

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Aline Francielle Damo Souza

**Seleção do Gene de Referência para
Cultura Primária de Células de Carcinoma Prostático**

Porto Alegre
2010

Aline Francielle Damo Souza

**Seleção do Gene de Referência para
Cultura Primária de Células de Carcinoma Prostático**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ilma Simoni Brum da Silva

Co-orientadora: MSc. Gisele Branchini

Porto Alegre
2010

A Deus, em quem estão ocultos todos os
tesouros da sabedoria e da ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu amigo mais fiel, por ter-me dado o dom da Vida, por me amar com amor incondicional, por cuidar de mim e por se importar com cada detalhe da minha vida. Se hoje cheguei até aqui foi porque a Tua mão me sustentou! Obrigada, Senhor! Aos meus pais, Maura e Luiz, por terem me gerado, me amado, cuidado de mim durante todos os meus dias. Mãe, obrigada por todo o amor, carinho, dedicação, suporte, por ter estado sempre presente em todos os momentos, especialmente naqueles em que eu não tinha estrutura para suportar tudo sozinha. À minha avó, Adelinda (*in memoriam*), agradeço por todo o cuidado e carinho que sempre teve e por cada ensinamento que hoje e sempre carregarei comigo. Dinda, tu fostes uma mãe zelosa pra mim, obrigada! Agradeço a todos os meus familiares que sempre me apoiaram e torceram pra que eu pudesse chegar até aqui e aos meus amigos da família de Cristo por todo o amor e suporte.

À minha orientadora, Prof^a Ilma, pela oportunidade de fazer parte como aluna de iniciação científica do grupo de pesquisas do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET), obrigada por todo o suporte pessoal e intelectual durante os dois anos que estive com vocês. À minha mais que co-orientadora Gisele pela amizade, por todo o conhecimento compartilhado, pela confiança que me deste no início, quando eu pouco sabia, por toda a paciência, pelas conversas descontraídas no laboratório, por fazer da minha, a tua responsabilidade também. A todos os colegas do LaBiMET que estive mais perto, Carol, Lolita, Ana Paula, Vanderlei, Gustavo, Vanessa, Patrícia, Aline, Bruna, Tiahgo e Fernanda, obrigada por me acolherem e por contribuírem para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos meus colegas e muito mais do que isso, amigos de todos os dias da faculdade, por poder viver junto com vocês todas as experiências que a graduação me proporcionou. Obrigada Cibele, Luana, Marcus, Gabriel, Taciane e Clévia por enfrentarem junto comigo todos os desafios que surgiram durante esses quatro anos, pela cumplicidade, pela amizade, pelo companheirismo, pelas conversas e risadas, enfim, agradeço por simplesmente estarem presentes! Vou levá-los sempre no meu coração, mesmo que a distância e os rumos nos separem, lembrarei de cada um sempre com o mesmo carinho.

Agradeço a esta universidade pela oportunidade de ensino, pelo incentivo à educação e principalmente à pesquisa, por todo o suporte de infra-estrutura e por toda a contribuição para minha formação pessoal, intelectual e profissional durante o tempo da graduação. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	4
ÍNDICE GERAL	6
RESUMO.....	7
INTRODUÇÃO	8
<i>Câncer de Próstata (CaP)</i>	8
<i>Perfil de expressão gênica no Câncer de Próstata</i>	9
<i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR) e diferentes métodos de normalização de dados.....</i>	11
<i>Genes de referência, Housekeeping Genes, genes constitutivos ou genes normalizadores</i>	13
<i>Descrição dos genes candidatos a normalizadores</i>	16
ARTIGO CIENTÍFICO	18
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	63
BIBLIOGRAFIA ADICIONAL	64

RESUMO

Sabe-se hoje que o padrão de expressão dos nossos genes pode fornecer informações valiosíssimas sobre como o nosso organismo está respondendo aos estímulos ambientais externos e a eventuais patogenias. Muito mais do que isso, a determinação de um padrão de expressão gênica pode antecipar o diagnóstico de uma doença, aumentando assim as chances de cura e pode melhorar o prognóstico dos pacientes. Assim sendo, muitos pesquisadores têm buscado identificar o padrão de expressão gênica do Câncer de Próstata, pela técnica de RT-PCR em tempo real, com o estudo de genes alvo possivelmente envolvidos com a carcinogênese. Para que os resultados do perfil de expressão sejam confiáveis é necessário um passo de normalização dos dados extraídos desse sistema. Genes normalizadores também conhecidos como *Housekeeping Genes* são tidos como padrão-ouro para normalização de dados de RT-PCR. Como não existe um gene normalizador universal, este deve ser validado para o tipo de amostra a ser estudada. Ainda não há estudos publicados que tenham avaliado e validado o melhor gene normalizador para estudos do Câncer de Próstata em culturas celulares prostáticas. Assim, este estudo buscou avaliar e validar, dentre cinco candidatos, o gene mais adequado para a normalização de dados de expressão gênica em cultura primária de células de carcinoma prostático. Com o auxílio de análises feitas por *softwares* específicos para busca de genes normalizadores, este trabalho apresenta o gene *Aminolevulinato delta-sintase 1* como sendo o mais adequado gene normalizador, dentre os cinco genes analisados, para estudos de expressão gênica do Câncer de Próstata em culturas primárias de células de carcinoma prostático.

INTRODUÇÃO

Câncer de Próstata (CaP)

A próstata é uma glândula exócrina do sistema reprodutor masculino, regulada por androgênios, que circunda a porção uretral logo abaixo da bexiga. Além da importância na proteção do trato urinário contra infecções, este órgão contribui para a fertilidade, produzindo e armazenando um fluido incolor, ligeiramente alcalino que corresponde a cerca de 30-40% do fluido seminal e que é fonte de grande parte dos constituintes não-celulares do mesmo [41, 42]. Doenças prostáticas como lesões inflamatórias crônicas (prostatites), hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) são extremamente comuns em homens de mais idade [42], sendo a HPB e o CaP as formas clinicamente mais importantes do crescimento anormal da próstata [43]. Noventa por cento dos homens desenvolvem HPB ou CaP entre a quarta e a nona década de vida [42], no entanto, o câncer de próstata é diagnosticado em muito poucos homens com menos de 50 anos (menos de 1% dos pacientes) [44]. Entre todos os tipos de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que atinge três quartos da população masculina acima de 65 anos [44, 45].

Devido a sua magnitude no quadro de morbimortalidade em homens, o câncer de próstata já representa um problema de Saúde Pública. Em valores absolutos, é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. No Brasil, nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, o CaP é o mais incidente entre os homens, superando inclusive o câncer de pele não-melanoma. O câncer de próstata também ocupa a primeira posição em incidência no estado do Rio Grande do Sul, apesar de na região

Sul esta neoplasia ser a segunda mais comum entre a população masculina. Em 2008 o número de mortes causadas pela doença chegou a 11.955. O número de casos novos de câncer de próstata estimado para o Brasil no ano de 2010 foi de 52.350, valor este que vem crescendo a cada ano. Estes valores correspondem a um risco estimado de 54 casos novos a cada 100.000 homens. O aumento observado nas taxas de incidência no Brasil pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos (exames), pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida da população [45].

Perfil de expressão gênica no Câncer de Próstata

Apesar de o nosso conhecimento sobre o contexto hormonal, nutricional e ambiental do desenvolvimento do câncer de próstata ter avançado muito graças a estudos que vêm sendo desenvolvidos na área, muito permanece por ser entendido acerca da patogênese dessa doença. O câncer prostático é uma doença biologicamente heterogênea com considerável variação na agressividade clínica, sendo que o seu comportamento pode ser considerado um resultado direto ou indireto de alterações anormais na expressão gênica de células prostáticas epiteliais [2]. Tais mudanças no padrão de expressão gênica acarretam implicações determinantes no funcionamento das células, do tecido e do organismo como um todo. Essas mudanças podem estar, por exemplo, relacionadas ao desenvolvimento da doença, à sua manifestação e à morte celular [46]. No entanto, os eventos moleculares responsáveis pela progressão do CaP de uma doença assintomática, sem grandes complicações para a vida do paciente, para uma doença que o coloque em risco ainda não estão bem esclarecidos [2].

Dessa forma, muitos autores têm utilizado o perfil de expressão gênica de tumores prostáticos a fim de detectar alterações moleculares que possam estar relacionadas com o desenvolvimento tumoral [3-6]. Todos estes trabalhos buscam identificar genes alvo que estejam com seu perfil de expressão alterado nesta condição patológica. Tais genes podem ajudar na melhor compreensão de determinantes moleculares correlacionados com o estadiamento do tumor em pacientes acometidos pela doença e na antecipação do seu comportamento clínico. A determinação de um perfil de expressão gênica prostática contribuiria para o melhor prognóstico desses pacientes, para a melhor estratificação do tumor, permitindo sua classificação em clinicamente significativa ou não, no desenvolvimento de ferramentas de detecção precoce da patogenia e na identificação de futuros alvos de intervenção terapêutica [2].

A avaliação das alterações na expressão do RNA mensageiro (mRNA) é comumente utilizada para analisar a resposta transcricional de genes a estímulos externos, bem como a resposta transcricional dos mesmos em uma condição patológica. Muitas são as técnicas disponíveis no universo científico para análise quantitativa da expressão diferencial de transcritos de mRNA a partir de um tecido ou de linhagens celulares. Entre as mais conhecidas estão a tecnologia do macro e do microarranjo de DNA, o sequenciamento de *ESTs* (*Expressed Sequence Tags*), *SAGE* (*Serial Analysis of Gene Expression*), *Northern Blot*, Reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa (RT-PCR) convencional e em tempo real.

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR) e diferentes métodos de normalização de dados

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR), é uma técnica já bem estabelecida, de simples realização, sendo largamente utilizada em estudos de expressão gênica uma vez que possibilita uma rápida, sensível e acurada avaliação dos níveis de mRNA em amostras biológicas [7]. A partir de uma quantidade mínima de amostra, moléculas de DNA ou de cDNA são amplificadas enzimaticamente milhares ou milhões de vezes de forma bastante rápida. Os métodos convencionais de quantificação de RNA vêm sendo gradativamente substituídos por esta técnica, a qual tem mostrado representar com alta confiabilidade o padrão de expressão gênica de um determinado grupo de amostras ou de um conjunto de diferentes amostras quando avaliadas concomitantemente.

Por ser um método constituído de múltiplos passos de realização, desde a obtenção das amostras até a análise dos dados de amplificação, existe uma variabilidade inerente nessa técnica, o que poderia levar a uma distorção dos valores reais de expressão caso os dados extraídos desse sistema não sejam devidamente corrigidos. Desse modo, faz-se necessária uma estratégia de normalização adequada para informações quantitativas geradas a partir da amplificação do material genético, com o objetivo de permitir comparações acuradas entre as amostras. Sem uma normalização apropriada, o perfil de expressão de um gene alvo pode ser erroneamente interpretado [8]. Dentre os fatores geradores de variações na técnica estão: a própria variabilidade inerente do RNA, os protocolos de extração que podem

co-purificar inibidores e as discrepâncias de eficiência entre as amostras durante o processo de transcrição reversa e da PCR que comprometam as análises [22].

Muitas estratégias têm sido propostas para a normalização de dados obtidos pela técnica de qRT-PCR, as quais vão desde a escolha de quantidades amostrais semelhantes até o uso de um gene de referência. A normalização pelo método de padronização do tamanho amostral (peso e tamanho do tecido) é o primeiro passo para reduzir erros experimentais. No entanto, pode ser difícil garantir que diferentes amostras, ainda que possuam mesmo peso e tamanho, contenham a mesma quantidade de células, por exemplo. Embora sendo um passo importante de normalização, esta ferramenta por si só não é suficiente. As avaliações quantitativas e qualitativas precisas do RNA antes do passo de transcrição reversa também são essenciais, uma vez que garantem quantidades semelhantes de RNA que será transcrito em DNA complementar (cDNA) entre as amostras. Entretanto, este método possui a desvantagem de não controlar as variações inerentes das reações posteriores de transcrição reversa ou de PCR. Outra sugestão é o uso do DNA genômico, já que, em teoria, todas as células do organismo possuiriam aproximadamente a mesma quantidade de material genômico e que, com o uso dessa ferramenta, o passo de transcrição reversa não se faria mais necessário para a amplificação via qPCR. Porém, em células tumorais, alvo deste estudo, um determinado locus pode conter um número maior de cópias quando comparadas a células não-replicativas. Além disso, os procedimentos de extração de RNA geralmente não são desenhados para co-purificar o DNA, causando variação no rendimento de DNA genômico extraído das amostras. Por fim, a normalização por gene de referência é um método simples e popular para controle interno de erros gerados durante a reação de PCR em tempo real [7]. Uma quantificação acurada de

um gene de referência verdadeiro permite a normalização das diferenças na quantidade de RNA ou de cDNA amplificado em amostras individuais geradas por: i) diferentes quantidades de material inicial, ii) variações na qualidade desse material e iii) diferenças na extração do RNA ou na síntese de cDNA, uma vez que o gene de referência é exposto aos mesmos passos experimentais que o gene de interesse. Além disso, o procedimento é simplificado uma vez que tanto o gene de interesse quanto o gene normalizador são mensurados utilizando-se a mesma técnica [7]. Segundo de Jong e colaboradores, até o momento, o uso de genes de referência é o padrão-ouro para normalizar as frações de mRNA [9].

