p. 349-359, Abr.1999.

JONGSTRA-BILEN, J.; MISENER, V. L.; WANG, C. et al. **LSP1 modulates leukocyte populations in resting and inflamed peritoneum**. *Blood*, Ontario, v. 5, n. 96, p. 1827-1835, Set. 2000.

KADIYALA, R.K.; McINTYRE, B.W.; KRENSKY, A.M. **Molecular cloning and characterization of WP34, a phosphorylated human lymphocyte differentiation and activation antigen**. *Eur J Immunol.*, Stanford, v 20, n 11, p. 2417-2423, Nov. 1990

KHAN, M.A.; PARTIN, A.W.; RITTENHOUSE, H.G. et al. **Evaluation of proprostate specific antigen for early detection of prostate cancer in men with a total prostate specific antigen range of 4.0 to 10.0 ng/ml**. *J Urol.*, Baltimore, v. 170, n. 3, p. 723-726, Set. 2003.

KELLOFF, J.G.; COFFEY, S.D.; CHABNER, A.B. et al. **Prostate-Specific Antigen Doubling Time as a Surrogate Marker for Evaluation of Oncologic Drugs to Treat Prostate Cancer**. *Clin Cancer Res.*, Bethesda, v. 10, n. 11, p. 3927-3933, Jun. 2004.

KLEIN, D.P.; JONGSTRA-BILEN, J.; OGRYZLO, K. et al. **Lymphocyte-specific Ca^{2+}-binding protein LSP1 is associated with the cytoplasmic face of the plasma membrane**. *Mol Cell Biol.*, Ontario, v 9, n 7, p. 3043-3048, Jul. 1989.

KRUMHOLTZ, J. S.; CARVALHAL, G. F. et al. **"Prostate specific antigen cutoff of 2.6 ng/ml for prostate cancer screening is associated with favorable pathologic tumor features."** *Urology***,** Saint Louis, v. 60, n. 3, p. 469-474, Set. 2002.

KRUGER, S.; SILBER, A. S.; ENGEL, C.; et al. **Arg462Gln sequence variation in the prostate-cancer susceptibility gene *RNASEL* and age of onset of hereditary non-polyposis colorectal cancer: a case-control study.** *Lancet Oncol*, Dresden, v. 6, n. 8, p. 566-572, Ago. 2005.

LANDERS, K.A.; BURGER, M.J.; TEBAY, M.A.; et al. **Use of multiple biomarkers for a molecular diagnosis of prostate cancer.** *Int J Cancer*., Queensland, v. 114, n. 6, p. 950-956, Maio 2005.

LABRIE F., DUPONT A., SUBURU R., et al. **Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate cancer**. *J Urol.*, Quebec, v 147, n 3, p. 846-851, Mar. 1992.

LENGYEL, P. **Tumor-suppressor genes: News about the interferon connection.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, New Haven, v. 90, n. 13, p. 5893 – 5895, Jul. 1993.

LI, H; TAI, B. C. **RNASEL gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis**. *Clin Cancer Res.*, Singapore, v. 12, n. 19, p. 5713-5719, 2006.

LIU, L.; CARA D. C.; KAUR; J.; et al. **"LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration**." *J Exp Med*, Calgary, v. 201, n. 3, p. 409-18, Fev. 2005.

LIU, A.J.; FURUSATO, B.; RAVINDRANATH, L.; et al. **Quantitative analysis of a panel of gene expression in prostate cancer – with emphasis on NPY expression analysis**. *J Zhejiang Univ Sci B.*,Beijing, v. 8, n. 12, p. 853-859, Dez. 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTEGEN, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}{}_{T}$ method**. *Methods*, Washington, v. 25, p. 402-408, 2001

MARAFIOTI, T.; JABRI, L.; PULFORD, K.; BROUSSET, P.; MASON D. Y.; DELSOL, G. **Leucocyte-specific protein (LSP1) in malignant lymphoma and Hodgkin's disease**. *Br J Haematol.*, Oxford, v. 120, n 4, p. 671-678, Fev. 2003.

MAKAROV, D.V.; HUMPHREYS, E.B.; MANGOLD, L.A.; et al. **Pathological outcomes and biochemical progression in men with T1c prostate cancer undergoing radical prostatectomy with prostate specific antigen 2.6 to 4.0 vs 4.1 to 6.0 ng/ml.** *J. Urol.*, Baltimore, v. 176, n. 2, p. 554–558, Ago. 2006.

MAKAROV, D.V.; LOEB, S.; GETZENBERG, R. H. et al. **Biomarkers for prostate cancer**, *Annu. Rev Med.*, Baltimore ; v. 60, p. 139-151, Fev. 2009.

MAY, W.; KORENBERG, J.R.; CHEN, X.N. et al. **Human Lymphocyte-specific pp52 gene is a member of a highly conserved dispersed family**. *Genomics*., Los Angeles, v 15, n 3, p. 515-520, Mar. 1993.

MAZZUCCHELLI, R.; COLANZI, P. POMANTE, R. et al. **Prostate tissue and serum markers.** *Adv Clin Pathol*., Torrette, v. 4, n. 3, p. 111–120, Jul. 2000.

MISTRY, K.; CABLE, G. **Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening test for prostate carcinoma.** *J Am Board Fam Pract.*, v. 16, n. 2, p. 95-101, Abr. 2003.

NEVES, A.F.; ARAÚJO, T.G.; BIASE, W.K.F.S; et al. **Combined analysis of multiple mRNA markers by RT-PCR assay for prostate cancer diagnosis**. *Clin Biochem*. Canadá, v. 41, n. 14-15, p. 1191-1198, Out. 2008.

OLIVEIRA JR., W.P.; OLIVEIRA, D.D.J.; MEOLA, J.; et al. **Gene expression in tumors and hyperplasic prostatic tissues by differential display-RT-PCR**. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2003.

OUYANG, B.; BRACKEN, B.; BURKE, B. **A duplex quantitative polymerase chain reaction assay based on quantification of a-Methylacyl-CoA racemase transcripts and prostate cancer antigen 3 in urine sediments improved diagnostic accuracy for prostate cancer**. *J Urol*.,Cincinnati, v. 18, n. 6, p. 12508, Jun. 2009.

PETERS, I. R.; HELPS, C. R.; HALL, E. J.; et al. **Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design**. *J Immunol Methods*, Bristol, v. 286, n. 1-2, p. 203-217. Mar. 2004.

POEL VAN DER, H.G. **Molecular markers in the diagnosis of prostate cancer**. *Oncol Hematol.*, Amsterdam, v 61, p. 104-139, jul. 2007.

REBBECK, T. R.; RENNERT, H.; WALKER, A.H., et al**. Joint effects of inflammation and androgen metabolism on prostate cancer severity.** *Int. J. Cancer*. Philadelphia, v. 123, p. 1385-1389, Jun. 2008.

RHODES, D.R.; BARRETTE, T.R.; RUBIN, M.A., et al. **Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer**. *Cancer Res., Michigan,* v 62, p. 4427-4433, Ago. 2002.

ROKMAN, A.; IKONEN, T.; SEPPALA, E. H.; et al. **Germline Alterations of the *RNASEL* Gene, a Candidate *HPC1* Gene at 1q25, in Patients and Families with Prostate Cancer**. *Am. J. Hum. Genet*, Finland, v. 70, n. 5, p. 1299-1304, Maio 2002.

SABA, K. F. **Análise da expressão do gene LSP1 no diagnóstico da hiperplasia prostática benigna e do câncer de próstata.** Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

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.

SCHAMHART, D. H.; MAIAZZA, R.; KURTH, K.H. **Identification of circulating prostate cancer cells: a challenge to the clinical implementation of molecular biology.** *Int J Oncol.,* Amsterdam, v. 26, n. 3, p.565–577, Mar. 2005.

SHAPPELL, S. B**. Clinical utility of prostate carcinoma molecular diagnostic tests**. *Rev Urol.*, Dallas, v. 10, n. 1, p. 44-69, 2008.