Housekeeping Genes, genes de referência, genes constitutivos ou genes normalizadores

Housekeeping Genes (HKGs), também chamados genes de referência, constitutivos, normalizadores ou de manutenção, por definição, mantêm as funções metabólicas básicas das células e fornecem suporte ao longo do ciclo celular [10]. Esses genes são expressos em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do seu desenvolvimento, não sofrendo alteração pelos tratamentos experimentais. Para ser usado como referência, um gene deve apresentar estabilidade, expressão não-regulada no tipo de amostra analisado e deve ter seu nível de expressão semelhante aos níveis de transcritos do(s) gene(s) em estudo [34]. Genes constitutivos ou *HKGs* satisfazem esses critérios e são utilizados com o propósito de normalização em muitos estudos de expressão [12].

Estes genes regulam funções celulares básicas e estão presentes, se não em todas, na maioria das células, codificando, por exemplo, componentes do citoesqueleto (*β -actina*); do complexo principal de histocompatibilidade (*β -2-*

microglobulina); da via glicolítica (*gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*, *fosfogliceroquinase 1*); da recuperação metabólica de nucleotídeos (*hipoxantina ribosiltransferase*); do dobramento de proteínas (*ciclofilina*) ou da síntese de subunidades ribossomais (*RNAr*).

Estudos de expressão gênica que fazem uso de *Housekeeping Genes* para normalização dos dados de expressão utilizam, em sua grande maioria, os genes β -*actina* (*ACTB*), *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*), β -*glicuronidase* (*GUSB*), *hypoxantina-guanina fosforibosil transferase 1* (*HPRT1*) e a subunidade menor do ribossomo (*18S*). No entanto, muitas publicações têm demonstrado que β -*actina* [47] e *GAPDH* [48-51] variam consideravelmente e conseqüentemente são referências inadequadas para a análise de transcritos de RNA [52]. De acordo com Schmittgen e colaboradores, preferencialmente, os níveis de expressão do gene a ser utilizado como normalizador devem ser similares aos do gene de interesse [53]. Assim, o uso de transcritos de RNAs ribossômicos (rRNAs) para gene de referência, como *18S* e *28S*, fica comprometido, já que a expressão desses genes se dá em maior quantidade que a dos genes precursores de mRNA (2-3% do RNA total), os quais são alvos usuais em estudos de expressão. Além disso, ficou evidenciado que a transcrição de rRNAs é afetada por fatores biológicos e por drogas [54-56]. Outra desvantagem no seu uso é a ausência de rRNAs em amostras purificadas de cDNA sintetizadas exclusivamente a partir de mRNA utilizando-se um oligonucleotídeo complementar à cauda de poli-A, característica do mRNA [32].

Estes fatos evidenciam um procedimento bastante comum nos trabalhos científicos de hoje, que mesmo sabendo-se que variações na expressão de genes normalizadores podem comprometer o passo de normalização dos dados de expressão de um gene alvo [8, 22, 32, 35], os genes de referência comumente aceitos

são frequentemente utilizados sem o processo devido de validação sob as condições experimentais a que serão submetidas as amostras. A normalização imprecisa leva a uma quantificação inadequada nos níveis de mRNA e a conclusões precipitadas sobre a expressão gênica [21]. As evidências hoje disponíveis revelam que não existe um gene normalizador universal [7], sendo que o nível de transcrição desses genes pode variar entre diferentes tipos de tecidos (normal e patológico) e sob diferentes condições de tratamento [12]. Dessa forma, os genes de referência endógenos devem ser escolhidos levando-se em conta o tipo de tecido a ser analisado e as condições experimentais específicas aplicadas às amostras.

Não existem estudos específicos publicados com cultura celular de tumores prostáticos que tenham avaliado e validado o melhor gene normalizador para estudos de expressão do CaP. Os estudos de expressão gênica já realizados com tecido prostático e com linhagem celular utilizam, na sua maioria, os genes *GAPDH* (*gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*) [23], *β-actina* [2, 24, 25], *18S* [26] e *B2M* (*beta-2-microglobulina*) [27]. No entanto, trabalhos têm mostrado variações em alguns desses genes em tecidos prostáticos [28-30], sugerindo que os mesmos são inapropriados para uso como gene de referência em estudos de expressão gênica para essas amostras.

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar controles endógenos apropriados para a normalização em estudos de expressão gênica por RT-PCR em tempo real em cultura primária de células de carcinoma prostático. Para este propósito foram selecionados, com base na literatura, os genes que codificam as proteínas *Aminolevulinato delta-sintase 1 (ALAS1)*, *Beta-2-microglobulina (B2M)*, *Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1)*, *Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta (YWHAZ)* e *Complexo succinato*

desidrogenase, subunidade A, flavoproteína (Fp) (SHDA), todos estes já previamente avaliados em outros tecidos ou em diferentes tipos amostrais por outros trabalhos científicos [21, 31].

Descrição dos genes candidatos a normalizadores

ALAS 1

O gene *ALAS1* [*Homo sapiens*], localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p21.1), codifica a enzima de nome oficial *Aminolevulinato delta-sintase 1* (nomenclatura oficial atribuída pelo HGNC [57]), a qual catalisa a reação de condensação do aminoácido glicina com a succinil-coenzima A para formar o ácido delta-aminolevulínico. Esta enzima participa da via de biossíntese do grupamento heme presente na hemoglobina. Existem duas isoenzimas aminolevulinato delta-sintase tecido-específicas: uma enzima constitutiva (*housekeeping enzyme*) codificada pelo gene *ALAS1* e uma enzima eritróide codificada pelo gene *ALAS2* [58].

HPRT1

Também conhecido como *HPRT*, *HGPRT* ou *HPRT1*, o gene da *Hipoxantina fosforibosiltransferase 1* [*Homo sapiens*], localizado no braço longo do cromossomo X (Xq26.1), codifica uma proteína da classe das transferases, a qual catalisa a conversão de hipoxantina em inosina monofosfato e guanossina monofosfato por transferência do grupo 5-fosforibosil a partir do 5-fosforibosil 1-pirofosfato. Esta enzima desempenha papel central na geração de nucleotídeos (purinas) por meio da via de recuperação de purinas. Mutações neste gene resultam na Síndrome de *Lesch-Nyhan* ou na doença da Gota [59].

B2M

O gene da *Beta-2-microglobulina* [*Homo sapiens*], de localização cromossômica 15q21-q22.2, codifica uma proteína sérica que se encontra associada por ligações não-covalentes à cadeia pesada do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de Classe I na superfície de quase todas as células nucleadas. Uma mutação no gene que codifica essa proteína resulta em hipoproteinemia hipercatabólica [60].

YWHAZ

Este gene, localizado no braço longo do cromossomo 8 (8q23.1), codifica a *Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta* [*Homo sapiens*] (nomenclatura oficial – HGNC [57]), a qual pertence à família 14-3-3 de proteínas mediadoras do sinal de transdução por ligação a proteínas que contenham fosfoserina na sua molécula. A interação dessas proteínas com proteínas *IRS1* sugere seu papel na regulação da sensibilidade à insulina [61].

SDHA

O gene do *Complexo succinato desidrogenase, subunidade A (SDHA)* [*Homo sapiens*], de localização cromossômica 5p15, codifica uma flavoproteína, a qual participa do Ciclo de Krebs e da Cadeia Respiratória como principal subunidade catalítica da succinato-ubiquinona oxidoreductase (subunidade A). Este é um complexo da cadeia respiratória mitocondrial composto por quatro subunidades codificadas pelo núcleo, localizado no interior da membrana mitocondrial. Mutações neste gene estão associadas à Síndrome de *Leigh*, uma forma de deficiência da cadeia respiratória mitocondrial [62].

**TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE
ARTIGO CIENTÍFICO**

Com intenção de publicação na revista eletrônica *BioMed Central
Molecular Biology*, este artigo está formatado nos moldes exigidos pela
revista.

Seleção do Gene de Referência para Cultura Primária de Células de Carcinoma Prostático

Aline Francielle Damo Souza^{1,2§}, Gisele Branchini^{1,2}, Brasil Silva Neto³, Milton Berger³, Ilma Simoni Brum da Silva^{1,2}

1- Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia – UFRGS, Porto Alegre, RS - BR;

2- Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisas – HCPA, Porto Alegre, RS - BR;

3- Serviço de Urologia – HCPA, Porto Alegre, RS - BR;

§ Autor correspondente

Endereço de e-mail: alinefds2@hotmail.com

Resumo

Introdução

Genes de referência, geralmente referidos como *housekeeping genes*, são frequentemente utilizados para normalizar os níveis de mRNA entre diferentes amostras nas reações de qPCR. A seleção de genes de referência é crítica para estudos de expressão gênica uma vez que a expressão desses genes pode variar entre tecidos ou células e pode sofrer variações em virtude de tratamentos experimentais. O objetivo deste estudo foi a avaliação sistemática de cinco candidatos a gene normalizador, *Aminolevulinato sintase 1 (ALAS1)*, *Beta-2-microglobulina (B2M)*, *Hipoxantina fosforibosil-transferase 1 (HPRT1)*, *Complexo succinato desidrogenase, subunidade A (SDHA)* e *Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta (YWHAZ)*, com características funcionais distintas, para estudos de expressão gênica em cultura primária de células de carcinoma prostático.

Resultados

Em virtude da elevada variabilidade do gene *SDHA*, já verificada no resultado de amplificação das amostras em estudo, este foi excluído das análises posteriores. A estabilidade dos demais candidatos a gene normalizador foi analisada usando os softwares *geNorm* e *NormFinder*. A análise realizada por ambos os programas foi bastante semelhante e indicou o gene *ALAS1* como sendo o mais estável em todas as amostras deste estudo.

Conclusão

Para o propósito de normalização em estudos de perfil de expressão gênica o gene *ALAS1* é recomendado como o gene de referência mais adequado em cultura primária de células de carcinoma prostático.

Introdução

O câncer de próstata (CaP), em valores absolutos, é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. Esta continua sendo a segunda maior causa de morte por câncer em homens, ficando atrás apenas do câncer de pulmão [1]. Apesar de o nosso conhecimento sobre o contexto hormonal, nutricional e ambiental do desenvolvimento do CaP ter avançado muito graças a estudos que vêm sendo desenvolvidos na área, muito permanece por ser entendido acerca da patogênese dessa doença. O câncer prostático é uma doença biologicamente heterogênea com considerável variação na agressividade clínica, sendo que o seu comportamento pode ser considerado um resultado direto ou indireto de alterações anormais na expressão gênica de células prostáticas epiteliais [2]. No entanto, os eventos moleculares responsáveis pela progressão do CaP de uma doença assintomática, sem grandes complicações para a vida do paciente, para uma doença que o coloque em risco ainda não estão bem esclarecidos [2]. Dessa forma, muitos autores têm utilizado o perfil de expressão gênica de tumores prostáticos com a finalidade de detectar alterações moleculares que possam estar relacionadas com o desenvolvimento tumoral [3-6]. A determinação de um perfil de expressão gênica prostática contribuiria para o melhor prognóstico desses pacientes, para a melhor estratificação do tumor, permitindo sua classificação em clinicamente significativa ou não, para o desenvolvimento de ferramentas de detecção precoce da patogenia e para a identificação de futuros alvos de intervenção terapêutica [2].

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR), é uma técnica já bem estabelecida, de simples realização, sendo largamente utilizada em estudos de expressão gênica uma vez que possibilita uma rápida, sensível e acurada avaliação dos níveis de mRNA em amostras biológicas [7]. Por ser um método constituído de múltiplos passos de realização, desde a obtenção das amostras até a análise dos dados de amplificação, existe uma variabilidade inerente nessa técnica, o que pode gerar variações entre a expressão real de genes e, conseqüentemente, entre a caracterização das amostras. Desse modo, faz-se necessária uma estratégia de normalização adequada para informações quantitativas geradas a partir da amplificação do material genético, com o objetivo de permitir comparações acuradas entre as amostras. Sem uma normalização apropriada, o perfil de expressão de um gene alvo pode ser erroneamente interpretado [8]. Muitas estratégias de normalização têm sido propostas, no entanto, até o momento, o uso de genes de referência tem sido considerado padrão-ouro para normalizar as frações de mRNA de amostras biológicas [9].

Housekeeping genes (HKGs), também chamados genes de referência ou de manutenção, por definição, mantêm as funções metabólicas básicas das células e fornecem suporte ao longo do ciclo celular [10]. Para ser usado como referência, um gene deve apresentar estabilidade, expressão não-regulada no tipo de amostra analisado, não sofrer variações sob diferentes condições de tratamento experimental e deve ter seu nível de expressão semelhante aos níveis de transcritos do(s) gene(s) em estudo [11]. Genes constitutivos ou *Housekeeping Genes* satisfazem esses critérios e são utilizados com o propósito de normalização em muitos estudos de expressão [12].

A descoberta do silenciamento de genes mediado por RNAs dupla fita proporcionou rapidamente seu uso como método de escolha para bloquear a expressão

de um gene. [13] Em 1998, Fire e colaboradores observaram que duplas fitas de RNA (dsRNA) podem induzir um potente efeito de silenciamento de genes no nematódeo *Caenorhabditis elegans*. [14] Este processo é chamado de RNA de interferência (RNAi), e apesar de ter originado uma técnica que é amplamente usada para induzir fenótipos de perda de função por inibir a expressão gênica pós-transcricionalmente [15], o RNAi é um processo evolutivamente conservado entre plantas e animais como um mecanismo de interferência na replicação viral ou atividade de transposons, ou em resposta a outras formas de expressão gênica inapropriadas [16-18]. Wright e colaboradores relataram o uso bem-sucedido de siRNAs (*small interfering RNAs*), uma das formas de silenciamento gênico por RNAi, para suprimir a expressão endógena do receptor de androgênios (AR) em células LNCaP. [19]

Em trabalho com cultura primária e linhagem celular de queratinócitos epidermais humanos ficou demonstrado que o silenciamento de genes pela técnica de RNAi pode afetar a expressão, nessas células, de genes frequentemente usados como normalizadores. [20]

Mesmo sabendo-se que uma normalização imprecisa dos dados leva a uma quantificação inadequada nos níveis de mRNA e a conclusões precipitadas sobre o perfil de expressão de genes alvo, atualmente é bastante comum em trabalhos científicos o uso de genes de referência comumente aceitos como normalizadores sem que tenha havido validação prévia adequada deste gene sob as condições experimentais a que seriam submetidas as amostras [21]. As evidências hoje disponíveis revelam que não existe um gene normalizador universal [7] e que este deve ser escolhido e validado levando-se em conta o tipo de tecido a ser analisado e as condições experimentais específicas aplicadas às amostras [22].

Não existem estudos específicos com cultura celular de tumores prostáticos que tenham avaliado e validado o melhor gene normalizador para estudos de expressão do CaP. Os estudos de expressão gênica já realizados com tecido prostático e com linhagem celular utilizam, na sua maioria, os genes *GAPDH* (*gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*) [23], *B-actina* [2, 24, 25], *18S* [26] e *B2M* (*beta-2-microglobulina*) [27]. No entanto, trabalhos têm mostrado variações em alguns desses genes em tecidos prostáticos [28-30], sugerindo que os mesmos são inapropriados para uso como gene de referência em estudos de expressão gênica para essas amostras.

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar controles endógenos apropriados para a normalização em estudos de expressão gênica por RT-PCR em tempo real em culturas primárias de células de carcinoma prostático submetidas ou não a tratamento experimental de silenciamento do receptor de androgênios (AR) pela técnica de RNA de interferência (RNAi). Foram incluídas algumas amostras de tecido prostático (hiperplasia prostática benigna e carcinoma de próstata) para verificar se as mesmas também expressam os genes em estudo. Para este propósito foram selecionados os genes que codificam as proteínas *Aminolevulinato delta-sintase I* (*ALAS1*), *Beta-2-microglobulina* (*B2M*), *Hipoxantina fosforibosiltransferase I* (*HPRT1*), *Complexo succinato desidrogenase, subunidade A, flavoproteína* (*Fp*) (*SHDA*) e *Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta* (*YWHAZ*), todos estes já previamente avaliados por outros trabalhos científicos em outros tecidos e em diferentes tipos amostrais [21, 31].

Resultados

A fim de identificarmos o melhor gene para controle interno em estudos de expressão gênica em cultura primária de células de carcinoma prostático, foi avaliada a expressão de cinco genes já descritos como genes constitutivos (*Aminolevulinato delta-sintase I (ALAS1)*, *Beta-2-microglobulina (B2M)*, *Hipoxantina fosforibosiltransferase I (HPRT1)*, *Complexo succinato desidrogenase, subunidade A, flavoproteína (Fp) (SHDA)* e *Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta (YWHAZ)*). Todos os genes possuem função celular conhecida, compreendendo desde a participação em vias metabólicas (*ALAS1*, *HPRT1* e *SDHA*), transdução de sinal (*YWHAZ*) até a participação no Sistema Imunitário com o Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I (*B2M*). A tabela 1 fornece informações adicionais sobre cada gene candidato.

Curva-padrão e eficiência de amplificação

A curva-padrão para cada reação de qPCR foi construída a partir de diluições seriadas de um *pool* de mRNA de tecido prostático (de 2 ng a 0,0002 ng). Cada amostra a ser quantificada foi diluída na proporção de 1:10 para que seu valor de quantificação ficasse dentro do intervalo da curva-padrão. A eficiência (E) de cada reação deve estar dentro do intervalo de 90-110% para ser considerada aceitável. Reações com baixa eficiência possuem baixa sensibilidade. O valor de Slope (indicador da eficiência da reação), derivado da fórmula $E=10^{-1/\text{slope}} - 1$, deve estar entre $-3.3 \pm 10\%$, refletindo assim uma eficiência de $100\% \pm 10\%$. O coeficiente de correlação (R^2) é outro parâmetro indicador da qualidade de uma reação. Um valor de

$R^2 > 0.99$ indica uma boa correlação entre os pontos da curva-padrão de modo a formar uma reta. A tabela 2 traz as informações sobre as reações de qPCR para cada par de *primers* utilizado. Excetuando-se o gene *SDHA*, os valores de eficiência das reações para os genes testados ficaram entre 92,332 e 105,223%, os valores de Slope se encontraram na faixa de - 3,384 a - 3,203 e os valores do coeficiente de correlação (R^2) variaram de 0,972 a 0,992. A amplificação de um produto específico (esperado) é evidenciada pela presença de um pico único na curva de desnaturação ou de dissociação (*melting-Tm*). Os gráficos de amplificação, da curva-padrão e da curva de desnaturação para cada gene testado estão apresentados nos arquivos adicionais (Anexo 1). O gene *SDHA* (*Complexo succinato desidrogenase, subunidade A, flavoproteína (Fp)*) foi excluído das análises posteriores por apresentar os valores de qualidade da reação fora dos parâmetros esperados. Apesar de apresentar um bom coeficiente de correlação (0,981), o valor de Slope da reação foi de - 2,546, correspondendo a uma eficiência de 147,017%, portanto, fora dos padrões aceitáveis (Tabela 2). Além disso, observando-se os valores de quantidade gerados a partir da amplificação das amostras para este gene constatamos que não é um gene normalizador adequado, uma vez que os valores de quantidade das amostras variaram de 0,328 ng até 406,835 ng, com diversos pontos excedendo os limites superiores da curva-padrão (Anexo 1 – Figura 5 b).

Nível de expressão dos genes candidatos

Os genes analisados mostraram diferentes níveis de expressão, conforme determinado pelo ciclo limiar (Ct). *B2M* mostrou os maiores níveis de expressão, correspondentes a valores mais baixos de Ct, enquanto *HPRT1* mostrou os menores níveis de expressão, com ciclo limiar tardio. Nenhum dos genes analisados mostrou uma expressão constante, como pode ser observado na figura 1, que apresenta a

dispersão dos valores de Ct obtidos para as amostras analisadas. Dessa forma, estes dados não fornecem informação suficiente sobre a estabilidade de expressão dos genes estudados para assegurar a escolha de um bom gene normalizador. Foi então feita a análise da estabilidade dos genes em estudo utilizando *softwares* que usam algoritmos especificamente desenvolvidos para este fim.

Estabilidade de expressão dos genes analisados

Os dados obtidos para cada gene de referência em cada amostra analisada foram avaliados utilizando-se *softwares* específicos para busca de genes normalizadores, o *geNorm* [32] e o *NormFinder* [33]. *geNorm* é um programa disponível *on-line*, de livre acesso, cuja plataforma de trabalho é o Microsoft Excel (Windows Office). Este *software* fornece um ranking dos genes testados baseado no valor de estabilidade (valor M) calculado para cada gene de acordo com o princípio de que a razão de expressão entre dois genes normalizadores ideais é a mesma em todas as amostras, não levando em consideração as condições experimentais ou o tipo celular. Uma variação na razão de expressão de dois *housekeeping genes* verdadeiros reflete o fato de que um, ou ambos, os genes não são constitutivamente expressos (o aumento na variação da razão corresponde a uma redução da estabilidade de expressão). Assim, o valor M representa o valor de estabilidade média de expressão de um determinado gene em comparação com os demais genes analisados nas amostras em questão; este valor deve ser menor do que 1,5 [32]. Genes com o menor valor de M apresentam maior estabilidade de expressão. O *software* permite a exclusão sucessiva dos genes que apresentarem maior valor M, seguida sempre de novo cálculo deste valor para cada gene considerando apenas os genes restantes de modo que, ao final deste processo, este método apresenta a combinação de dois genes

candidatos com valores de expressão similares como sendo os mais adequados para uso como normalizadores.

As amostras foram divididas em 3 grupos: Grupo 1) células sem nenhum tipo de tratamento (amostras basais e grupos controle dos experimentos) (N= 9), Grupo 2) células que receberam algum tratamento (silenciamento com siRNA e controle inespecífico) (N= 24) e Grupo 3) amostras de tecido prostático tumoral (N=2) e de hiperplasia prostática benigna (N=3), que não foi analisado junto com os demais grupos devido ao pequeno número amostral. Aplicando-se esta ferramenta analisando-se apenas amostras de cultura de células prostáticas tumorais (Grupos 1 e 2), submetidas ou não a tratamento experimental, o programa identificou o menor valor M para os genes *ALAS1* e *YWHAZ* (M = 0,556) em relação aos demais (Figura 2). Para a análise dos dados dentro do Grupo 1 apenas, os genes sugeridos como mais estáveis foram *ALAS1* e *B2M* (M = 0,520) (Figura 3). Já para a análise das amostras pertencentes ao Grupo 2, a melhor combinação de genes apontada foi para *ALAS1* e *YWHAZ*, a qual apresentou o menor valor de M (M = 0,563) (Figura 4). Em todas as análises, o gene *HPRT1* mostrou-se como sendo o mais variável de todos (Figuras 2, 3 e 4).

Como não existe um consenso a respeito de qual é a ferramenta de validação de genes normalizadores mais adequada, utilizamos também o algoritmo *NormFinder* [33], também disponível *on-line* com acesso livre, para as análises dos dados dos genes em questão. Esta ferramenta, diferentemente do *software geNorm*, examina a estabilidade de expressão de cada gene independentemente dos demais analisados. A aplicação do *NormFinder* estima a variação na expressão gênica, levando em conta a possível variação ao longo de subgrupos amostrais. Esta é a principal diferença entre *geNorm* e *NormFinder*, uma vez que este permite a divisão em subgrupos de acordo

com os tratamentos experimentais a que as amostras foram submetidas e calcula a variabilidade de um gene levando em conta esse fator. A estabilidade dos genes é mostrada como valor de estabilidade, sendo que os genes com menor valor de estabilidade possuem alta estabilidade de expressão [33]. Além da escolha do melhor gene normalizador, o programa ainda fornece a melhor combinação de dois genes para as amostras divididas em subgrupos como forma de compensar a variabilidade do sistema. A variação dos valores de estabilidade de cada um dos quatro genes analisados estatisticamente neste trabalho nos grupos 1 e 2 está apresentada na figura 4. *NormFinder* selecionou o gene *ALAS1* como o gene que mostrou a menor variação entre os grupos 1 e 2 analisados conjuntamente, uma vez que este apresentou o menor valor de estabilidade (valor de estabilidade = 0,130). A melhor combinação de dois genes parece ser *ALAS1* com *HPRT1* (valor de estabilidade = 0,279). Já o gene *YWHAZ* mostrou-se como sendo o mais variável entre os grupos de estudo. Os grupos 1 e 2, quando analisados isoladamente, confirmam o resultado das análises anteriores apontando *ALAS1* como gene mais estável e *YWHAZ* como menos estável nas amostras avaliadas, a partir do algoritmo *NormFinder* (Tabela 3).

Observando-se a figura 5, verificamos um aumento do valor de estabilidade, com consecutiva redução da estabilidade de expressão, de todos os genes analisados no grupo submetido a tratamento experimental (Grupo 2) em relação ao grupo controle (Grupo 1). Este dado sugere a influência do tratamento experimental (neste caso, a exposição a RNAi) no nível de expressão gênica dos candidatos a normalizadores deste estudo.

Para cada grupo analisado, os resultados obtidos pelo uso do *software geNorm* parecem bem semelhantes àqueles encontrados pelo *software NormFinder*, exceto pela diferente melhor combinação de genes proposta para os grupos 1 e 2 (*ALAS1* e

YWHAZ – *geNorm* versus *ALASI* e *HPRT1* – *NormFinder*) (Tabela 3). Outra diferença foi a alternância dos genes *HPRT1* e *YWHAZ* na última posição de estabilidade. Uma observação interessante foi o fato de o valor de estabilidade apresentado pelo *NormFinder* para a melhor combinação de genes para os Grupos 1 e 2 (*ALASI* – *HPRT1* – Valor de estabilidade = 0,279) ser maior quando comparado ao valor calculado para o melhor gene escolhido para este grupo (*ALASI* – Valor de estabilidade = 0,130) (Tabela 3). Tal fato pode indicar que o gene *ALASI* sozinho seria suficiente como normalizador em estudos de expressão para as amostras prostáticas analisadas. Apesar de haver essas diferenças entre as análises dos dados realizadas pelos *softwares* utilizados neste estudo, a tabela comparativa de valores apresentados pelo algoritmo *geNorm* (Tabela 3) revela que, de acordo com os parâmetros utilizados por este programa, os genes avaliados compartilham a característica de terem um perfil de estabilidade de expressão dentro do esperado, uma vez que mesmo os mais elevados valores de M calculados para estes genes permaneceram abaixo do valor limítrofe de 1,5 estabelecido pelo programa [32].

Discussão

Com a aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir da Transcrição Reversa (qPCR) na determinação acurada do perfil de expressão de genes alvo, as análises de expressão gênica já se tornaram grandemente relevantes em vários campos da pesquisa científica biológica na última década. Compreender o padrão de expressão de genes expressos pode fornecer uma noção mais aproximada das complexas redes celulares regulatórias, além de permitir a identificação de genes relevantes a novos processos biológicos ou genes implicados no desenvolvimento de doenças [32]. Até o momento, o uso de genes normalizadores, também conhecidos como *housekeeping genes (HKGs)*, é tido como padrão-ouro na normalização de dados experimentais de expressão gênica, uma vez que este método contribui para a redução de possíveis variações resultantes das diferenças de quantidade e de qualidade do RNA utilizado e das diferenças nas reações de síntese de cDNA e de qPCR [7]. Estes genes, em teoria, são expressos constitutivamente entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do seu desenvolvimento, não sofrendo alteração por tratamentos experimentais. Além disso, apresentam estabilidade e expressão não-regulada no tipo de amostra analisado [34]. No entanto, sendo o desenvolvimento tumoral um processo bastante complexo que envolve funções celulares alteradas em muitos estágios, através da mudança de quase todos os padrões de expressão gênica [2], muitas evidências experimentais indicam que mesmo os então chamados genes constitutivos ou normalizadores podem estar envolvidos na tumorigênese de cânceres como o de pulmão, de próstata, colorretal e de bexiga [21, 31]. Incluindo genes normalizadores clássicos utilizados como referência, como *β -actina (ACTB)*,

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), *proteína ligadora TATA-box (TBP)* e a *subunidade menor do ribossomo (18S)*, muitos genes têm sido frequentemente adotados da literatura para trabalhos experimentais como sendo bons normalizadores sem terem passado pelo devido processo de validação tecido-específica e sem ter sido considerada uma possível interferência de tratamentos experimentais na expressão desses genes. A escolha errônea de um gene de referência pode levar a resultados irreais e conseqüente comprometimento da interpretação dos achados de expressão gênica [32, 35, 36].

As evidências hoje disponíveis revelam que não existe um gene normalizador universal [7], sendo que o nível de transcrição desses genes pode variar entre diferentes tipos de tecidos (normal e patológico) e sob diferentes condições de tratamento [12]. Dessa forma, os genes de referência endógenos devem ser escolhidos levando-se em conta o tipo de tecido a ser analisado e as condições experimentais específicas aplicadas às amostras. Este pode ser o primeiro estudo específico com cultura celular de tumores prostáticos que tenha avaliado e validado o melhor gene normalizador para estudos de expressão do câncer de próstata.

Os cinco genes de referência testados apresentam funções celulares conhecidas e participam de vias celulares independentes, não sofrendo co-regulação. De acordo com os valores de ciclo limiar médio (Ct médio), os genes estudados apresentam diferentes níveis de expressão gênica nas amostras analisadas. Sabendo-se que o valor de Ct é inversamente proporcional ao nível de expressão gênica, *B2M* mostrou os maiores níveis de expressão, correspondentes a valores mais precoces de Ct, enquanto *HPRT1* mostrou ser o menos expresso, uma vez que apresentou os valores de ciclo limiar mais tardios. Nenhum dos genes analisados mostrou níveis de expressão constantes, dessa forma, estes dados baseados no padrão de expressão dos genes não

fornece informações suficientes sobre a estabilidade de expressão dos mesmos a fim de assegurar a escolha do gene normalizador mais adequado. Foi então necessária a análise da estabilidade dos genes em estudo por meio de algoritmos especificamente desenvolvidos para este fim.

As ferramentas específicas de busca de genes normalizadores mais adequados para estudos de expressão gênica (*softwares geNorm e NormFinder*) utilizadas para a análise dos dados amostrais apresentaram resultados bastante semelhantes para as amostras em questão. De acordo com os parâmetros utilizados pelo algoritmo *geNorm*, que estabelece que somente genes com valores de estabilidade (valor M) inferiores a 1,5 podem ser incluídos nas análises, o gene *SDHA* não se enquadrou nesta característica, uma vez que apresentou valor M acima do valor limítrofe. Já os genes *ALAS1*, *B2M*, *HPRT1* e *YWHAZ* apresentaram os valores de estabilidade de expressão (valor M) abaixo de 1,5 e seguiram na análise. Dentre estes, o gene *ALAS1* mostrou ser o mais estável para as amostras de cultura primária de células tumorais prostáticas, e o que parece ter sofrido a menor interferência do tratamento experimental aplicado às células. Ohl e colaboradores em estudo realizado com amostras microdissecadas de tecido prostático tumoral não submetidas a tratamento experimental, avaliaram os níveis de expressão gênica de 16 potenciais candidatos a gene normalizador por ambos os *softwares* utilizados neste estudo. Dentre os genes analisados, *ALAS1*, *HPRT* e *K-ALPHA-1* (*K-alfa-1 tubulina, alfa, ubiquitous*) foram indicados como a melhor combinação de genes para uma normalização confiável em estudos de perfis de expressão gênica do câncer de próstata [31]. Em função do baixo número de amostras de tecido prostático utilizadas em nosso estudo, não pudemos confirmar este resultado para o gene *ALAS1* em tecido proveniente de câncer ou de hiperplasia benigna de próstata. A ampliação do número de amostras contribuirá para

a determinação do perfil de estabilidade de expressão deste gene nas referidas amostras.

Nossos resultados evidenciam uma possível variação da expressão de genes constitutivos entre diferentes condições experimentais (amostras submetidas e não submetidas a tratamento com siRNAs). O grupo de cultura celular submetido a tratamento experimental mostra uma tendência de elevação dos valores de estabilidade de todos os candidatos a gene normalizador quando comparado ao grupo que não foi exposto a RNAi. Esta elevação dos valores de estabilidade dos genes reflete no aumento da variabilidade dos mesmos. Allen e colaboradores em trabalho realizado com cultura primária e linhagem celular de queratinócitos epidermais humanos demonstraram que a transfecção com shRNA (RNAi) nessas células afetou a expressão dos genes frequentemente usados como normalizadores *β -actina*, *GAPDH* e *ALAS1*. Para este último, foi verificado um aumento de expressão correspondente ao aumento da concentração do shRNA transfectado [20].

O ideal, como mencionado anteriormente, é que o gene a ser usado como referência apresente estabilidade, expressão não-regulada no tipo de amostra analisado e que não sofra alteração de expressão por tratamentos experimentais [11].

Conclusão

Nossos resultados apontam que, dentre os genes analisados, para o propósito de normalização em estudos de perfil de expressão gênica por RT-PCR em tempo real, o gene *ALAS1* é recomendado como o gene de referência mais adequado em cultura primária de células de carcinoma prostático. O tecido prostático (tanto hiperplasia prostática benigna quanto tumores prostáticos) expressa todos os genes avaliados. Porém, a determinação do melhor gene para controle endógeno em amostras de tecido prostático requer a inclusão e a avaliação de um maior número de dados amostrais.

Materiais e Métodos

Cultura primária de células de carcinoma prostático

As culturas de células de carcinoma prostático foram realizadas a partir de fragmentos de tecido prostático obtidos de pacientes submetidos à prostatectomia radical por diagnóstico de câncer de próstata (CaP), recrutados nos turnos de ambulatório do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de câncer de próstata que não haviam recebido tratamento com hormonioterapia ou quimioterapia e que não possuíam diagnóstico de outra neoplasia concomitante. O termo de consentimento livre e esclarecido foi devidamente aplicado (Anexo 2).

No total, foram realizadas dez culturas de células prostáticas tumorais. Cada fragmento coletado foi colocado em um frasco estéril contendo solução salina com sais de Hank's (Gibco BRL, NY, USA) e kanamicina 0,5 mg/mL e imediatamente transportado em gelo para o laboratório. Em uma capela de fluxo laminar, foram retiradas do fragmento as regiões cauterizadas e com coágulos, e em seguida o tecido foi seccionado em fragmentos menores, de cerca de 2x2 mm, que foram distribuídos em poços de 35 mm de placas de cultura de 6 poços (Nunc®) (cerca de 5 fragmentos por poço) contendo 1 mL de soro bovino fetal (SBF). Após 24 horas, foi realizada a retirada do SBF e a adição de 1 mL de meio DMEM (with High Glucose) suplementado com 0,5 mg/mL de kanamicina, 4 mL/L de fatores de crescimento e 20% de SBF e a cada 48 horas foi realizada a troca do meio de cultivo adicionando-se 2 mL de meio em cada poço. As culturas foram mantidas por aproximadamente 10 dias em uma estufa de CO₂ 5% a uma temperatura de 37°C.

Tecido Prostático

Um fragmento de tecido prostático foi obtido de pacientes submetidos à cirurgia por Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) ou Carcinoma de Próstata (CaP), coletado no momento da cirurgia e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para análises posteriores.

Transfecção com siRNAs

O siRNA para o receptor de androgênios (AR) foi adquirido da Upstate (Charlottesville, Virginia, USA). O siRNA para um gene específico é fornecido em um reagente chamado *SMARTpool*®, que combina quatro siRNAs selecionados, e apresenta uma eficiência de silenciamento de 75 a 95%. A concentração do siRNA a ser utilizada foi definida de acordo com o protocolo do fabricante.

Para a transfecção do siRNA, foi utilizado o reagente siIMPORTER™ Transfection Reagent (Upstate). Este reagente contém uma formulação lipídica catiônica que apresenta uma alta eficiência de transfecção em uma ampla variedade de linhagens de células de mamíferos com toxicidade extremamente baixa. O kit também apresenta um diluente para o siRNA. Para determinar as melhores condições de transfecção que resultam na maior eficiência, a transfecção em cada tipo de cultura celular foi otimizada com um kit de controle positivo de transfecção (Lamin A/C siRNA/siAb™ Starter Kit – Upstate). Também foi usado um controle negativo de siRNA não específico na mesma concentração que o siRNA experimental a cada transfecção. Todas as transfecções foram feitas seguindo-se o protocolo do fabricante.

Análise da expressão gênica

Extração do RNA total

As placas de cultura foram colocadas no gelo, o meio de cultura foi desprezado e as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS). As células foram lisadas diretamente nas placas (9 cm²) com 1 mL/10 cm² do reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Para extração do RNA total a partir dos fragmentos de HPB ou CaP, o tecido foi lisado diretamente em Trizol®. A quantificação do RNA foi feita através da absorbância a 260 nm em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (GeneQuant). A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias a 260 e 280 nm foi superior a 1,6.

Desenho de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos (*primers* iniciadores) para a reação de PCR em tempo real para os genes *ALAS1*, *B2M* e *HPRT1* foram desenhados utilizando-se o programa Primer 3 Input [37] (version 0.4.0) disponível *on-line* e sintetizados pela empresa Invitrogen [38]. As seguintes considerações foram levadas em conta para a escolha da melhor sequência: i) conteúdo de GC entre 45 e 55% (ótimo de 50%); ii) temperatura de anelamento entre 56 e 60°C (ótima de 58°C); iii) tamanho da sequência entre 18 e 22 pb (ótimo de 20 pb); iv) exclusão de sequências com auto-complementariedade e complementariedade entre as sequências *forward* e *reverse* (formação de dímeros de *primers* e de estruturas secundárias); v) tamanho do amplicon em torno de 100 pb; vi)

desenho dos *primers* nos limites éxon-éxon do mRNA maduro, para evitar a amplificação de íntrons.

Os oligonucleotídeos para os genes *SDHA* e *YWHAZ* foram gentilmente cedidos pelo professor Rogério Margis (Centro de Biotecnologia –UFRGS) e pela aluna de doutorado Tamara Vaccaro (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica – UFRGS).

Reação em Cadeia da Polimerase a partir de Transcrição Reversa (RT-PCR)

A avaliação da expressão dos níveis de mRNA dos fatores em estudo foi realizada a partir da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR). A técnica consiste de duas etapas, sendo a primeira a transcrição reversa do mRNA mensageiro a DNA complementar (cDNA), o qual é submetido à Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, que permite a quantificação do cDNA submetido à amplificação pela enzima Taq DNA Polimerase.

A síntese do cDNA (DNA complementar) foi feita a partir de 1 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do mRNA (Oligo(DT)₁₂₋₁₈), produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração do mRNA corresponde a aproximadamente 2 - 3% do RNA total, estimou-se que 1 µg de RNA total daria origem a 20 ng de cDNA. O kit utilizado para a síntese do cDNA foi o *Super Script First- Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 21 uL, que foi armazenado a - 20°C até a amplificação por PCR em tempo real (qPCR).

PCR em Tempo Real

Trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência [34]. Entre as variações da técnica disponíveis, optamos pela utilização do corante fluorescente *SYBR Green I* [39]. O reagente utilizado nas amplificações foi o Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen).

O corante *SYBR Green I* se liga à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1000 vezes na fluorescência. Como o corante liga-se a qualquer fita dupla de DNA, foram realizadas as chamadas curvas de desnaturação ou dissociação (*melting-Tm*), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso obtivemos a especificidade do produto amplificado, uma vez que a *Tm* é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado apresentam picos de desnaturação mais baixos.

Curva de Padronização

Para cada gene em estudo foi realizada uma curva de padronização, através da qual foram calculados os valores (em ng) das amostras. A curva de padronização foi obtida através de reações de RT-PCR feitas a partir de diluições seriadas de cDNA de tecido prostático (de 0,0002 ng a 2 ng). Cada diluição do cDNA foi feita em duplicata, tanto para a curva-padrão quanto para as amostras. As diluições foram escolhidas dentro de uma faixa que incluísse o valor esperado para o mRNA nas amostras. O momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência é definido como o ciclo limiar (*threshold cycle, Ct*), que é inversamente proporcional ao logaritmo (log) da quantidade de cDNA (ng) [40]. Portanto, a curva de padronização é gerada

jogando-se os valores de Ct, em um intervalo de 95% de confiança, contra a intensidade da fluorescência do *SYBR Green I*, correspondendo ao logaritmo das ng de cDNA.

Protocolo geral da RT-PCR em tempo real

As condições da reação de PCR para cada gene foram padronizadas, antes de proceder-se à quantificação das amostras. Foram testados: concentração e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos e duração de cada etapa do ciclo.

O reagente Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG é fornecido a uma concentração de 2X. A *mix* é otimizada para reações com o reagente *SYBR Green*, e contém: corante *SYBR Green I*; Platinum® *Taq* DNA Polimerase; dNTPS; solução tampão com concentrações otimizadas de seus componentes (Tris-HCl, KCl e MgCl₂). Assim, as reações foram realizadas adicionando-se, para cada amostra, 6,25 µL deste reagente acrescido de 1 µL do corante Rox (50 nM), 0,1 µL da solução de uso de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 µL da amostra e 4,05 µL de água, totalizando um volume final de 12,5 µL. As amostras foram amplificadas no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

As leituras de fluorescência emitidas por cada amostra nas reações foram feitas ao final de cada ciclo. As reações foram realizadas com 40 ciclos, mas a quantificação das amostras foi realizada durante o início do aumento exponencial da fluorescência (Ct limiar), conforme descrito anteriormente.

Análise Estatística

A análise dos dados de amplificação das amostras foi realizada com o auxílio do software GenEx (MultiD Analysis), o qual contém os algoritmos *geNorm* [32] e

NormFinder [33]. Uma vez que *geNorm* aceita apenas valores lineares, os valores de Quantidade de cada amostra resultante da amplificação da mesma foram convertidos pela relativização à amostra que apresentou maior valor de quantidade.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Referências bibliográficas

1. INCA: **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. In.; 2009.
2. Luo JH, Yu YP, Cieply K, Lin F, DeFlavia P, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G, Becich M: **Gene expression analysis of prostate cancers**. *Mol Carcinog* 2002, **33**(1):25-35.
3. Nelson PS: **Predicting prostate cancer behavior using transcript profiles**. *J Urol* 2004, **172**(5 Pt 2):S28-32; discussion S33.
4. Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, Tamayo P, Renshaw AA, D'Amico AV, Richie JP *et al*: **Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior**. *Cancer Cell* 2002, **1**(2):203-209.
5. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J *et al*: **Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival**. *J Pathol* 2005, **205**(3):359-376.
6. Mink SR, Hodge A, Agus DB, Jain A, Gross ME: **Beta-2-microglobulin expression correlates with high-grade prostate cancer and specific defects in androgen signaling**. *Prostate* 2010, **70**(11):1201-1210.
7. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A: **Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations**. *Genes Immun* 2005, **6**(4):279-284.
8. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C: **Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies**. *Anal Biochem* 2002, **309**(2):293-300.
9. de Jonge HJM FR, de Bont ESJM, Hofstra RMW, Gerbens F, et al. : **Evidence Based Selection Of Housekeeping Genes**. *PloS ONE* 2007, **2**((9): e898.).
10. Khimani AH, Mhashilkar AM, Mikulskis A, O'Malley M, Liao J, Golenko EE, Mayer P, Chada S, Killian JB, Lott ST: **Housekeeping genes in cancer: normalization of array data**. *Biotechniques* 2005, **38**(5):739-745.

11. Bustin SA: **Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.** *J Mol Endocrinol* 2002, **29**(1):23-39.
12. Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N, Bielawski KP: **[Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR].** *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007, **61**:500-510.
13. Lenz G: **The RNA interference revolution.** *Braz J Med Biol Res* 2005, **38**(12):1749-1757.
14. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391**(6669):806-811.
15. Czauderna F, Santel A, Hinz M, Fechtner M, Durieux B, Fisch G, Leenders F, Arnold W, Giese K, Klippel A *et al*: **Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(21):e127.
16. Coburn GA, Cullen BR: **siRNAs: a new wave of RNA-based therapeutics.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **51**(4):753-756.
17. Moss EG: **RNA interference: it's a small RNA world.** *Curr Biol* 2001, **11**(19):R772-775.
18. Hammond SM: **Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway.** *FEBS Lett* 2005, **579**(26):5822-5829.
19. Wright ME, Tsai MJ, Aebersold R: **Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(9):1726-1737.
20. Allen D, Winters E, Kenna PF, Humphries P, Farrar GJ: **Reference gene selection for real-time rtPCR in human epidermal keratinocytes.** *J Dermatol Sci* 2008, **49**(3):217-225.
21. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN: **Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes.** *Lab Invest* 2005, **85**(1):154-159.
22. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW: **Quantitative real-time RT-PCR-- a perspective.** *J Mol Endocrinol* 2005, **34**(3):597-601.
23. Rosner IL, Ravindranath L, Furusato B, Chen Y, Gao C, Cullen J, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Petrovics G: **Higher tumor to benign ratio of**

- the androgen receptor mRNA expression associates with prostate cancer progression after radical prostatectomy.** *Urology* 2007, **70**(6):1225-1229.
24. Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, Hauptmann S, Kishi T, Nakamura T, Loening SA *et al*: **Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer.** *J Urol* 2004, **171**(1):187-191.
25. Kinoshita M, Nakagawa T, Shimizu A, Katsuoka Y: **Differently regulated androgen receptor transcriptional complex in prostate cancer compared with normal prostate.** *Int J Urol* 2005, **12**(4):390-397.
26. Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP, Arasheben A, Tilley WD, Scher HI, Gerald WL *et al*: **Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer.** *Mol Cancer* 2007, **6**:39.
27. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP: **Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer.** *N Engl J Med* 1995, **332**(21):1393-1398.
28. Harada N, Yasunaga R, Higashimura Y, Yamaji R, Fujimoto K, Moss J, Inui H, Nakano Y: **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells.** *J Biol Chem* 2007, **282**(31):22651-22661.
29. Gross M, Top I, Laux I, Katz J, Curran J, Tindell C, Agus D: **Beta-2-microglobulin is an androgen-regulated secreted protein elevated in serum of patients with advanced prostate cancer.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(7):1979-1986.
30. Shi C, Zhu Y, Su Y, Chung LW, Cheng T: **Beta2-microglobulin: emerging as a promising cancer therapeutic target.** *Drug Discov Today* 2009, **14**(1-2):25-30.
31. Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A *et al*: **Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?** *J Mol Med* 2005, **83**(12):1014-1024.
32. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR**

- data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**(7):RESEARCH0034.
33. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF: **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer Res* 2004, **64**(15):5245-5250.
 34. Bustin SA: **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J Mol Endocrinol* 2000, **25**(2):169-193.
 35. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA, Zumla A: **The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization.** *Anal Biochem* 2005, **344**(1):141-143.
 36. Santos AR, Duarte CB: **Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons.** *J Neurosci Res* 2008, **86**(16):3684-3692.
 37. **Primer 3 Input** [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi]
 38. Rozen S, Skaletsky H: **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** *Methods Mol Biol* 2000, **132**:365-386.
 39. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT: **Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.** *Biotechniques* 1998, **24**(6):954-958, 960, 962.
 40. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology (N Y)* 1993, **11**(9):1026-1030.

Figuras

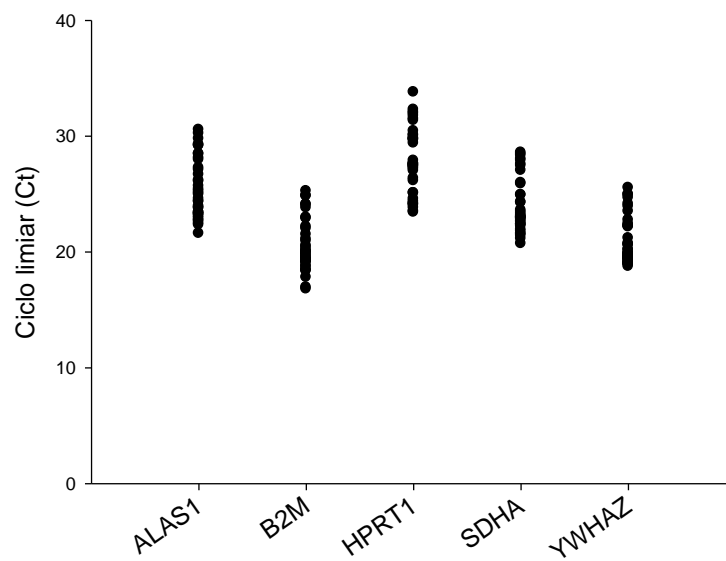


Figura 1. Níveis de expressão (Ct) de cinco genes candidatos a normalizadores testados em amostras prostáticas. A expressão destes genes foi determinada em condições controle e tratada experimentalmente com siRNAs para o receptor de androgênios.

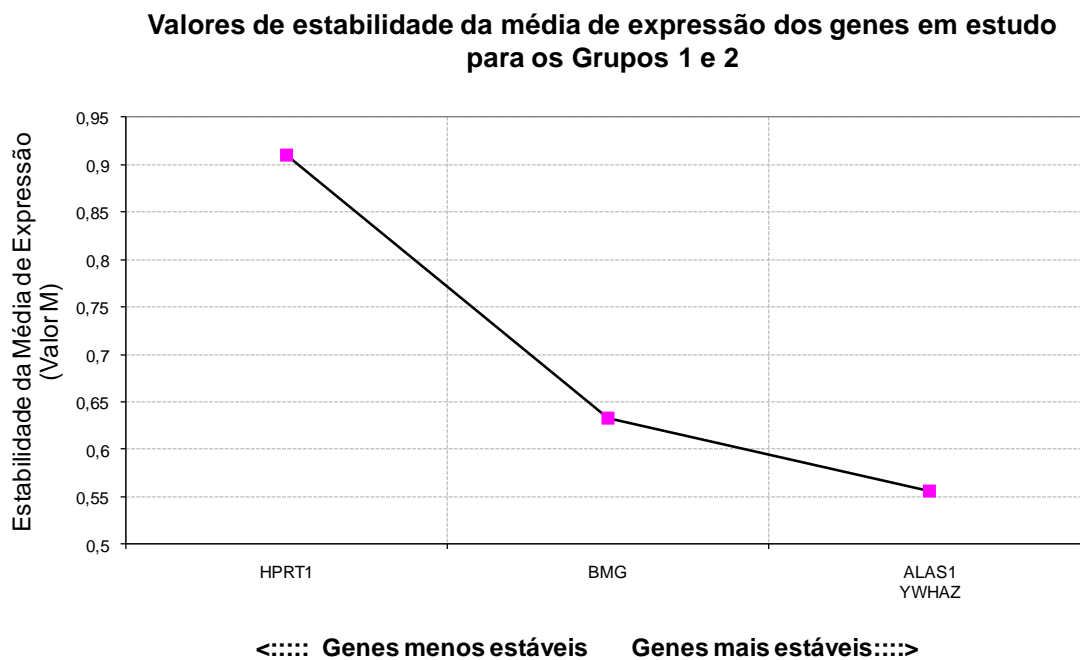


Figura 2. Valores de estabilidade da média de expressão dos genes em estudo pela análise com o *software geNorm* para os Grupos 1 e 2 (amostras de grupos controle e submetidas a tratamento experimental), indicando a combinação dos dois genes de referência mais estáveis. O maior valor M corresponde ao gene menos estável (*HPRT1*), enquanto os menores valores M correspondem aos genes mais estáveis (*ALAS1*, *YWHAZ*).

Valores de estabilidade da média de expressão dos genes em estudo para o Grupo 1

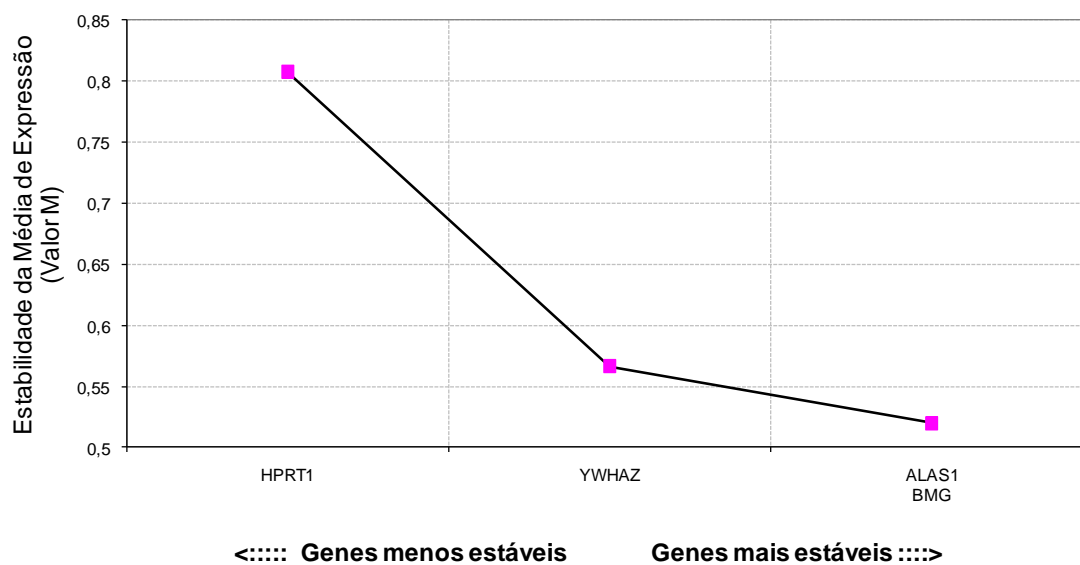


Figura 3. Valores de estabilidade da média de expressão dos genes em estudo pela análise com o *software geNorm* para o Grupo 1 (amostras controle), indicando a combinação dos dois genes de referência mais estáveis. O maior valor M corresponde ao gene menos estável (*HPRT1*), enquanto os menores valores M correspondem aos genes mais estáveis (*ALAS1*, *B2M*).

Valores de estabilidade da média de expressão dos genes em estudo para o Grupo 2

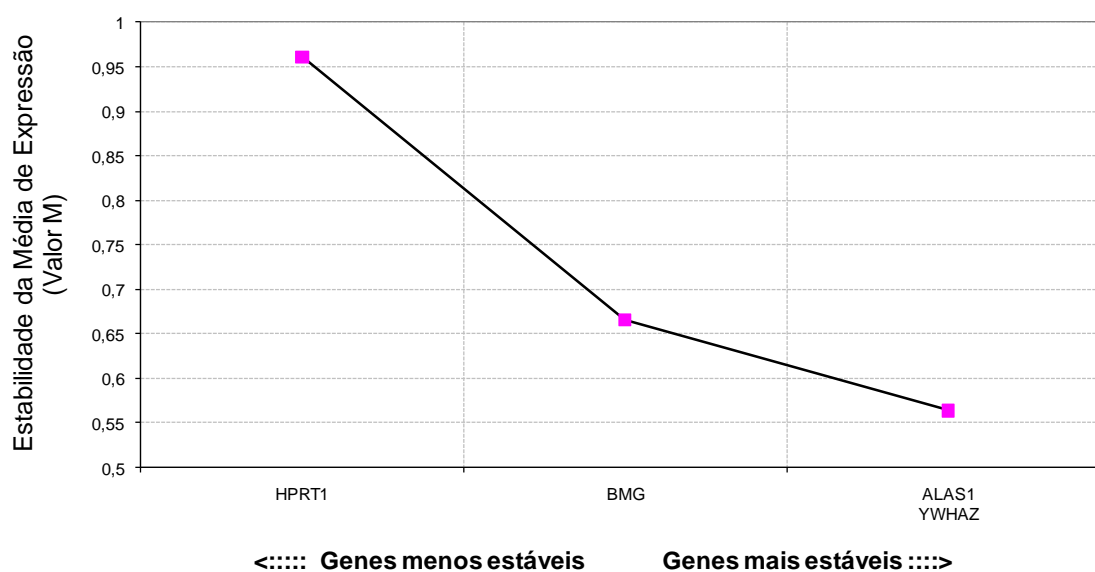


Figura 4. Valores de estabilidade da média de expressão dos genes em estudo pela análise com o *software geNorm* para o Grupo 2 (amostras submetidas a tratamento experimental), indicando a combinação dos dois genes de referência mais estáveis. O maior valor M corresponde ao gene menos estável (*HPRT1*), enquanto os menores valores M correspondem aos genes mais estáveis (*ALAS1*, *YWHAZ*).

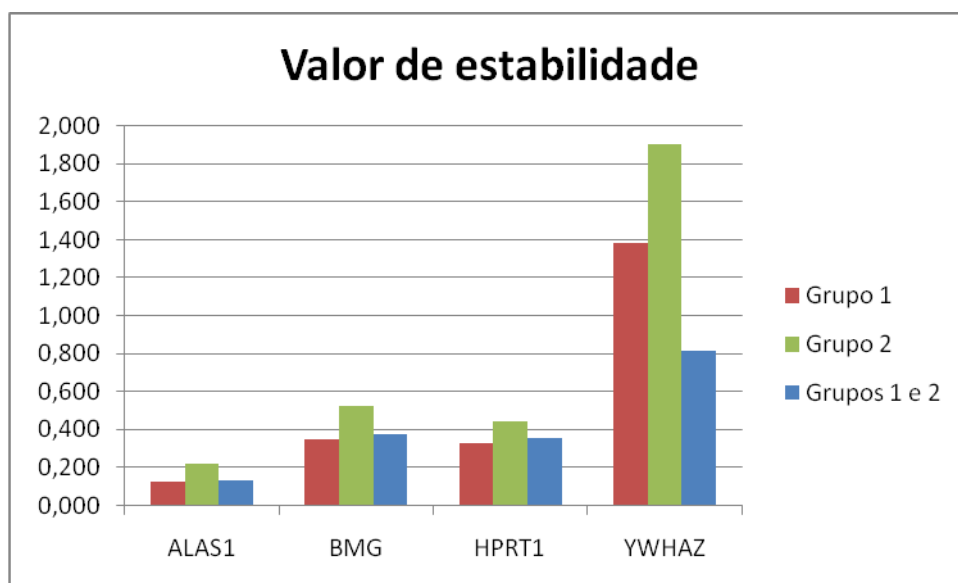


Figura 5. Gráfico da variação dos valores de estabilidade para os genes analisados pelo *software NormFinder* nos diferentes grupos amostrais, mostrando o gene *ALAS1* como sendo o que apresentou menor valor de estabilidade (gene mais estável) em todos os grupos analisados.

Tabelas

Tabela 1 – Informações adicionais sobre os cinco candidatos a gene normalizador nas amostras em estudo.

Símbolo	Número de acesso*	Descrição	Localização genômica	Função celular
<i>ALAS1</i>	NM_199166.1	Aminolevulinato delta-sintase 1 [<i>Homo sapiens</i>]	3p21.1	Síntese do heme
<i>B2M</i>	NM_004048.2	Beta-2-microglobulina [<i>Homo sapiens</i>]	15q21-q22.2	Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC I)
<i>HPRT1</i>	NM_000194.2	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 [<i>Homo sapiens</i>]	Xq26.1	Recuperação metabólica de purinas
<i>YWHAZ</i>	NM_001135699.1	Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta [<i>Homo sapiens</i>]	8q23.1	Proteína mediadora de sinal de transdução
<i>SDHA</i>	NM_004168.2	Complexo succinato desidrogenase, subunidade A, flavoproteína (Fp) [<i>Homo sapiens</i>]	5p15	Transporte de elétrons (Ciclo de Krebs e Cadeia Respiratória)

*Sequência de Referência NCBI (Gene Bank)

Tabela 2 – Sequências dos oligonucleotídeos (*primers*) para os cinco candidatos a gene normalizador analisados e informações sobre as reações de qPCR.

Genes	Primer	Sequência (5'-->3')	Tamanho do amplicom (pb)	Coefficiente de correlação (R ²)	Eficiência da reação de qRT-PCR (%)	Valor de Slope
<i>ALAS1</i>	<i>Forward</i>	CGTGCTTTTGTGGCCAATG	100	0,984	98,109	-3,368
	<i>Reverse</i>	TGGATCATGGAGGCATGGTT				
<i>B2M</i>	<i>Forward</i>	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	165	0,972	92,332	-3,52
	<i>Reverse</i>	ACAAGTCTGAATGCTCCACT				
<i>HPRT1</i>	<i>Forward</i>	ACGTCTTGCTCGAGATGTGATG	100	0,992	97,453	-3,384
	<i>Reverse</i>	ATCCAGCAGGTCAGCAAAGAA				
<i>YWHAZ</i>	<i>Forward</i>	TCCTTTGCTTGATCCAC	132	0,981	105,223	-3,203
	<i>Reverse</i>	AAGGCAGACAATGACAGACCA				
<i>SDHA</i>	<i>Forward</i>	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	86	0,981	147,017	-2,546
	<i>Reverse</i>	CCACCACTGCATCAAATTCATG				

Tabela 3 – Apresentação das análises de estabilidade de expressão realizadas pelos *softwares* *geNorm* e *NormFinder* para os genes em estudo em cada grupo amostral. Os candidatos a gene de referência estão ordenados de acordo com o valor de estabilidade de expressão (do menos estável ao mais estável).

Amostras do grupo controle (Grupo 1)				Amostras do grupo tratado (Grupo 2)				Amostras dos grupos controle e tratado (Grupos 1 e 2)			
geNorm		NormFinder		geNorm		NormFinder		geNorm		NormFinder	
genes	Valor M	genes	Valor de estabilidade	genes	Valor M	genes	Valor de estabilidade	genes	Valor M	genes	Valor de estabilidade
<i>HPRT1</i>	1,049	<i>YWHAZ</i>	1,379	<i>HPRT1</i>	1,257	<i>YWHAZ</i>	1,904	<i>HPRT1</i>	1,188	<i>YWHAZ</i>	0,814
<i>YWHAZ</i>	0,787	<i>B2M</i>	0,346	<i>YWHAZ</i>	0,91	<i>B2M</i>	0,525	<i>YWHAZ</i>	0,868	<i>B2M</i>	0,377
<i>B2M</i>	0,713	<i>HPRT1</i>	0,326	<i>B2M</i>	0,981	<i>HPRT1</i>	0,440	<i>B2M</i>	0,835	<i>HPRT1</i>	0,356
<i>ALAS1</i>	0,681	<i>ALAS1</i>	0,122	<i>ALAS1</i>	0,786	<i>ALAS1</i>	0,219	<i>ALAS1</i>	0,75	<i>ALAS1-HPRT1</i>	0,279
<i>ALAS1-B2M</i>	0,52			<i>ALAS1-YWHAZ</i>	0,563			<i>ALAS1-YWHAZ</i>	0,556	<i>ALAS1</i>	0,130

Anexos

Anexo 1

Gráficos de amplificação, curva-padrão e curva de desnaturação (curva de *melting*) resultantes da amplificação dos transcritos dos genes *ALAS1* (**figura 1**), *B2M* (**figura 2**), *HPRT1* (**figura 3**), *YWHAZ* (**figura 4**) e *SDHA* (**figura 5**).

Em **a** (gráfico de amplificação), ΔRn representa a diferença entre os valores finais e iniciais da razão unidade de fluorescência da amostra por unidade de fluorescência do corante Rox e está plotado *versus* o número de ciclos da reação. As linhas vermelhas representam a amplificação das diluições seriadas da curva-padrão e as linhas coloridas representam a amplificação das amostras. **b** (gráfico da curva-padrão) apresenta os valores de Ct (*threshold cycle*) *versus* os valores de quantidade das amostras. Os pontos vermelhos representam os pontos da curva-padrão e os pontos em azul representam as amostras. Em **c** a curva de *melting* está representada por Derivativa negativa da fluorescência (*Derivative Reporter (-Rn)*) *versus* Temperatura (°C).

1)

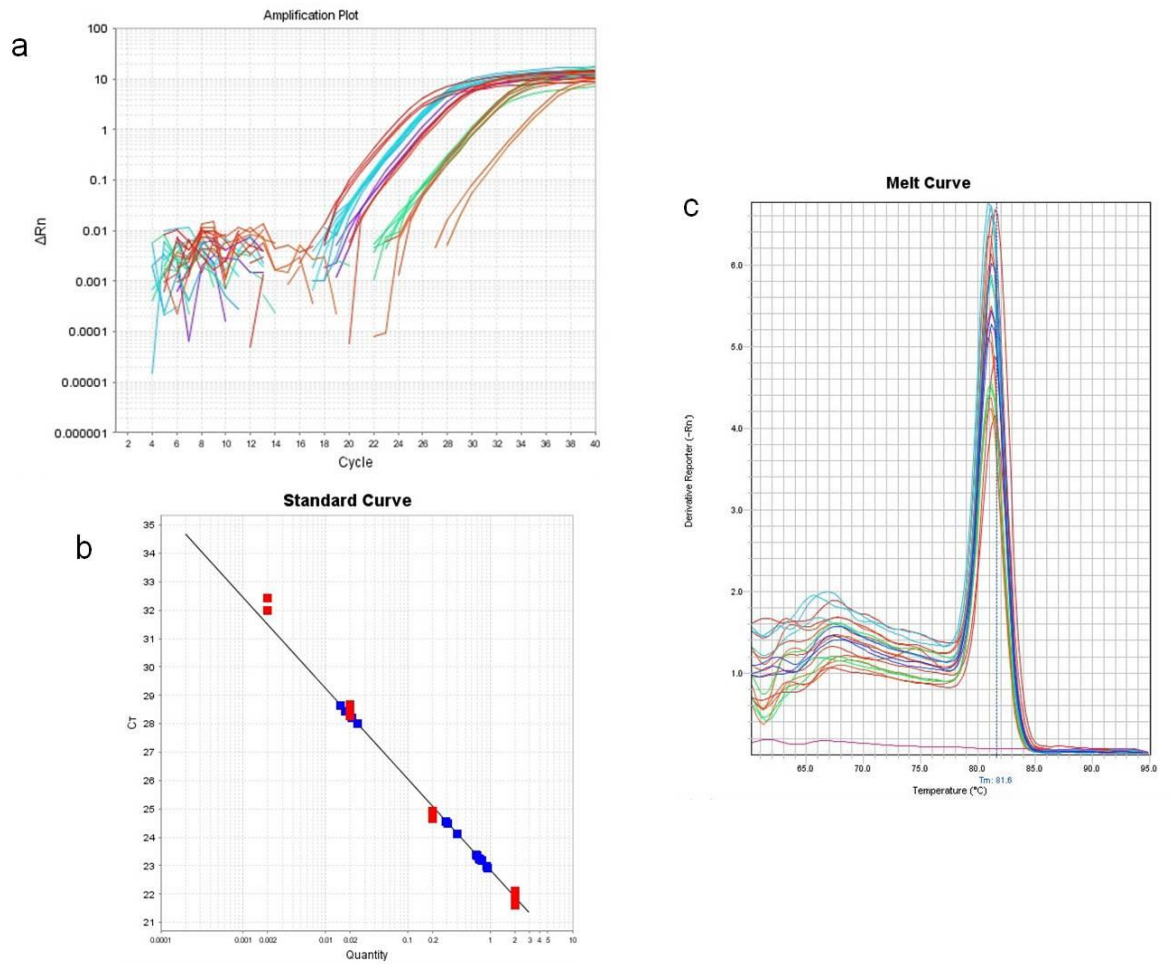
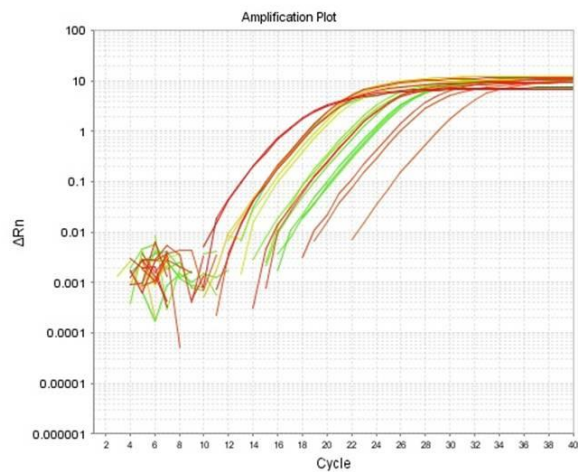


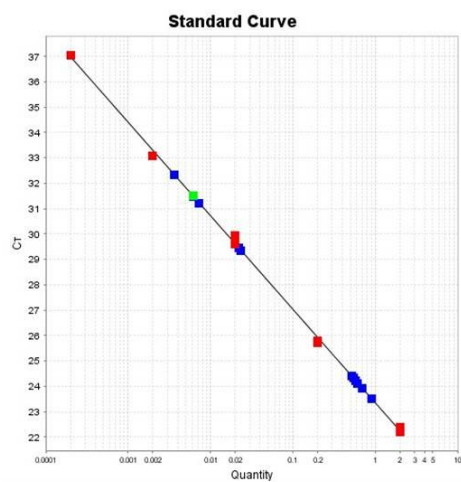
Figura 1: Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene *ALAS1*.

2)

a



b



C

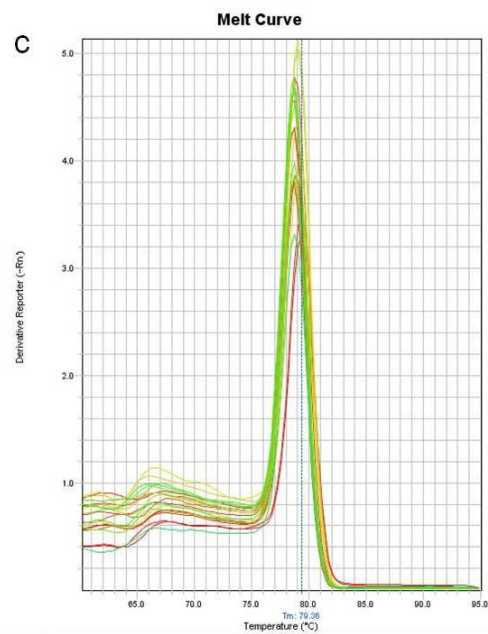


Figura 2: Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene *B2M*.

3)

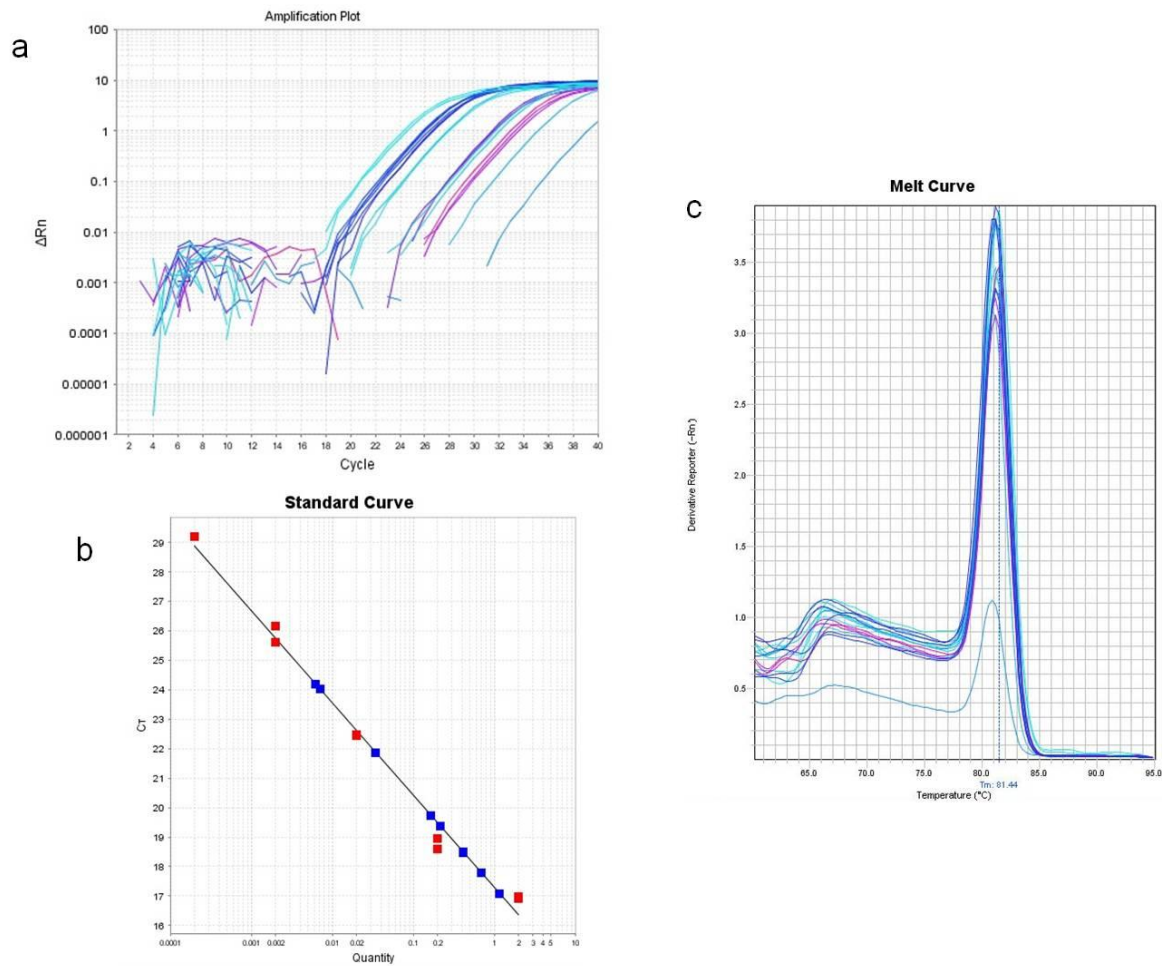


Figura 3: Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene *HPRT1*.

4)

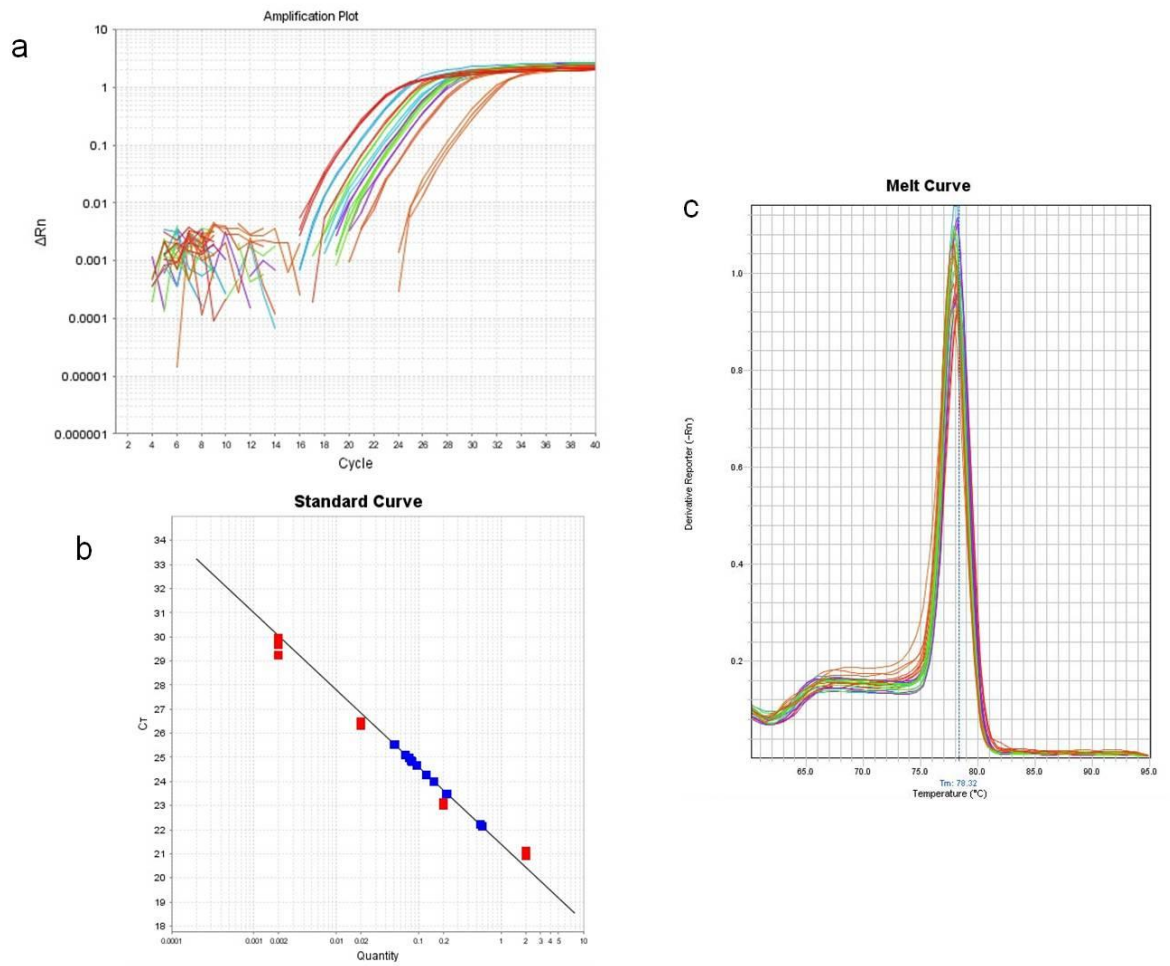


Figura 4: Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene *YWHAZ*.

5)

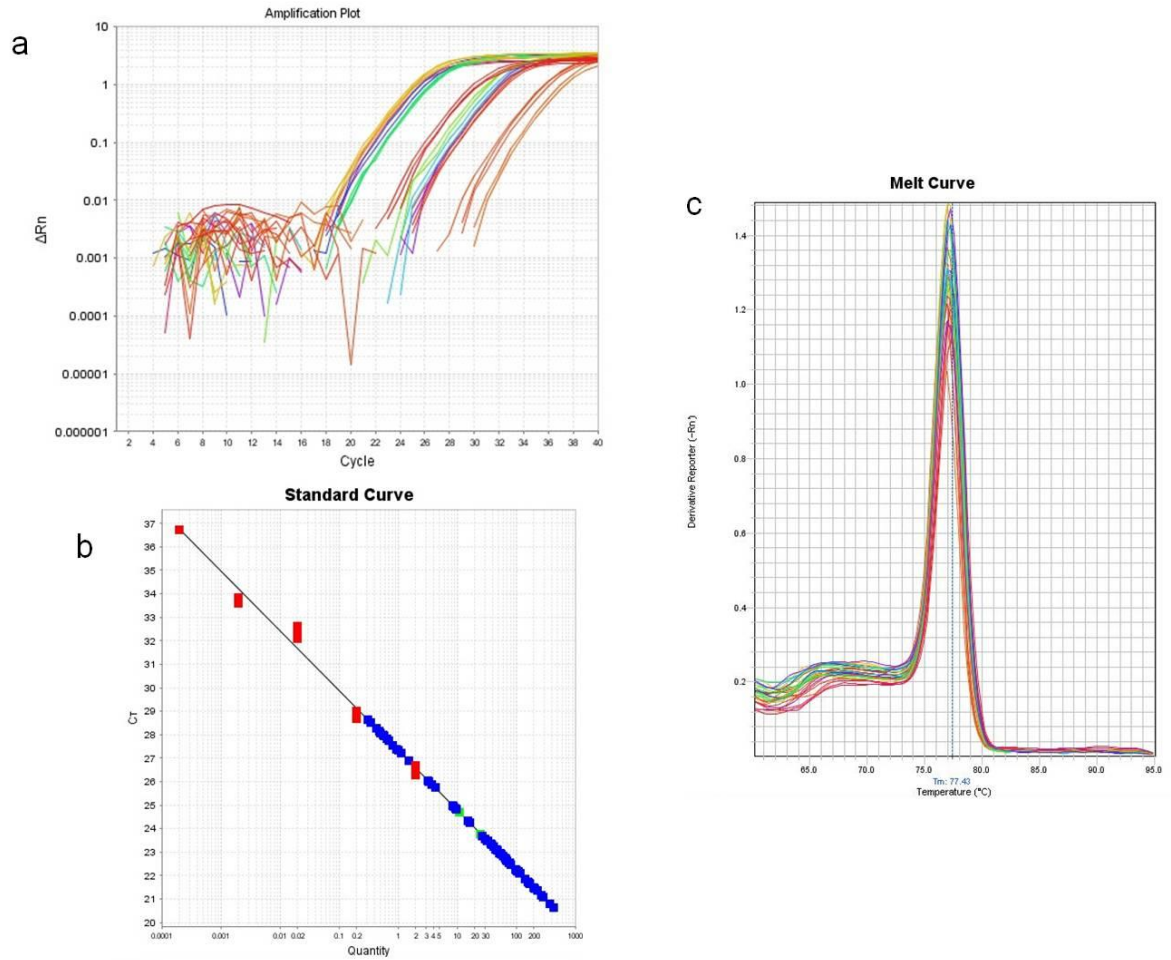


Figura 5: Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene *SDHA*.

Anexo 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos, como o câncer de próstata (CaP), que são diagnosticados nas clínicas de urologia. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar a formação de tumores. Como o Sr. tem o diagnóstico de carcinoma de próstata e foi recomendado cirurgia para retirada do mesmo, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que um pequeno fragmento do seu nódulo prostático seja encaminhado para estudo genético. O restante do nódulo da próstata será destinado ao exame histológico normal.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras por até cinco anos, para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos do nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as

informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto são Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (51 33083559) e Me. Gisele Branchini (51 81401240). Caso o senhor tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada e, das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data: _____

Paciente ou responsável: _____

Pesquisador: _____

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo foi delineado a partir da necessidade de encontrarmos um gene normalizador mais adequado para estudos de expressão gênica em cultura primária de células de carcinoma prostático. A seleção dos genes a serem estudados foi realizada com o auxílio de ferramentas científicas de pesquisa disponíveis *on-line* e foi feita com base em dados já publicados na literatura. Através da amplificação dos transcritos dos genes selecionados por RT-PCR em tempo real, foi possível avaliar o padrão de expressão dos mesmos no tipo de amostra analisado. Com o uso de *softwares* especificamente desenhados para busca dos melhores genes normalizadores (*geNorm* e *NormFinder*) foi possível avaliarmos a estabilidade de expressão dos genes em estudo. De acordo com os resultados das análises de ambos os *softwares*, dentre os cinco genes avaliados, o gene *ALAS1* foi o que apresentou maior estabilidade de expressão nas amostras em estudo e o que aparentemente sofreu menor interferência do tratamento experimental a que foram submetidas as células, sendo indicado para uso como gene normalizador em estudos de expressão gênica de tumores prostáticos em culturas celulares.

Estes resultados poderão ser utilizados não somente pelo atual grupo de pesquisa de que faço parte, mas também por outros estudos de expressão gênica que venham a ser desenvolvidos que tenham como modelo experimental culturas primárias de células prostáticas tumorais. Mais estudos são necessários para a avaliação da expressão desse gene em outras amostras prostáticas, como em linhagens celulares e em tecido prostático.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

41. **National Institutes of Health The Nation's Medical Research Agency** [<http://health.nih.gov/topic/ProstateCancer>]
42. Chatterjee B: **The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer.** *Mol Cell Biochem* 2003, **253**(1-2):89-101.
43. Daneshgari F, Crawford ED: **Endocrine therapy of advanced carcinoma of the prostate.** *Cancer* 1993, **71**(3 Suppl):1089-1097.
44. Gronberg H: **Prostate cancer epidemiology.** *Lancet* 2003, **361**(9360):859-864.
45. **Estimativa 2008. Incidência de Câncer no Brasil**
46. Aberto M (ed.): **Biologia molecular básica** Porto Alegre; 2003.
47. Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR: **Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR.** *Mol Cell Probes* 2001, **15**(5):307-311.
48. Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH: **beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels.** *Thorax* 2002, **57**(9):765-770.
49. Zhong H, Simons JW: **Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **259**(3):523-526.
50. Deindl E, Boengler K, van Royen N, Schaper W: **Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries.** *Mol Cell Biochem* 2002, **236**(1-2):139-146.
51. Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrola T, Ylikoski E, Warrington JA, Lahesmaa R: **Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR.** *Anal Biochem* 2001, **299**(1):63-70.
52. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A: **Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **313**(4):856-862.

53. Schmittgen TD, Zakrajsek BA: **Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR.** *J Biochem Biophys Methods* 2000, **46**(1-2):69-81.
54. Spanakis E: **Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls.** *Nucleic Acids Res* 1993, **21**(16):3809-3819.
55. Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP: **Quantification of lane-to-lane loading of poly(A) RNA using a biotinylated oligo(dT) probe and chemiluminescent detection.** *Biotechniques* 1995, **19**(5):712-715.
56. Warner JR: **The economics of ribosome biosynthesis in yeast.** *Trends Biochem Sci* 1999, **24**(11):437-440.
57. **Hugo Gene Nomenclature Committee**
[<http://www.genenames.org/index.html>]
58. **NCBI Entrez Gene - Genes and mapped phenotypes - ALAS1**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/211>]
59. **NCBI Entrez Gene - Genes and mapped phenotypes - HPRT1**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3251>]
60. **NCBI Entrez Gene - Genes and mapped phenotypes - B2M**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/567>]
61. **NCBI Entrez Gene - Genes and mapped phenotypes - YWHAZ**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7534>]
62. **NCBI Entrez Gene - Genes and mapped phenotypes - SDHA**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6389>]