SMITH, A. L.; GANESH, L.; LEUNG, K.; et al. **Leukocyte-specific protein 1 interacts with DC-SIGN and mediates transport of HIV to the proteasome in dendritic cells**. *J Exp Med.*, Bethesda, v. 204, n. 2, p. 421-430, Fev. 2007.

SILVERMAN, R. H. **Implications for RNAse L in prostate cancer biology**. Biochem. Cleveland, v. 42, n. 7, p. 1805-1812, Fev. 2003.

SROUGI, M.; CURY, J. Hiperplasia benigna da próstata. In.: SCHIR, N.; SROUGI, M. **Nefrologia, Urol Clín**. São Paulo: Savier, 1998, cap. 6, 501-506p.

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**. 6º ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992, v. 2, 1159-1221p.

STAMEY, T.A.; CALDWELL, M.; MCNEAL, J.E.; et al. **The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years?** *J Urol*., Stanford, v. 172, n. 4, p. 1297-1301, 2004.

SILVERMAN, R.H. **Implications for RNASE L in prostate cancer biology.** *Biochemistry*., Cleveland, v. 42, n. 7, p.1805-1812, Fev. 2003.

STANGELBERGER, A.; MARGREITER, M.; SEITZ, C. et al. **Prostate cancer screening markers**. *JMHG*, Vienna, v 4, n 3, p. 233-244, Set. 2007.

THOMPSON, I.M.; PAULER, D.K.; GOODMAN, P.J.; et AL. **Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter.** *N Engl J Med*., San Antonio, v. 350, n. 22, p. 2239-46, Maio 2004.

THOMPSON, I. M.; ANKERST, D. P.; CHI, C.; et al. **Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/mL or lower**. *JAMA*, San Antonio, v. 294, n. 1, p. 66-70, jul. 2005.

THOMPSON, I. M.; ANKERST, D. P. **Prostate-specific antigen in the early detection of prostate cancer.** *CMAJ*., San Antonio, v. 176, n. 13, p. 1853-1858, Jun. 2007.

VELDEN, V. H. J. V. D.; HOCHHAUS, A.; CAZZANIGA, G.; et al. **Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects.** *Leukemia*, Netherlands, v 17,n. 6, p. 1013-1034, Jun. 2003.

XIANG, Y.; WANG, Z.; MURAKAMI, J.; et al. **Effects of RNase L Mutations Associated with Prostate Cancer on Apoptosis induced by 2_,5_-Oligoadenylates**. *Cancer Res.*, Cleveland, v. 63, n. 20, p. 6795-6801, Out. 2003.

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. 420p.

WHITTEMORE, A.S.; WU, A.H.; KOLONEL, L.N.; et al. **Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada.** *Am J Epidemiol*, v. 141, n. 8, p.732-740, Abr. 1995.

WIKLUND, F.; JONSSON, B. A.; BROOKES, A. J.; et al. **Genetic Analysis of the *RNASEL* Gene in Hereditary, Familial, and Sporadic Prostate Cancer**. *Clin Cancer Res.*, Umea, v. 10, n. 21, p. 7150–7156, Nov. 2004.

WONG, M. J.; MALAPITAN I. A.; SIKORSKI, B. A.; JONGSTRA J. **A cell-free binding assay maps the LSP1 cytoskeletal binding site to the COOH-terminal 30 amino acids.** *Biochim Biophys Acta*, Toronto, v 1642, n. 1-2, p. 17-24, Set. 2003.

WRIGHT, J.L.; LANGE, P.H. **Newer potential biomarkers in prostate cancer**. *Rev Urol*., Seattle, v. 9, n. 4, p. 207-213, 2007.

WU, Y.; ZHAN, L.; AI, Y. et al. **MAPKAPK2-mediated LSP1 phosphorylation and FMLP-induced neutrophil polarization**. *Biochem Biophys Res Commun*, Hanover, v 358, n 1, p. 170-175, Abr. 2007

Apêndices

Apêndice A

Tabela 4. Seqüência dos primers

Gene	Acesso GenBank	Primer	Sequência (5’ – 3’)	Posição
LSP1	NC_000011	LSPRNAF	**ATACACCCAGGCCATCGAGA**	874-893
		LSPRNAR	**ATGCTGGGCAGCTCTATGGA**	948-929
RNASEL	NC_000001	RNASELRNAF	**TGCCCGAAATGTCCTGTCA**	1547-1565
		RNASELRNAR	**CAGGTGAGCAGCTTTCTTAGAATCTA**	1670-1645
B2M	NC_000015	B2MRNAF	**CCTGCCGTGTGAACCATGT**	356-374
		B2MRNAR	**GCGGCATCTTCAAACCTCC**	449-431
RNASEL	NC_000001	RNASEL1F	**GTGAGCAGACTCTGGAAGCG**	1477-1496
		RNASEL2R	**CAGCCGTCCAAGGTCCTCTA**	1729-1748
B2M	NC_000015	B2M1F	**AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA**	162-182
		B2M2R	**TGTTGATGTTGGATAAGAGAA**	676-696

Anexos

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 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

Anexo II

Protocolo extração de RNA sangue

1-Colocar todo o sangue em tubo falcon (15mL);

2-Centrifugar o sangue por 10 min a 2.500 rpm a 4°C;

3-Transferir o plasma para um microtubo e armazenar a -80°C;

4-Deixar no máximo 2,5mL no tubo. Caso o volume esteja a cima de 2,5mL dividir o total em dois tubos;

5-Adicionar nove partes (11,5mL) de cloreto de amônio e uma parte (1,25mL) de bicarbonato de amônio. Misturar antes de adicionar às células, 5 vezes o volume das hemáceas;

6- Inverter delicadamente para misturar bem;

7-Incubar em gelo por 15 minutos;

8-Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante;

9-Adicionar 1,0mL de solução D (ou 950µL de solução D + 50µL de sarcosiI 10%);

10- Adicionar 8µL de ß-mercaptoetanol;

11- Agitar no vortex para diluir o pellet de células e mergulhar no gelo;

12- Adicionar 100µL de acetato de sódio 2M pH= 4;

13- Adicionar 1,0mL de fenol saturado em água (pH = 4 e 5);

14- Acrescentar 200µL de clorofórmio-álcool isoamílico (49:1, 196µL: 4µL);

15-Vortexar a suspensão por 10 segundos e distribuir a mistura em tubos de 2,0mL (nomear cada tubo). Colocar no gelo por 15 minutos;

16- Centrifugar a amostra por 15 minutos a 12.000g a 4°C;

17- Após centrifugar, transferir no máximo 1,0mL da fase aquosa para cada microtubo de 2mL e adicionar cerca de 750µL de isopropanol gelado e manter a -20ºC (freezer) – Deixar overnight (mínimo 4 horas);

18- Centrifugar a 12.000g por 15 min a 4°C e descartar o álcool com cuidado;

19- Lavar com 1,0mL de Etanol 75% e descartar o sobrenadante;

20- Deixar o RNA secando por 15 minutos;

21- Ressuspender o pellet em cerca de 25µL de água DEPC.

Anexo III

Protocolo extração de RNA tecido

1- Adicionar trizol ao tecido, 100 mg tecido p/ 1 mL trizol – homogenizar
2- Esperar 5 minuots – homogenizar no vórtex.
3- Centrifugar 12000G – 10 minutos – 4ºC
4- Coletar o sobrenadante em tubo novo
5- Adicionar 0,2 mL de clorofórmio p/ 1 mL trizol
6- Agitar 15 segundos e incubar 2 a 3 minutos de 15 a 30ºC
7- Centrifugar 12000G por 15 minutos
8- Coletar sobrenadante em tubo limpo e adicionar 0,5 mL de álcool isopropílico p/ 1 mL de trizol
9- Incubar de 15 a 30ºC por 10 minutos
10- Centrifugar 12000G por 10 minutos
11- Remover sobrenadante
12- Adicionar 1 mL de etanol 75% misturar e centrifugar 7500G 5 minutos, secar o pellet e diluir em 50 µL de água DEPC.

Obs. Todo o material que será utilizado na extração deve ser novo, esterilizado e as luvas devem ser periodicamente trocadas.

This document was created with Win2PDF available at http://www.win2pdf.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo