



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

RODRIGO BACELAR DA COSTA SILVA

**MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDOS
NUCLÉICOS A PARTIR DE TECIDOS PROSTÁTICOS
PARAFINIZADOS**

Recife, 2009

RODRIGO BACELAR DA COSTA SILVA

**MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDOS
NUCLÉICOS A PARTIR DE TECIDOS PROSTÁTICOS
PARAFINIZADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas, CCB-UFPE, no nível Mestrado, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em ciências biológicas.

TITULARES



Prof. Dr. **Luiz Bezerra de Carvalho Júnior** - (Orientador/UFPE)

Prof. Dr. **Nicodemos Teles de Pontes Filho** - (UFPE)



Prof. Dr. **Danielly Bruneska Gondim Martins**- (UFPE)

Recife, 2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nilson Alberto da Costa Silva e Telma Lúcia Bacelar da Costa Silva, meus melhores amigos, que nunca mediram esforços para me ajudar nos momentos mais difíceis da minha vida. E aos meus filhos, Lucas Bacelar e Marina Bacelar, por mostrar-me o que significa o amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador, **Luiz Carvalho**, uma das minhas fontes de admiração e inspiração, por nunca duvidar da capacidade de seus orientados, por sempre estar presente quando necessitei e pela imensa paciência com este orientando que tanto o fez perder alguns fios de cabelo de preocupação durante o decorrer deste trabalho;*

*Aos meus grandes amigos **Mário Ribeiro e Jorge Luiz**, que realmente tiveram muito carinho e principalmente paciência comigo, nunca se negan me ajudar e sempre trazendo uma palavra amiga. Não teria desenvolvido trabalho sem a ajuda deles.*

*A meu co-orientador e amigo, **Paulo Souza**, sempre presente desde a minha época de "IC", nunca se negando a me dar alguma explicação, mesmo estando muito ocupado. Muito obrigado pela paciência e preocupação que demonstrou por mim.*

*A meu amigo **Sérgio Santos**, companheiro presente na labuta do laboratório, como também trazendo sempre uma palavra amiga nos momentos mais difíceis.*

*Aos meus irmãos, **Rafael Bacelar e Rayane Bacelar**, pelo amor e companheirismo sempre doados a mim;*

Aos amigos(as):

***Vasco Malta, Marcelo Paiva, Luciano Melo, Albino Dantas, Carmelita Cavalcante, Kilder Alves, Eduardo Beltrão** pela amizade e conselhos sempre muito bem vindos durante todo o meu caminhar acadêmico.*

E a todos àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi otimizar um protocolo de extração do RNA de fragmentos de tecidos tumorais de próstatas, contendo hiperplasia e adenocarcinoma, fixados em formol e conservados em blocos de parafina. Em seguida, a qualidade do RNA extraído foi avaliada mediante a amplificação por PCR do exon 4 do gene TP53, onde se observa um polimorfismo no códon 72 muito relacionado com processos cancerígenos em vários órgãos. Os resultados obtidos demonstraram que foi possível aperfeiçoar um protocolo para detecção do RNA a partir de tecidos tumorais de próstatas parafinizados, sem utilizar inibidores de RNase usualmente empregados em semelhantes protocolos.

Palavras-chave: Tecido parafinado, extração de RNA, cDNA e tumores prostáticos

ABSTRACT

This study aimed to optimize a protocol for RNA fragments extraction from tissues of prostate tumor, including adenocarcinoma and hyperplasia, fixed in formalin and preserved in paraffin blocks. Then, the quality of the extracted RNA was evaluated by PCR amplification of exon 4 of the TP53 gene, where it has been observed a polymorphism in codon 72 very related to carcinogenic processes in several organs. The results showed that it was possible to refine a protocol for RNA detection from paraffinized tumor tissues of prostate without using RNase inhibitors usually employed in similar protocols.

Word-key: paraffinized tissue, extration of RNA, cDNA and prostate tumors

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para análise do polimorfismo da p53 no códon 72.....	29
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da morfologia normal da Próstata (Fonte: www.caring4urology.com).....	11
Figura 2. Corte histológico de uma próstata normal, enfocando uma de suas glândulas túbulos-alveolares (magnificação 200x).....	11
Figura 3. Próstata com HPB. (a) HPB em grau leve causando pouca obstrução da uretra; (b) HPB em grau moderado causando estreitamento na uretra; (c) HPB em grau severo resultando numa obstrução da uretra. (Fonte: www.medicaangelus.com.mx).....	13
Figura 4. Heterogeneidade das vias de sinalização utilizadas pela proteína p53 (Klumb; Cavalcante Júnior, 2002).....	18
Figura 5. Esquema da padronização da extração do RNA a partir de amostras de tecidos parafinizados de próstata.....	30
Figura 6. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Amostras de RNA extraídos a partir de cortes de um mesmo bloco de tecido parafinado, contendo 40 mg cada, utilizando diferentes intervalos de digestão pelo tampão de lise. Linha 1: 24h; Linha 2: 48h; Linha 3: 72h.....	31
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose do RNA total. A- RNA extraído de tecido fresco e recentemente parafinado de neoplasias linfóides (Krobler <i>et al.</i> , 2003). B- RNA extraído de tecido de arquivo parafinado a mais de 05 anos.....	32
Figura 8. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio. Amplificação das amostras de cDNA de tecido parafinado de hiperplasia benigna (Linhas: 4 e 5; 6 e 7; 8 e 9; 10 e 11) e adenocarcinoma (12 e 13; 14 e 15; 16 e 17) de próstata para os polimorfismos do gene TP53 Arginina\Prolina. Linha 1: Padrão de Peso Molecular Ladder 100 pb. Linha 2: Controle negativo Arginina; Linha 3: controle negativo Prolina; Linhas 4;6;8;10;12;14;16 amostras de cDNA de pacientes 07 amplificados com Arginina; Linhas 5;7;9;11;13;15;17 amostras de cDNA dos mesmos 07 pacientes amplificadas com Prolina.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Grau Celsius
µl – Microlitro
cDNA - DNA complementar
DAB - 3´3 Diaminobenzidina
DHT - Diidrotestosterona
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
FFEP - fixadas em formalina e embebidas em parafina
HPB - Hiperplasia Prostática Benigna
HPV - Papiloma vírus humano (human papiloma vírus)
INCA - Instituto Nacional do Câncer
KD – Kilodalton
mM - Milimolar
ng - Nano grama
PACP - Fosfatase Ácida da Próstata Humana
PBS - Tampão Fosfato (phosphate buffer saline)
PCR - Reação da polimerase em cadeia (polimerase chain reaction)
PIN - Neoplasia Intraepitelial Prostática (prostatic intraepithelial neoplasm)
pRb - Proteína do retinoblastoma
PSA - Prostate Specific Antigen (antígeno específico da próstata)
RFLP - análise de restrição de fragmentos polimórficos (restriction fragment length polymorphism)
RNA - Ácido Ribonucléico
rpm - Rotação por minute
RT-PCR - Reação da polimerase em cadeia da transcriptase reversa (polimerase chain reaction reverse transcriptase)
SVO - Serviço de Verificação de Óbito
TNM - Sistema de Estadiamento para Tumores Malignos (T: tumor, N: linfonodo, M: metástase)
UV - Ultra violeta

SUMÁRIO

Pág

RESUMO	
ABSTRACT	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviações	
1. REVISÃO DA LITERATURA	10
1.1. A Próstata	10
1.2. Distúrbios de crescimento da próstata	12
1.3. Hiperplasia prostática benigna (HPB)	12
1.4. Câncer de próstata	14
1.5. Gene p53, supressor do crescimento celular	17
1.6. Extração de ácidos nucléicos de tecidos fixados e parafinizados	20
2. OBJETIVOS	23
3. ARTIGO	24
3.1 Introdução	25
3.2 Metodologia	27
3.2.1 Seleção dos casos	27
3.2.2 Extração de Ácidos Nucléicos	27
3.2.3 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)	28
3.3 Resultados e Discussão	30
4. CONCLUSÕES	34
5. PERSPECTIVAS	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	45
1 – Aprovação do comitê de ética	45
2 – Normas para submissão do artigo	46

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A Próstata

A próstata desenvolve-se durante a 12^a semana embrionária sobre influência do hormônio diidrotestosterona (DHT) e tem sua diferenciação completa no 4^o mês da gestação (Tanagho, 1992).

Esta glândula consiste de uma delgada cápsula fibrosa sob a qual estão fibras de músculo liso, o estroma prostático, composto de tecido conjuntivo e elástico e fibras musculares lisas, nas quais estão mergulhadas as glândulas epiteliais, que drenam para ductos excretores, localizados no assoalho da uretra (Tanagho, 1994).

As secreções prostáticas são constituídas de fosfatases e de substâncias orgânicas e inorgânicas que participam da constituição do líquido seminal, auxiliando a atividade metabólica dos espermatozóides (Tuncel *et al.* 2005).

Em 1990, McNeal propôs um conceito de anatomia regional baseado na histologia e anatomia da próstata (Narayan, 1994). Desta forma, a mesma foi dividida em 5 zonas: **zona fibromuscular anterior**, que contém 30% do volume da próstata, nenhum elemento glandular e praticamente nenhum músculo liso; **zona periférica**, considerada a maior subdivisão anatômica que contém 75% do tecido glandular da próstata, sendo o local onde quase todos os carcinomas se desenvolvem, por isso durante a biópsia esta região é sempre um importante alvo; **zona central**, que contém 25% do tecido glandular, sendo diferenciada da zona periférica pela arquitetura da glândula e detalhes das células, incomum a carcinogênese; **zona pré-prostática**, que tem função de esfíncter durante a ejaculação para prevenir o refluxo do líquido seminal para a bexiga e a **zona de transição**, que apresenta menos de 5% da massa glandular normal da próstata, entretanto, tem importante função por ser o local de origem da hiperplasia benigna da próstata (Coffey, 1992).

A próstata é uma glândula genital acessória produtora de secreções essenciais para a função reprodutiva masculina (Junqueira; Carneiro, 2004), que possui forma de pirâmide invertida onde no adulto normal mede

aproximadamente 4,0x3,0x2,5 cm de diâmetro e pesa aproximadamente de 15 a 20 g (**Figura 1**).

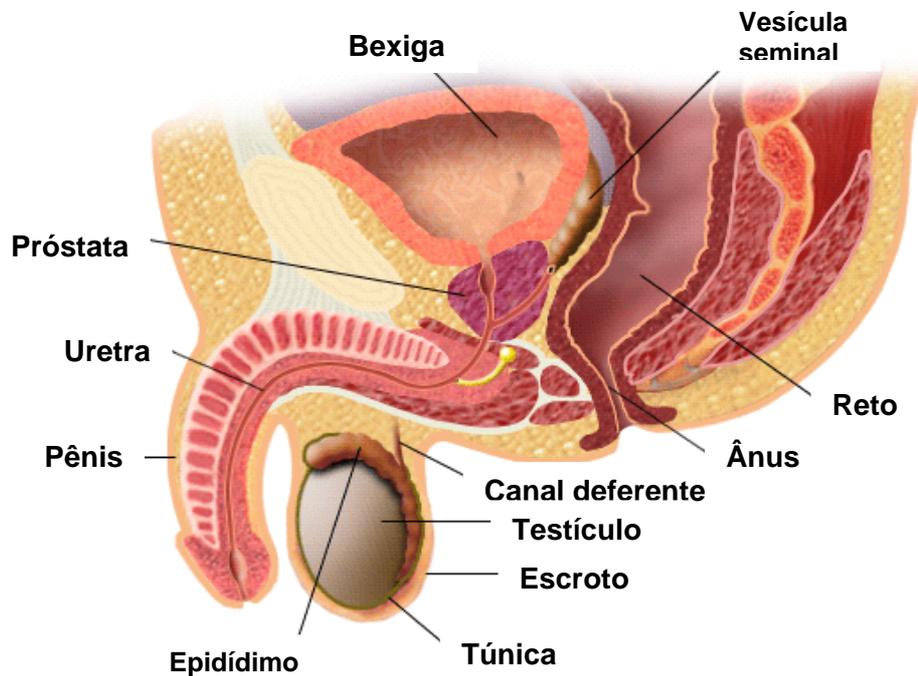


Figura 1. Esquema da morfologia normal da Próstata
(Fonte: www.caring4urology.com)

A próstata também pode ser considerada em duas porções distintas: glândula interna e glândula externa formadas por um conjunto de 30 a 50 glândulas túbulos-alveolares ramificadas (**Figura 2**).

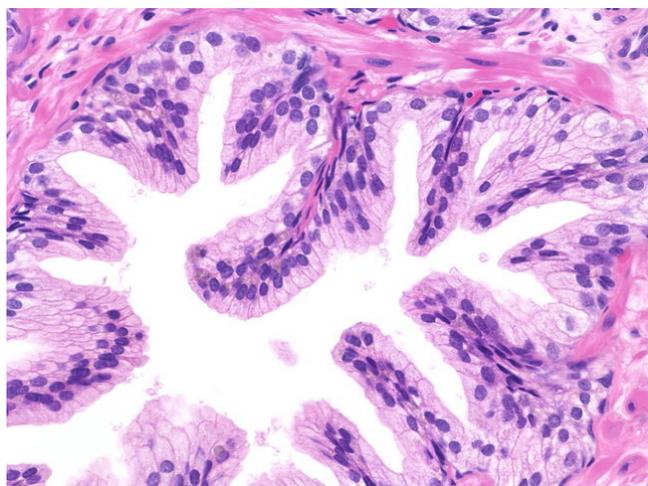


Figura 2. Corte histológico de uma próstata normal, enfocando uma de suas glândulas túbulos-alveolares (magnificação 200x)

A próstata, como as outras glândulas acessórias, tem seu crescimento e manutenção regulada pela presença constante da testosterona no sangue. Existem outros andrógenos capazes de estimular a próstata, entretanto, estes não fazem parte da via principal (Coffey, 1992).

Qualquer desequilíbrio na concentração desses hormônios ou mesmo, em receptores dos mesmos ou, ainda, em qualquer outra via que influencie a homeostase do órgão, pode gerar diferentes patologias.

1.2 Distúrbios de crescimento da próstata

O controle da divisão e da diferenciação celular é feito por um sistema integrado e complexo, que mantém a população celular dentro de limites fisiológicos. Qualquer alteração nesse controle resulta em distúrbios tanto do crescimento como na diferenciação ou ambos ao mesmo tempo. Dentro desse contexto, a próstata pode ser acometida por dois principais distúrbios tumorais: hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (Robbins *et al.*, 2005).

Os tumores benignos, por exemplo, a neoplasia intraepitelial prostática (PIN) apresenta crescimento lento e expansivo, sendo bem tolerado pelo organismo do hospedeiro. Suas células se dispõem de forma harmônica em relação ao estroma além de serem raramente sujeitos a processos degenerativos importantes como necrose ou hemorragia (Rincon *et al.*, 2004).

Dentre os diversos distúrbios prostáticos que podem gerar lesões tumorais observa-se uma grande incidência de Hiperplasias e neoplasias (Rincon *et al.*, 2004).

1.3 Hiperplasia prostática benigna (HPB)

Esta doença, conhecida como a mais comum entre os tumores benignos, é responsável pela maioria dos distúrbios urinários que acometem

homens com idade superior a 50 anos e por 20 a 30% das prostatectomias radicais nos indivíduos que vivem até 80 anos (Phipps *et al.*, 2005).

As primeiras alterações iniciam-se por volta dos 35 anos de idade e consistem em nódulos microscópicos no estroma que surgem ao redor das glândulas periuretrais. Esses nódulos podem ser compostos tanto de elementos glandulares quanto fibromusculares ou podem ser mistos (Narayan *et al.*, 1994).

Relativamente incomum abaixo de 50 anos (20%), muito comum entre os 50 e os 60 anos de idade (70%), e quase a regra entre os 70 e os 80 anos (90%), o HPB é doença característica da glândula interna: 95% originando-se na zona de transição e 5% a partir do tecido glandular periuretral, ela pode ocorrer em grau leve (**Figura 3a**), moderado (**Figura 3b**) ou severo (**Figura 3c**).

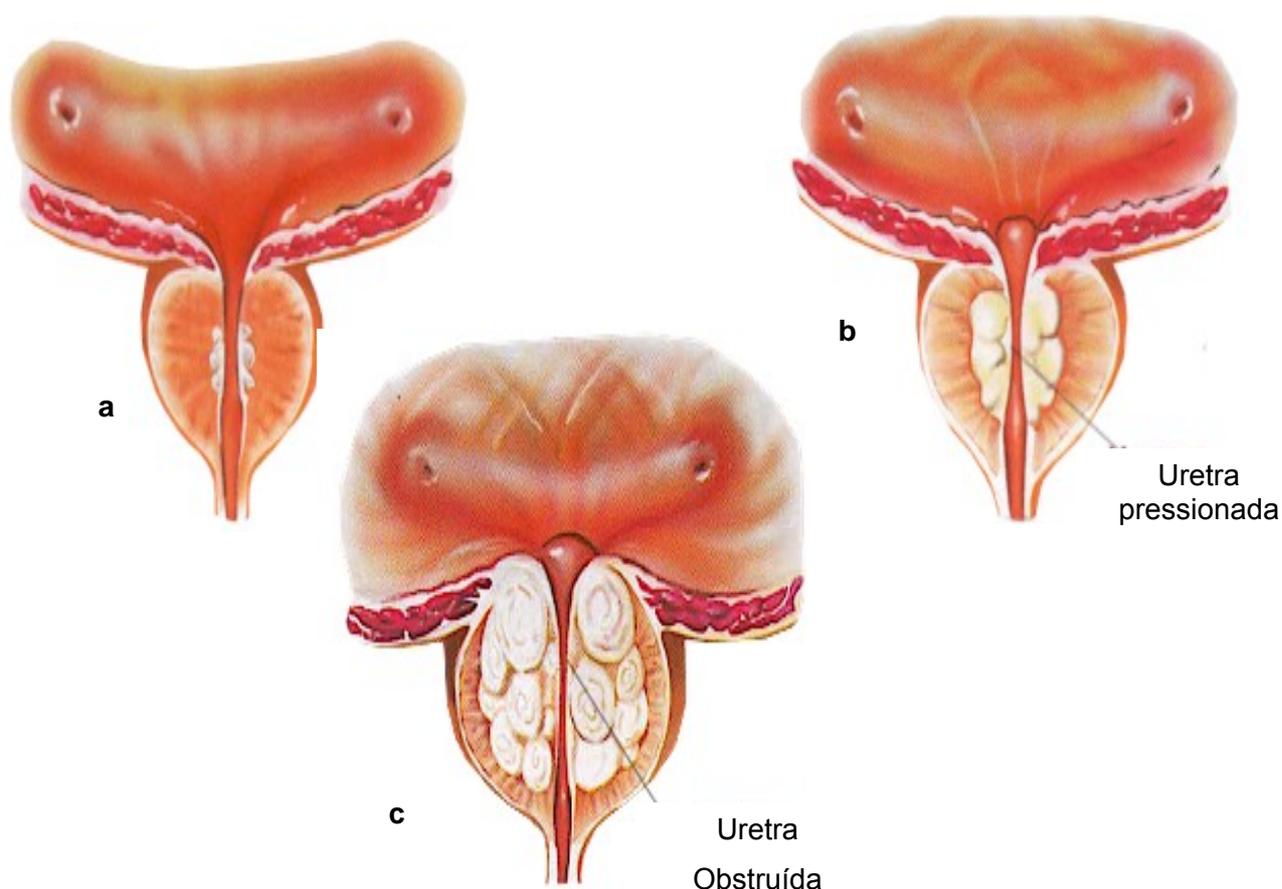


Figura 3. Próstata com HPB. (a) HPB em grau leve causando pouca obstrução da uretra; (b) HPB em grau moderado causando estreitamento na uretra; (c) HPB em grau severo resultando numa obstrução da uretra. (Fonte: www.medicaangelus.com.mx)

A hiperplasia do tecido glandular periuretral estende-se em direção cranial, fazendo compressão sobre o assoalho vesical. Essa compressão era designada anteriormente como “hipertrofia do lobo mediano”. A maioria dos aumentos da zona de transição é arredondada e simétrica, mas ocasionalmente pode haver nódulos hiperplásicos exofíticos crescendo em direção à zona periférica (Phipps *et al.*, 2005).

A macroscopia os nódulos hiperplásicos são facilmente visualizados, pois comprimem o restante do tecido prostático. O HPB pode ocorrer sob três formas histopatológicas distintas, a 1ª: glandular, podendo causar aumento do antígeno prostático específico (prostate specific antigen - PSA), 2ª: intersticial, e 3ª: focal (adenoma) (Prando *et al.*, 1997). Microscopicamente, a nodularidade pode ser devida à proliferação ou dilatação glandular ou por crescimento do estroma fibromuscular, que passa a representar mais de 70% do peso da glândula (Hricak *et al.*, 2007).

Várias hipóteses com relação à histologia, hormônio e idade têm sido sugeridas para explicar a etiologia da HPB, entretanto, esta ainda continua pouco conhecida. Mas já se sabe que é necessário para o desenvolvimento da HPB, o envelhecimento e a presença dos testículos, os quais produzem a testosterona que é convertida em DHT, necessária para o crescimento e manutenção da próstata. Dentro deste contexto, acredita-se que os andrógenos seriam necessários para o início da HPB e não para sua manutenção (Walsh *et al.*, 1992; Narayan *et al.*, 1994).

1.4 Câncer de Próstata

O câncer de próstata é o mais freqüente entre os homens, exceto pelo não melanoma, com risco estimado de 69/100.000 na região Sul, 63/100.000 na região Sudeste, 47/100.000 na região Centro-Oeste, 38/100.000 na região Nordeste e, 22/ 100.000 na região Norte (INCA, 2008).

Em função de suas altas taxas de incidência e mortalidade, lesões tumorais com a hiperplasia prostática benigna e neoplasias de próstata representam um sério problema de saúde pública no Brasil (INCA, 2008).

Acredita-se que o câncer de próstata se desenvolva no período de maior atividade androgênica, tendo progressão lenta, juntamente com a redução das quantidades de hormônios (Robbins *et al.*, 2005).

Alguns autores sugerem que pacientes apresentando neoplasia intraepitelial prostática (PIN) de alto grau, juntamente com mutações no gene P53, têm maiores chances de desenvolver o câncer de próstata (Downing *et al.*, 2001).

Embora a incidência desse câncer seja elevada, existe um número muito maior de casos dessa doença, que ocorrem sem que haja sintomas clínicos. Vários pacientes morrem de doenças concomitantes, antes da manifestação clínica do câncer de próstata, já os pacientes que o manifestam, provavelmente, iniciaram a carcinogênese mais jovens ou apresentaram crescimento tumoral mais acelerado (Postma *et al.*, 2005).

A maioria dos cânceres de próstata é multifocal, sendo que 70% originam na zona periférica; 15 a 20% na zona central e 10 a 15% na zona de transição (Narayan *et al.*, 1994).

Na maioria dos casos, o tumor apresenta um crescimento lento, de longo tempo de duplicação, levando cerca de 15 anos para atingir 1 cm³ e independe do crescimento normal da glândula, o que faz com que alterações miccionais possam inexistir. Por este motivo, o exame periódico deve ser realizado, mesmo que não existam sintomas, para que o câncer possa ser detectado precocemente, com maiores chances de tratamento e cura (Raja *et al.*, 2006).

O grande número de trabalhos realizados com esta neoplasia é justificado pela alta incidência desta patologia, que representa cerca de 40% dos tumores que acometem os homens, bem como pela necessidade de compreender melhor a etiologia dessa malignidade, tão complexa e heterogênea (Akimoto *et al.*, 2006).

Apesar de não existir uma inter-relação consistente, os fatores ambientais e genéticos parecem influenciar na etiologia do câncer de próstata. Assim, os hormônios masculinos apresentam papel crucial na promoção do tumor, porém, não desempenham a mesma função na manutenção desses (Walsh; Worthington *et al.*, 1998; Gua *et al.*, 2006).

Enquanto a incidência está ligada às características demográficas da população, a mortalidade alta é causada pelo retardo do diagnóstico, que

favorece a ocorrência de tumores com alta capacidade biológica de invasão local e de disseminação para outros órgãos. O tratamento da doença depende do estágio do tumor, o câncer em estágio inicial pode ser potencialmente curado com a prostatectomia, ou tratamento com radioterapia, porém aqueles em estágio avançado, ou que apresentam metástase ainda são considerados incuráveis (Turkeri *et al.*, 2004).

Um dos produtos da próstata, o antígeno específico da próstata (prostate specific antigen - PSA), é secretado no sangue e sua concentração no soro aumenta frequentemente na presença de tumores malignos, o que é usado para diagnóstico e controle de tratamento do tumor (Junqueira; Carneiro, 2004).

De acordo com diversos autores, os programas de detecção precoce, as medidas PSA e o toque digital, devem ser realizados anualmente a partir de 50 anos de idade (Tierney *et al.*, 1996; Smart, 1997; Merrill *et al.*, 2000), bem como a biópsia dirigida pelo ultra-som transretal aumentam significativamente a frequência do câncer localizado, possibilitando melhores prognósticos aos pacientes (Walsh; Worthington, 1998; Srougi *et al.*, 1999; Saveria *et al.*, 2006).

Mudanças morfológicas súbitas e alterações moleculares vêm sendo descritas em tecidos aparentemente normais de próstata com PIN e casos confirmados de câncer de próstata (Montironi *et al.*, 2000).

O desenvolvimento da neoplasia intraepitelial prostática é caracterizada pelo aumento da expressão de alguns marcadores biológicos que possuem influência no potencial proliferativo das células displásicas (Myers *et al.*, 1996). Por exemplo, a fosfatase ácida da próstata humana (PACP) pode diminuir o crescimento de células cancerígenas, com isso a diminuição de sua expressão pode estar envolvida na progressão do câncer de próstata (Lin *et al.*, 2002). Desta forma, conhecer a regulação da proliferação celular através de alterações bioquímicas específicas ao câncer de próstata é de grande importância para o desenvolvimento de novas soluções (Lin *et al.*, 2002).

Assim, diversos estudos têm identificado possíveis candidatos a marcadores moleculares para as doenças tumorais, dentre estes podemos citar as proteínas BCL-2, Ki-67 e a p53 (Janneke *et al.*, 2000; Oltersdorf *et al.*, 2005; Buhmeida *et al.*, 2006). Esta última, a p53, têm sido monitorada em diferentes aspectos das lesões tumorais prostáticas (Buhmeida *et al.*, 2006).

1.5 Gene p53, supressor do crescimento celular

Este gene localiza-se no braço curto do cromossomo 17(17p13.1), apresenta 11 exons e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD, constituída de 393 aminoácidos (Pau Ni *et al.*, 2006). Descoberta por Lane e Crawford em 1979, esta proteína desempenha um papel central na resposta celular que inclui a parada do ciclo celular permitindo o reparo do dano no DNA, ou indução da morte celular (Klumb; Cavalcante Júnior, 2002).

Esta proteína forma um tetrâmero capaz de se ligar a seqüências específicas do DNA sendo um fator de transcrição, por isso controla de forma positiva ou negativa a expressão de diversos genes envolvidos em várias vias celulares (**Figura 4**). Dentre as vias mais importantes se destacam a inibição da replicação do DNA, funcionando como uma molécula de “check-point” da progressão da célula no ciclo celular da fase G1 para a fase S e também da fase G para fase M (Klumb; Cavalcante Júnior, 2002).

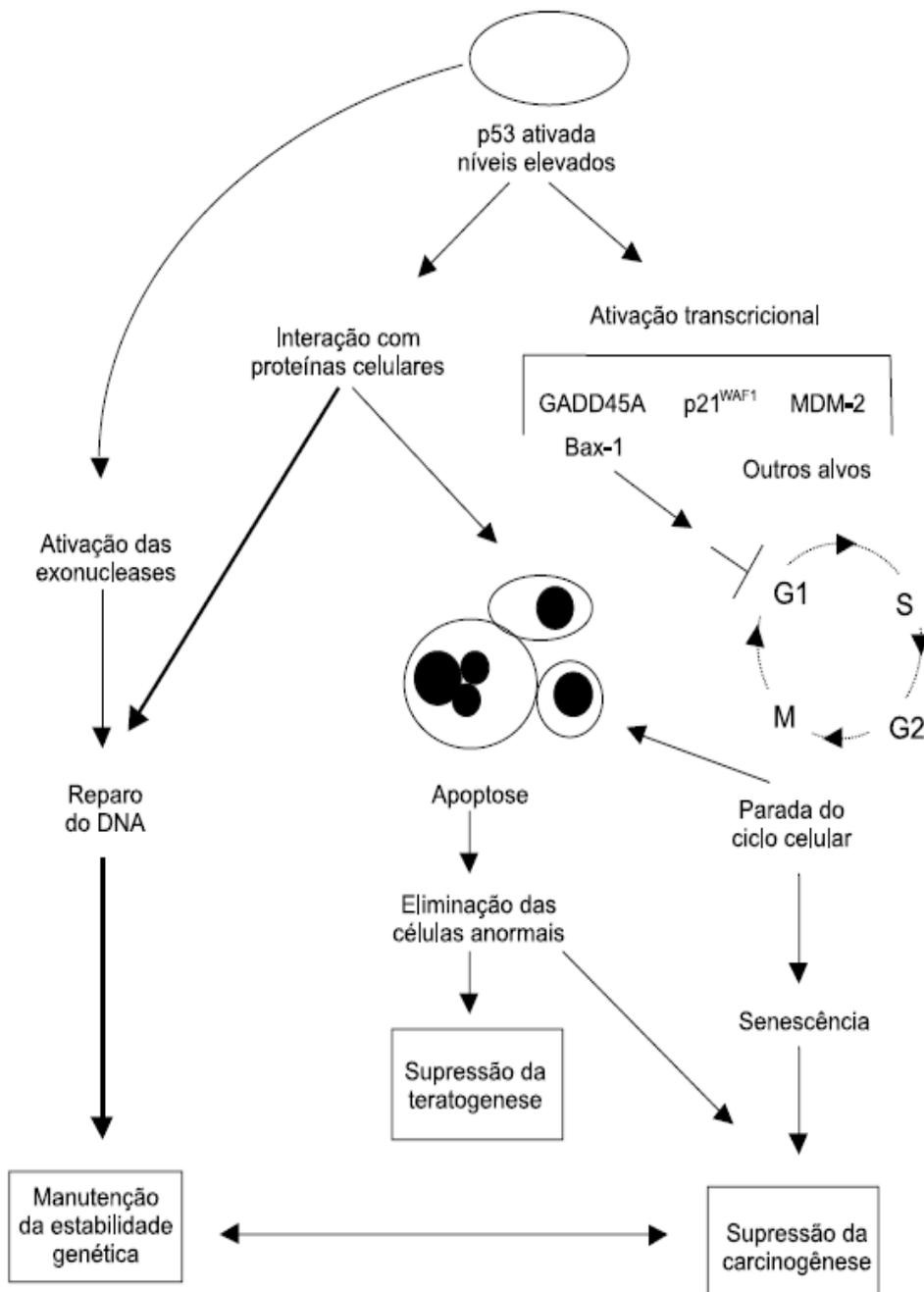


Figura 4. Heterogeneidade das vias de sinalização utilizadas pela proteína p53 (Klumb; Cavalcante Júnior, 2002).

A proteína p53 tem sido responsabilizada por uma série de funções regulatórias no desenvolvimento celular, é expressa a partir de um gene regulador chave do ciclo celular que, quando sofre mutações, leva ao desenvolvimento de neoplasias malignas, pois desempenha papel importante nas vias de carcinogênese de diferentes tipos de tecidos, atuando, portanto,

como um gene supressor tumoral em condições normais, ou seja, bloqueia a proliferação celular (Park *et al.*, 2007). Por esse motivo a p53 está no ponto de convergência de várias rotas sinalizadoras distintas (Morris *et al.*, 2008).

A atuação dela está relacionada à ativação do gene p21, que transcreve uma proteína de 21 quilodaltons (p21) e que inibe a fosforilação da pRb (proteína do retinoblastoma) impedindo a liberação da E2F, parando o ciclo na fase G₁ e induzindo apoptose. Também pode parar o ciclo em G₂ mediante a activação da proteína 14-3-3σ, que seqüestra o complexo ciclina B – CDK 1 fora do núcleo. A p53 pode ainda, ativar genes reparadores do DNA (*mlh-1* e *mlh-2*) protegendo de mutações e conferindo estabilidade genética (Burgués *et al.*, 2005). Além disso, a p53 inibe a expressão de bcl-2 e promove a síntese de Bax, ou seja, contribui para a morte celular programada ou apoptose (Inoue *et al.*, 2005).

A proteína mutante p53 inativa a proteína p53 normal ocasionando perda da função de supressão tumoral desse gene, o que permite a atividade oncogênica. A proteína p53 é metabolicamente lábil, sendo rapidamente degradada no núcleo com uma meia-vida variando entre 6 a 30 minutos e provavelmente por esse motivo é usualmente indetectável em células de tecidos normais. A forma mutante dessa proteína exhibe um aumento de sua meia-vida, podendo ser detectada por técnicas imuno-histoquímicas em muitos tumores (Horn *et al.*, 2007).

Em pacientes com neoplasia maligna a avaliação dos níveis de p53 tem sido considerado como teste complementar para displasia e fator prognóstico para o câncer (Lashner *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2008).

Em câncer de próstata, freqüentemente são vistas mutações deste gene tanto nas células germinativas quanto nas somáticas. A proteína p53 exhibe um polimorfismo para o aminoácido 72, resultando em um resíduo de prolina (CCC) ou um resíduo de arginina (CGC). Podemos, portanto, determinar a presença de três genótipos: homocigoto para Arg (Arg/Arg p53), heterocigoto (Arg/Pro p53) ou homocigoto para Pro (Pro/Pro p53) (Huang *et al.*, 2004).

Não existe um consenso, entre os pesquisadores, de qual genótipo possa estar associado ao desenvolvimento do câncer ou a hiperplasia da próstata, ou se realmente podemos fazer esta correlação. Segundo Henner e colaboradores (2001) os indivíduos que apresentarem genótipo Arg/Arg são mais susceptíveis

a desenvolver o câncer de próstata quando comparados aos com genótipo Pro/Pro. O que contradiz com os resultados obtidos em estudos *in vitro*, onde os portadores do alelo Pro apresentariam menor eficiência na supressão de possíveis transformações nas células, como também na velocidade de apoptose (Thomas *et al.*, 1999).

Estudos realizados na população de Taiwan indicam que não existe correlação significativa entre o polimorfismo do códon 72 da p53 e o câncer ou hiperplasia da próstata, mesmo já tendo sido comprovada alterações na expressão e mutações desta proteína em vários pacientes portadores destas patologias (Huang *et al.*, 2004).

Alguns autores, que estudaram câncer cervical e correlacionaram este polimorfismo com a presença de HPV, sugerem que os indivíduos portadores de Arg/Arg p53 são mais susceptíveis a este tipo de câncer (Storey *et al.*, 1998; Van Duin *et al.*, 2000). O que pode ser explicado pelo fato da oncoproteína produzida na fase precoce do seu ciclo replicativo, a E6, atua como ativador do processo de degradação da proteína p53 (Anschau *et al.*, 2005).

Dos trabalhos desenvolvidos até o presente momento, apenas um realizou estudos sobre o polimorfismo da p53 utilizando o DNA extraído a partir de tecido parafinado (Leiros *et al.*, 2005).

1.6 Extração de ácidos nucléicos de tecidos fixados e parafinizados

As amostras de tecido humano obtidas de procedimentos cirúrgicos são rotineiramente fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFEP) para arquivamento em longo prazo, sendo assim, a maioria das instituições possuem grandes arquivos de blocos de parafina. Esses arquivos representam uma importante fonte de material para estudos retrospectivos (Ribeiro-Silva; Garcia, 2008).

A formalina tamponada a 10% é o fixador mais utilizado em laboratórios de patologia, pois além de garantir a integridade morfológica e a antigenicidade do tecido, também é barata e fácil de preparar (Yamashita, 2007). Mas o formaldeído não garante uma boa integridade de algumas macromoléculas

presentes no interior das células, como por exemplo, os ácidos nucléicos que podem sofrer modificações em suas bases (Masuda *et al.*, 1999).

Este fixador pode adicionar um grupo monometilol aos grupos amino ou imino das bases, além de formar ligações cruzadas, pontes de metileno, entre ácidos nucléicos e proteínas e também ácidos nucléicos com ácidos nucléicos, não sendo possível, em temperatura ambiente, a ligação entre duas moléculas de DNA (Yamashita, 2007; Ribeiro-Silva; Garcia, 2008). As ligações entre ácidos nucléicos e proteínas são bem menos estáveis do que as que se formam entre proteínas, por isso as primeiras podem ser quebradas pelo calor (Jackson, 1999).

O estudo de tecidos parafinizados tem vantagem, por exemplo, sobre os congelados, pois os primeiros preservam uma qualidade morfológica superior e permite análises retrospectivas, além de numerosos, facilmente disponíveis e permitirem, em cortes seriados, a identificação de lesões precursoras de tumores invasivos (Barea *et al.*, 2004a). Com esta metodologia, também é possível manter a integridade química dos ácidos nucléicos e das proteínas (Stanta *et al.*, 2006). Contudo, outros autores descrevem que a fixação do tecido, dependendo do tempo e do fixador utilizado, pode resultar na degradação do DNA (Akalu *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 2004).

Novas técnicas vêm sendo desenvolvidas, na área da biologia molecular para facilitar o estudo de neoplasias (Brum *et al.*, 2005). O desenvolvimento da biologia molecular e da genética nas últimas décadas permitiu o estabelecimento de um amplo corpo de técnicas aplicadas na investigação biológica que tiveram profunda influência nas pesquisas médicas (Fernandes *et al.*, 2004).

Vários estudos foram desenvolvidos utilizando-se técnicas como o PCR, RFLP e RT-PCR (Leiros *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2004; Hamatani *et al.*, 2006). Estas técnicas apresentam-se como um método muito mais sensível para a detecção de agentes infecciosos, bem como de desordens genéticas (Junghyun *et al.*, 2001).

Assim, pesquisadores têm utilizado espécimes clínicos de arquivos para investigar possíveis relações entre alterações genéticas e as doenças, bem como para identificar alteração na expressão de algumas proteínas associadas a metástases de tumores primários (Fernandes *et al.*, 2004).

A possibilidade de espécimes arquivados por mais de 40 anos serem analisados pela técnica de PCR pode auxiliar no estabelecimento da associação entre agentes patogênicos e cânceres e/ou estudos de expressões gênicas, potencialmente associadas (Barea *et al.*, 2004b).

Outra vantagem é que o DNA extraído de tecido fixado e parafinado também pode ser útil para estudos de instabilidade de microssatélites, compreendendo uma vasta fonte de material para a construção de bancos de dados para identificação de indivíduos ou determinação da constituição genética de uma dada população (Kullmann *et al.*, 1998).

Geralmente, os métodos de extração de ácidos nucléicos a partir de tecido parafinado requerem múltiplos tratamentos com Xilol para a desparafinização, seguidos de digestão com proteases, extração do DNA com fenol-clorofórmio e precipitação com álcool isoamílico (Rivero *et al.*, 2006).

Um fator limitante deste tipo de estudo é a obtenção do DNA ou RNA, em condições propícias para a amplificação (Akalu *et al.*, 1999). A capacidade de isolar ácidos nucléicos de células em quantidades, pureza e integridade suficiente representam um requerimento essencial de praticamente todas as análises de biologia molecular (Penland *et al.*, 2007).

Na tentativa de se evitar ao máximo a degradação do RNA ao longo da extração, já que a própria fixação do tecido é muito prejudicial para a integridade dos ácidos nucléicos, é necessário aprimorar a técnica de extração de RNA de amostras de arquivo, que é muito longa e passível de contaminação (Yamashita, 2007). É imprescindível minimizar a degradação do RNA que poderia prejudicar as amplificações por RT-PCR e PCR comum (Fernandes *et al.*, 2004). Além disso, a utilização de grande quantidade de inibidores de RNase aumentam o tempo e o custo do procedimento.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver um novo protocolo para extração e amplificação de ácidos nucleicos de amostras de tecido prostático fixado em formol e parafinizado.

Objetivos específicos

- ✓ Padronizar o protocolo de extração de RNA utilizando fenol;
- ✓ Proceder a síntese de cDNA, a partir do RNA obtido de tecido parafinizado;
- ✓ Amplificar o gene TP53 das amostras de tecido parafinizado com hiperplasia benigna e adenocarcinoma pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

3. ARTIGO*

MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS A PARTIR DE TECIDOS PROSTÁTICOS PARAFINIZADOS

Alternative method for nucleic acids obtained from parafinized prostatic tissues

RODRIGO BACELAR DA COSTA SILVA^{1,2}

MARIO RIBEIRO DE MELO-JÚNIOR¹

PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO SOUZA^{1,5}

MARCELO DOS SANTOS PAIVA³

LUIZ BEZERRA DE CARVALHO-JR^{1,4}

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); 2. Mestrado em Ciências Biológicas – CCB/UFPE; 3. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM); 4. Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE; 5. Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

Correspondence: Luiz Bezerra de Carvalho Junior - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário - 50670-910. E-mail: lbcj@hotmail.com.br

* A ser submetido ao **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**

3.1 Introdução

Nas lesões tumorais prostáticas, a análise histopatológica tem grande relevância clínica, contudo os métodos morfológicos quando analisados de forma qualitativa, muitas vezes tem apresentado grande disparidade e variabilidade de resultados entre diferentes observadores (Rashbass *et al.*, 2000; Novik *et al.*, 2000; Wawroschek *et al.*, 2003).

O avanço da biologia molecular e da genética nas últimas décadas permitiu o estabelecimento de um amplo corpo de técnicas aplicadas na investigação biológica que tiveram profunda influência nas pesquisas médicas (Fernandes *et al.*, 2004). Estas técnicas apresentam-se como um método mais sensível para a detecção de agentes infecciosos, bem como de desordens genéticas (Junghyun *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2004; Hamatani *et al.*, 2006).

Assim, pesquisadores têm utilizado espécimes clínicos de arquivos para investigar possíveis relações entre alterações genéticas e as doenças, bem como para identificar alteração na expressão de algumas proteínas associadas a metástases de tumores primários (Fernandes *et al.*, 2004).

Dentre os fatores limitantes deste tipo de estudo, a obtenção do RNA em condições propícias para a amplificação é o principal, já que a fixação em formalina e o conseqüente processamento histológico provocam, em grau variável, degradação e modificação química do RNA, o que pode prejudicar o uso dessas amostras para estudos de expressão gênica (Ribeiro-Silva; Garcia *et al.*, 2008). Por isso, a capacidade de isolar ácidos nucleicos de células em quantidades, pureza e integridade suficiente representa um requerimento essencial de praticamente todas as análises de biologia molecular (Penland *et al.*, 2007).

A proteína p53 tem sido responsabilizada por uma série de funções regulatórias no desenvolvimento celular, é expressa a partir de um gene regulador chave do ciclo celular que, quando sofre mutações, leva ao desenvolvimento de neoplasias malignas, pois desempenha papel importante nas vias de carcinogênese de diferentes tipos de tecidos, atuando, portanto, como um gene supressor tumoral em condições normais, ou seja, bloqueia a

proliferação celular (Park *et al.*, 2007). Em pacientes com neoplasia maligna freqüentemente é visto um polimorfismo, como possível fator prognóstico para o câncer, no aminoácido 72 resultando em um resíduo de prolina (CCC) no local do resíduo de arginina (CGC) (Lashner *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2008).

Desta forma, este estudo objetiva obter um novo protocolo para extrair RNA de tecidos prostáticos tumorais que foram fixados em formalina e embebidos em parafina e observar a qualidade do mesmo realizando a amplificação por PCR do códon 72 no gene TP53 a partir do cDNA obtido por RT-PCR, podendo posteriormente servir como modelo para análises de associação com a susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer.

3.2 Metodologia

3.2.1 Seleção dos casos

Foram selecionados blocos de parafina do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), contendo tecidos prostáticos (idades entre 45 e 80 anos). Através de triagem foram escolhidos 20 blocos de parafina contendo fragmentos de tecido prostático com adenocarcinoma (n=7) e hiperplasia prostática benigna (HPB) (n=13), do ano de 2005. O protocolo experimental desenvolvido no presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisas envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE-ofício **277/2008**) (Anexo 1).

3.2.2 Extração do RNA

Foram realizados cortes de 5 µm de cada bloco de tecido parafinizado, e em seguida pesados, usando papel alumínio, em balança analítica para obtenção de amostras contendo 10, 20 e 40mg de tecido. Os tecidos foram transferidos para tubos eppendorf de 1,5 ml, adicionou-se 1 ml de xilol e em seguida foi aquecido a 57°C por 30 minutos. O tubo foi então centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos, desprezado o sobrenadante, seguido de nova troca de xilol para uma melhor remoção da parafina. Lavou-se o precipitado duas vezes com etanol absoluto, sendo cada lavagem precedida de homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm por 3 minutos. Os precipitados obtidos foram submetidos à técnica de extração de RNA modificado do método descrito por Isola *et al.*, 1994. Adicionou-se ao tubo 500µl de tampão de lise (NaCl 500mM; Tris-HCl pH 8,0 500mM; EDTA 100mM; SDS 5%) estéril e proteinase K na concentração final de 500 µg/ml. Os tubos foram mantidos a 56°C em banho-maria por 24 horas, e em seguida adicionou-se 500 µg/ml de proteinase K. Repetiu-se o banho por mais 48h, até praticamente a total dissolução do homogeneizado. Sem submeter a proteinase K a sua temperatura

de inativação, adicionou-se 500µl de fenol saturado e tamponado (pH 8,0), homogeneizou-se, e em seguida o mesmo foi incubado no gelo por 10 min e centrifugado a 12.000 rpm por 20 min (4°C). Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Novamente, acrescentou-se 1 ml de fenol saturado e tamponado (pH 8,0), repetida a incubação e a centrifugação. O sobrenadante foi novamente transferido para novo tubo. Para precipitação do RNA total, adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto gelado, e o tubo deixado overnight a -20°C. O tubo foi centrifugado a 15.000 rpm por 20 minutos (4°C). Lavou-se o precipitado de RNA com etanol 70%, e em seguida ressuspendeu-se, o mesmo, em 30 µl de tampão TE e mantido a 4°C. O RNA extraído foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, utilizando-se um transluminador UV.

3.2.3 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

A transcrição reversa do RNA foi realizada usando M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA) de acordo com as instruções do fabricante numa reação final de 20 µl, contendo 0,5 µg de random primers (Promega, USA), 0,5 mM dNTPs, 5 mM MgCl₂ and 2 µl de RNA. A reação foi colocada a 25°C por 5 min, seguida por 42°C por 1h, e 70°C por 15 min num termociclador automático Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). Dois grupos de pares de primers foram usados para a detecção das seqüências p53-Pro72 e p53-Arg72, respectivamente (Table 1). Os diferentes variantes poderão ser discriminados pelos deferentes tamanhos dos produtos da PCR (Table 1). A PCR foi realizada com *Taq* polymerase - platinum (Invitrogen) num volume final de reação de 20 µl. De uma reação prévia de RT-PCR, 2 µl de cDNA foi usado como template para cada reação da PCR contendo 1 pmol/µl de cada primer, 0.2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂ e 1 unit de *Taq* polymerase - platinum (Invitrogen).

As condições da PCR foram as seguintes para o alelo p53-Pro72: desnaturação a 95°C por 5 min, seguidos de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min e alongamento a 72°C por 1 min. Uma etapa final de alongamento de 10 minutos foi adicionada no último ciclo. Para o

alelo p53-Arg72, as condições da PCR foram idênticas com exceção do anelamento que foi realizada a 62°C por 1 min. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 3 % corado com brometo de etídio. As análises foram realizadas da seguinte forma: 1) se o produto da PCR (136 bp) foi obtido somente com os primers específicos da arginina, o paciente foi considerado homozigoto para arginina, 2) se o produto da PCR foi obtido somente com os primers específicos para prolina (178 bp), o paciente foi considerado homozigoto para prolina, 3) se as amostras amplificaram com ambos os grupos de primers, o paciente foi considerado heterozigoto (Arg/Pro).

Tabela 1. Primers utilizados para análise do polimorfismo da p53 no códon 72.

Alelo	Primer	Seqüência	Produto PCR
p53-Pro72	p53 Pro +	5'GCCAGAGGCTGCTCCCCC3'	178 pb
	p53 -	5'CGTGCAAGTCACAGACTT3'	
p53-Arg72	p53+	5'TCCCCCTTGCCGTCCCAA3'	136 bp
	p53 Arg-	5'CTGGTGCAGGGGCCACGC3'	

3.3 Resultados e Discussão

Para a determinação de um método mais eficiente para obtenção de RNA de tecido prostático parafinizado foram selecionadas quantidades de tecidos contendo 10, 20 e 40mg, os quais foram desparafinizados e digeridos em intervalos de 24h, 48h e 72h (Figura 5).

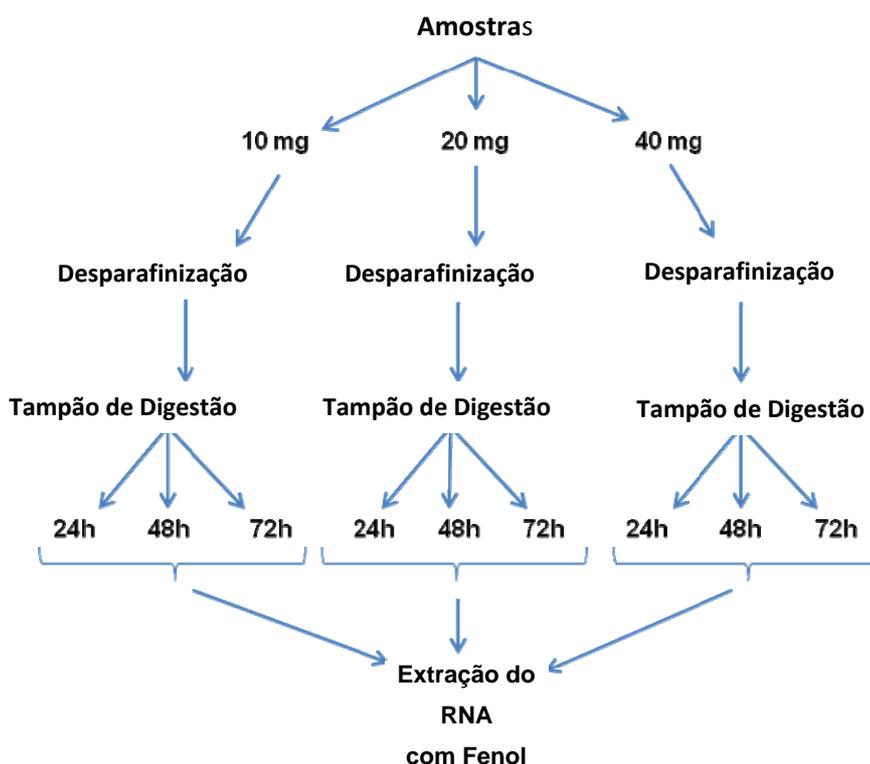


Figura 5. Esquema da padronização da extração do RNA a partir de amostras de tecidos parafinizados de próstata.

Nossos melhores resultados foram obtidos com 40mg de tecido com intervalo de digestão de 72 horas, onde pudemos observar praticamente a total dissolução do tecido (Figuras 6).

Alguns estudos mostram que não só o processo de desparafinização dos tecidos, como também a composição e concentração dos reagentes do tampão de lise são importantes para o processo (Ribeiro-Silva; Garcia, 2008; Yamashita *et al.*, 2007; Korbler *et al.*, 2003), além disso, existem dois outros fatores que se mostram de suma importância para a realização de uma boa extração de RNA que são: o tempo de digestão e a quantidade de tecido

utilizado (Isola *et al.*, 1994; Mesquita *et al.*, 2001). Contudo, nossos resultados contradizem com os de Korbler e colaboradores (2003), que obtiveram resultados satisfatórios na extração de RNA de neoplasias de tecidos linfóides, realizando a digestão do tecido em apenas 16 horas. Entretanto, vale salientar que os tecidos linfóides utilizados por estes autores haviam sido recentemente parafinizados, diferente dos utilizados neste estudo haviam sido parafinizados a pelo menos cinco anos.

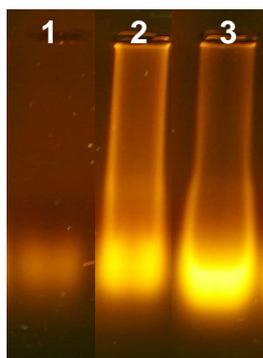


Figura 6. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Amostras de RNA extraídos a partir de cortes de um mesmo bloco de tecido parafinado, contendo 40 mg cada, utilizando diferentes intervalos de digestão pelo tampão de lise. Linha 1: 24h; Linha 2: 48h; Linha 3: 72h.

A figura 7A mostra duas amostras de RNA, isoladas por Korbler e colaboradores, sendo uma de tecido recentemente parafinado e outra de tecido fresco, na qual as amostras de RNA originadas de tecido parafinado aparecem como rastros em gel de agarose e na de tecido fresco observamos três bandas referentes às diferentes formas de RNA ribossomal (18S, 28S e 4-5S). As amostras referentes ao presente estudo foram semelhantes àquelas obtidas no estudo do autor citado anteriormente (figura 7B), o que corrobora com o fato de que obtivemos RNA extraído. Contudo, vale salientar que diferentemente de outros protocolos de extração de RNA que utilizam inibidores de RNases tais como, o sal guanidina tiocianato e/ou o DEPC (Diethylpyrocarbonate), as melhores condições para obtenção de um bom RNA se deu pela lavagem com etanol a 100% e sem inibidor de RNA. A utilização do DEPC acaba tornando o processo mais laborioso, pois todas as reações devem ser preparadas com no mínimo 24h de antecedência e o

mesmo degrada em pouco tempo, facilitando nova contaminação por RNAses externas (Sambrook *et al.*, 1992).

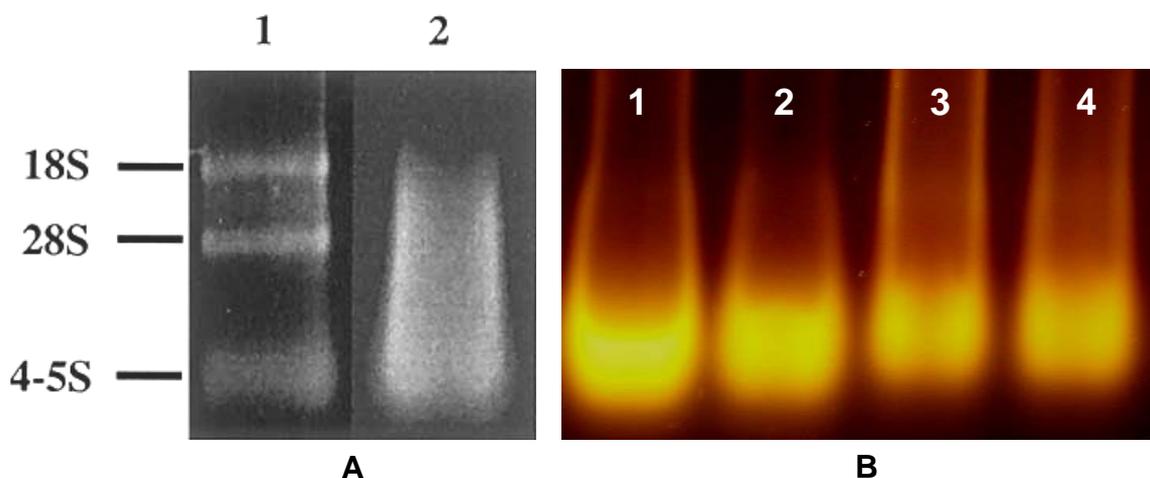


Figura 7. Comparação entre os resultados obtidos por Korbler e colaboradores a partir da extração de RNA de tecidos recentemente parafinizados e frescos de neoplasias linfóides (7A) com a extração do RNA do presente estudo (7B), que foi obtido de tecidos prostáticos parafinizados e arquivados a mais de 05 anos. O RNA total de ambos os estudos foram visualizados após eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio.

Com a finalidade de comprovar a qualidade do RNA extraído por nosso método procedemos com a amplificação do códon 72 do gene TP53, onde pudemos evidenciar a obtenção das bandas de 136pb e 178pb, analisadas em gel de agarose corado com brometo de etídio que representam respectivamente arginina e prolina (figura 8) amplificadas do gene TP53 a partir de amostras obtidas dos tecidos prostáticos parafinizado. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que mostram que fragmentos de DNA entre 100 e 375pb são possíveis de serem amplificados a partir de amostras de cDNA de tecido parafinizado (Yamashita *et al.*, 2007; Korbler *et al.*, 2003). Por outro lado, para fragmentos maiores é comum ocorrer a degradação do material genético, principalmente do RNA, ao longo do processo de parafinização (Jinghuan *et al.*, 2007; Antonov *et al.*, 2005).

Através desta técnica pudemos detectar os três genótipos possíveis para o gene TP53 em 07 pacientes analisados (Figura 8). Três indivíduos que amplificaram apenas com os primers específicos para arginina (linhas 04, 10 e

14) foram denominados homozigotos para arginina, um homozigoto amplificou apenas com os primers específicos para prolina (linha 07) sendo denominado homozigoto para prolina e dois indivíduos foram denominados heterozigotos (linhas 08 e 09; 16 e 17), pois amplificaram com ambos os primers alelos-específicos.

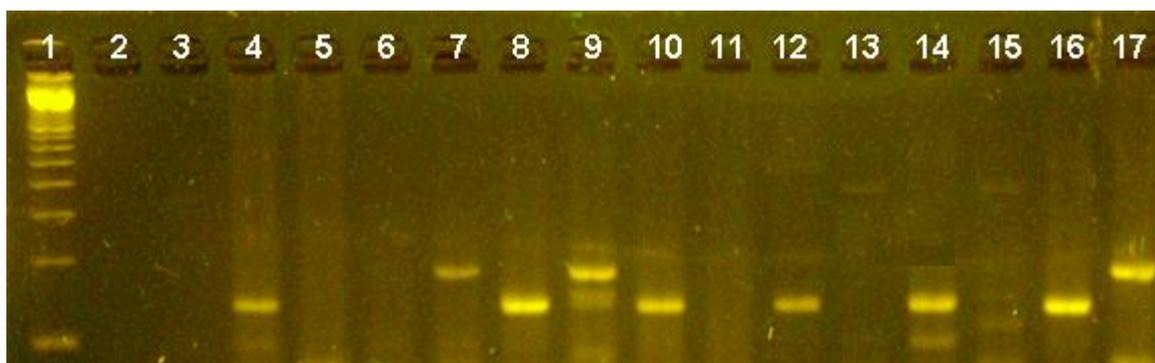


Figura 8. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio. Amplificação das amostras de cDNA de tecido parafinizado de hiperplasia benigna (Linhas: 4 e 5; 6 e 7; 8 e 9; 10 e 11) e adenocarcinoma (12 e 13; 14 e 15; 16 e 17) de próstata para os polimorfismos do gene TP53 Arginina\Prolina. Linha 1: Padrão de Peso Molecular Ladder 100 pb. Linha 2: Controle negativo Arginina; Linha 3: controle negativo Prolina; Linhas 4;6;8;10;12;14;16 amostras de cDNA de pacientes 07 amplificadas com Arginina; Linhas 5;7;9;11;13;15;17 amostras de cDNA dos mesmos 07 pacientes amplificadas com Prolina.

4. CONCLUSÕES

- Com o presente método é possível a extração de grande quantidade de RNA, sendo o mesmo de boa qualidade e não sendo necessária a utilização de inibidores de RNase muito comuns ao processo;
- A partir do RNA obtido, foi padronizado um protocolo de amplificação para obtenção de cDNAs de qualidade para posterior amplificação;
- Comprovamos a qualidade do RNA a partir da amplificação do códon 72 do gene TP53, onde pudemos comprovar o polimorfismo existente neste códon.

5. PERSPECTIVAS

A partir da boa qualidade do material genético obtido em nosso trabalho podemos sugerir estudos futuros onde possamos estabelecer correlações entre o padrão de expressão gênica anormal de algumas proteínas com o perfil imunohistoquímico de tecidos obtidos a partir de vários processos neoplásicos.

Além disso, também pretendemos dar continuidade as investigações com o estudo do polimorfismo do códon 72 do gene TP53, afim de descobrir uma possível correlação entre este polimorfismo e o câncer de próstata na população brasileira.

Outra possibilidade é a identificação de material genético de alguns agentes patógenos, como o HPV, em pacientes com diversos tipos de câncer, o que auxiliará no entendimento do verdadeiro papel destes microorganismos na gênese de vários tipos de câncer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akalu A, Reichardt JKV. A reliable PCR amplification method for microdissected tumor cells obtained from paraffin-embedded tissue. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1999; 15:229-33.

Akimoto T, Katoh H, Kitamoto Y, Shirai K, Shioya M, Nakano T. Anatomy-based inverse optimization in high-dose-rate brachytherapy combined with hypofractionated external beam radiotherapy for localized prostate cancer: comparison of incidence of acute genitourinary toxicity between anatomy-based inverse optimization and geometric optimization. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2006; online version (www.sciencedirect.com acessado em: 16.05.2009).

Anschau F, Minghelli VS, Gonçalves A, Garicochea B. Associação entre o polimorfismo no códon 72 da p53 e as lesões pré-malignas e malignas cervicais. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005; 2:607-12.

Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Laboratory Investigation* 2005; 85:1040-1050.

Barea J, Pardini MIC, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev bras hematol hemoter* 2004; 26:274-81.

Barea JA, Pardini MIC, Gushiken T. Extração de DNA de Materiais de Arquivo e Fontes Escassas: Revisão e Apontamentos Sobre as Possíveis Aplicações. *NewsLab* 2004; 63.

Brum IS, Spritzer PM, Brentani MM. Biologia Molecular das Neoplasias de Próstata. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49:797-804.

Buhmeida A, Pyrhönen S, Laato M, Collan Y. Prognostic factors in prostate cancer. *Diagnostic Pathology* 2006; 1:4.

Burgués JP, Pontones MJL, Donoso CD, Cruz JF, Moragues M. Mecanismos del ciclo celular y La apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urol Esp* 2005; 29:846-859.

Coffey DS. The molecular biology, endocrinology and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughn JED, eds. *Campbell's urology*, W. B. Saunders Co. 1992; 6:1381-1428.

Downing SR, Jackson P, Russell PJ. Mutations within the tumour suppressor gene p53 are not confined to a late event in prostate cancer progression: a review of the evidence. *Urol Oncol* 2001; 6:103-110.

Fernandes JV, Meissner RV, Medeiros Fernandes TAA, Rocha LRM, Cabral MC, Villa LL. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. *J Bras Patol Med Lab* 2004; 40:141-1466.

Gua Y, Li H, Miki J, Kima KH, Furusato B, Sesterhenn IA, Chub WS, McLeod DG, Srivastava S, Ewingd CM, Isaacs WB, Rhima JS. Phenotypic characterization of telomerase-immortalized primary non-malignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines. *Experimental cell research* 2006; 312:831-843.

Hamatani , K. et al. Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Histochem Cytochem* 2006; 54(7): 773-780.

Henner WD, Evans AJ, Hough KM, Harris EL, Lowe BA, Beer TM: Association of codon 72 polymorphism of p53 with lower prostate cancer risk. *Prostate* 2001; 49:263-266.

Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 2007; 26:1306-16.

Hricak H, Choyke PL, Eberhardt SC, Leibel SA, Scardino PT. Imaging Prostate Cancer: A Multidisciplinary Perspective. *Radiology* 2007;243:28-53.

Huang SP, et al. p53 Codon 72 and p21 Codon 31 Polymorphisms in Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:12.

INCA - Instituto Nacional de Câncer Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: *INCA* 2008; 94.

Inoue DP, Amar A, Cervantes O. Marcadores tumorais no câncer da laringe. *Rev Bras Cir Cabeça e Pescoço* 2005; 34(1).

Isola J, DeVris S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequences copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 1994; 145:1301-8.

Jacson V. Formaldehyde cross-link for studying nucleosomal dynamics. *Methods* 1999; 17:125-39.

Janneke AC, Rochat J, Krijtenburg PJ, Wim CJ, Kranse R, Rosenberg C. Identification of Genetic Markers for Prostatic Cancer Progression. *Laboratory Investigation* 2000; 80:931-42.

Jinghuan Li, Paul Smyth, Richard Flavin, Susanne Cahill, Karen Denning, Sinead Aherne, Simone M Guenther, John J O'Leary and Orla Sheils. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnology* 2007; 7:36

Junghyun K, Chanhee Ce. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. *J Virol Methods* 2001; 92:105–11.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica* .2004; 10ª Edição, 428-430.

Klumb CE, Cavalcanti Júnior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002; 24(2):111-125.

Korbler , T. et al. A simple method for RNA isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded lymphatic tissues. *Exp Mol Pathol* 2003; 74(3): 336-340.

Kullman F, Bocker T, Schoelmeurich J, Rueschoff J. A comparison of methods for DNA extraction from paraffinembedded tissue for microsatellite instability analysis by PCR. *Acta Biotech* 1998; 18:77.

Lane DP, Crawford LV. T-antigen is bound to host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979; 278:261-263.

Lashner BA, Bauer WM, Rybicki LA, Goldblum JR. Abnormal p53 Immunohistochemistry Is Associated With an Increased Colorectal Cancer–Related Mortality in Patients With Ulcerative Colitis. *The American Journal of Gastroenterology* 2003; 98.

Leiros GJ, Galliano SR, Sember ME, Kahn T, Schwarz E, Eiguchi K. Detection of human papillomavirus DNA and p53 codon 72 polymorphism in prostate carcinomas of patients from Argentina. *BMC Urology* 2005; 5:15.

Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21:8001-8010.

Lin HY, Huang CH, Wu WJ, Chang LC, Lung FW. *TP53* codon 72 Gene Polymorphism Paradox in Associated with Various Carcinoma Incidences, Invasiveness and Chemotherapy Responses. *Int J Biomed Sci* 2008; 4:248-254.

Masuda , N. et al. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(22): 4436-4443.

McNeal J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am* 1990; 17:477-486.

Merrill RM, Stephenson RA. Trends in mortality rates in patents with prostate cancer during the era of prostate specif antigen screening. *J Urol* 2000; 163:503-510.

Mesquita RA. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesq Odontol Bras* 2001; 15:314-9.

Montironi R. Nuclear changes in the normal-looking columnar epithelium adjacent to and distant from prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. Morphometric analysis in whole-mount sections. *Virchows Archives* 2000; 437:625-634.

Morris SM, Akerman GS, Desai VG, Tsai C, Tolleson WH, Melchior WB, Lin CJ, Fuscoe JC, Casciano DA, Chenf JJ. Effect of p53 genotype on gene expression profiles in murine liver. *Mutation Research* 2008; 640:54-73.

Myers RB, Grizzle WE. Biomarker expression in prostatic intraepithelial neoplasia. *Eur Urol* 1996; 30:153-166.

Narayan P, Jajodia P. Prostatic oncology. *Clin Geriatric Med* 1994; 6:131-212.

Novik VI. The use of computer technology in the cytologic diagnosis of neoplasms. *Vopr. Onkol* 2000; 46(2): 239-242.

Oltersdorf T, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435:677-81

Park SE, Min YK, Ha JD, Kim BT, Lee WG. Novel small molecule induces p53-dependent apoptosis in human colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 358:842-847.

Pau Ni IB, Lim P, Balraj P, Hang ESU, Zakaria Z. Quantitative analysis of the expression of p53 gene in colorectal carcinoma by using real-time PCR. *Tropical Biomedicine* 2006; 23:53-59.

Penland SK et al. RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. *Laboratory Investigation* 2007; 87:383–91.

Phipps S, Yang THJ, Habib FK, Reuben RL, McNeill SA. Measurement of tissue mechanical characteristics to distinguish between benign and malignant prostatic disease. *Urology* 2005; 66:447-450.

Postma R, Schröder RH. Screening for prostate cancer. *European Journal of Cancer* 2005; 41:825-833.

Prando A, Wallace S. Helical CT of Prostate Câncer: Early Clinical Experience. *American Roentgen Ray Society* 2000; 175:343-346.

Raja J, Ramachandran N, Munneke G, Patel U. Current status of transrectal ultrasound-guided prostate biopsy in the diagnosis of prostate cancer. *Clinical Radiology* 2006; 61:142-153.

Rashbass J. The impact of information technology on histopathology. *Histopathology* 2000; 36(1): 1-7.

Ribeiro-Silva A, Garcia SB. Estudo comparativo de três diferentes procedimentos para extração de RNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina. *J Bras patol Med Lab* 2008; 44:123-130.

Rincon F, Moré P, Riccio A, Martínez R, Benavides L, Grateron D, Plaza N. Inmunohistoquímica aplicada a casos de difícil diagnóstico anatomopatológico: adenocarcinoma vs lesión benigna / Inmunohistochemistry applied to difficult anatomopathological diagnosis: adenocarcinoma vs benign lesion. *Rev venez urol* 2004; 50:18-21.

Rivero ERC, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SOM. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology – Research and Practice* 2006; 202:523-529.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Bases Patológicas das Doenças. 7a Edição; Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro 2005; 338p.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1992.

Savera AT, Kaul S, Badani K, Stark AT, Shah NL, Menon M. Robotic Radical Prostatectomy with the “Veil of Aphrodite” Technique: Histologic Evidence of Enhanced Nerve Sparing. *European urology* 2006.

Smart CR. The results of prostate carcinoma screening in the U.S. as reflected in the surveillance, epidemiology and end results program. *Cancer* 1997; 80:1835-1844.

Srougi M. Neoplasias Urogenitais. In: Prado FC, Ramos J, Valle JR (Atualização terapêutica – Manual prático de diagnóstico e tratamento. São Paulo: *Artes Médicas Ltda* 1999; 1186-1187.

Stanta G, Mucelli SP, Petrera F, Bonin S, Bussolati G. A Novel Fixative Improves Opportunities of Nucleic Acids and Proteomic Analysis in Human Archive's Tissues. *Diagnostic Molecular Pathology* 2006; 15:115-23.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Brevier J, Leight IM, Matlashewski G, Banks L. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 393:229-234.

Tanagho EA. Anatomia do trato genitourinário. In: Tanagho EA, McAninch JW. *Smith Urologia Geral* 1994. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 7-8.

Tanagho EA. Anatomy of the lower urinary tract. In: Walsh PC, Retik AB, Atamey TA, Vaughan ED. *Campbell's Urology* 1992. Philadelphia: WB Saunders Company, 54.

Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999; 18:7690-7700.

Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis A. Current diagnose and treatment. *Norwalk: Prentice Hall* 1996; 224-227.

Tuncel A, Uzun B, Eruyar T, Karabulut E, Seckin S, Atan A. Do Prostatic Infarction, Prostatic Inflammation and Prostate Morphology Play a Role in Acute Urinary Retention? *European Urology* 2005; 48:277-284.

Turkeri LN, Sakr WA, Wydes SM, Grignon DJ, Pontes JE, Macoska JA. Comparative analysis of epidermal growth factor receptor expression and protein product in benign, pre-malignant, and malignant prostatic tissue. *Prostate* 2004; 25:199-205.

Van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon

72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* 2000; 81:317-25.

Walsh PC, Worthington JF. Doenças da próstata – uma guia para os homens e para as mulheres que os amam. São Paulo: *Martins Fontes* 1998; 26-27.

Walsh PC. Benign prostatic hyperplasia. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED. *Campbell's Urology*. Philadelphia: *WB Saunders Company* 1992; 1007-1027.

Wawroschek F, Wagner Th, Hamm M, Weckermann D, Vogt H, Märkl B, Gordijn R, Harzmann R. The influence of serial sections, immunohistochemistry, and extension of pelvic lymph node dissection on the lymph node status in clinically localized prostate cancer. *Eur Urol* 2003; 43: 132-137.

Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 2007; 41:141-200.

ANEXOS

Anexo 1.

Aprovação do Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humano



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 277/2008 - CEP/CCS

Recife, 08 de setembro de 2008

Registro do SISNEP FR – 207467

CAAE – 0222.0.172.000-08

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 228/08

Titulo: “Análise de RNA e imunohistoquímica de marcadores tumorais em tecidos neoplásicos de próstata fixados e parafinizados”

Pesquisador Responsável: Rodrigo Bacelar da Costa e Silva

Senhor Pesquisador:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 03 de setembro de 2008.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório ao final da pesquisa (30/06/2009).

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

Ao
Mestrando Rodrigo Bacelar da Costa e Silva
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – CCB/UFPE

Anexo 2.

Normas para submissão do artigo



ISSN 1676-2444 versão
impressa
ISSN 1678-4774 versão online

- [Análise dos trabalhos](#)
- [Direitos autorais](#)
- [Ética](#)
- [Como preparar um trabalho antes de enviá-lo aos Editores](#)

O **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, continuação do *Jornal Brasileiro de Patologia*, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para a divulgação do conhecimento e para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial (Patologia Clínica, Patologia, Citopatologia) e aceita artigos escritos em português, inglês ou espanhol, das seguintes categorias: artigos originais, relatos de casos, comunicações breves, cartas aos editores e resenhas. Profissionais de competência reconhecida serão convidados pelo Conselho Editorial a escrever artigos de revisão e de atualização.

Análise dos trabalhos

O manuscrito recebido para publicação será enviado para um ou mais avaliadores, pares científicos, de renome e conhecimento específico que contemple o assunto abordado no artigo. Após resposta do avaliador, o Editor do JBPML entrará em contato com os autores comunicando a eventual rejeição ou os passos a serem tomados para a publicação definitiva do manuscrito.

Direitos autorais

Solicita-se aos autores enviar, junto com a carta aos Editores, um termo de responsabilidade. Desta forma, os trabalhos, quando submetidos à publicação, deverão ser acompanhados de documento de transferência de direitos autorais, contendo a assinatura de cada um dos autores, cujo modelo é apresentado a seguir:

"Eu/Nós..., autores do trabalho intitulado..., o qual submeto(emos) à apreciação do *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, concordo(amos) que os direitos autorais a ele referentes se tornarão propriedade exclusiva da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, vedada qualquer reprodução total ou parcial, em qualquer outra parte ou meio de divulgação impresso sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e obtida.

Declaro(amos) também que o artigo é original em sua forma e conteúdo, não tendo sido publicado em outro periódico científico, completo ou em parte, e certifico(amos) que não se encontra sob análise em qualquer outro veículo de comunicação científica.

Atesto(amos) que o(s) autor(es) participou(aram) efetivamente da concepção e realização do artigo em questão e dos experimentos que resultaram nessa comunicação.

De igual forma, declaro(amos) estar comprometido(s) com a análise dos dados e com a redação do manuscrito. De forma inequívoca, não tenho(mos) nenhum conflito de interesse com o tema abordado nem com os produtos citados.

Data... Assinatura..."

Ética

Estudos realizados com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (<http://www.bioetica.ufrgs.br/res19696.htm>). O trabalho a ser publicado deverá ser acompanhado de consentimento, por escrito, do paciente e de cópia da aprovação (certificado) do Comitê de Ética da Instituição onde foi realizada a pesquisa, em consonância com a Declaração de Helsinki, 1989 (<http://www.bioetica.ufrgs.br/helsin4.htm>).

Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (<http://www.cobea.org.br/etica.htm#10>) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., 1996) (<http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guidex.htm>).

É essencial que as drogas e substâncias químicas usadas sejam identificadas com precisão. Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente no material ilustrativo, assim como é vetado informar nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

Como preparar um trabalho antes de enviá-lo aos Editores

Deverão ser enviadas três cópias impressas dos trabalhos, bem como uma cópia em disquete 3 1/2, contendo o arquivo do texto em Word for Windows 6.0 ou posterior. As ilustrações e tabelas devem ser preparadas em programa processador de gráficos.

Devem constar na primeira página: 1) título do artigo: deve ser conciso e completo, descrevendo o assunto a que se refere. Palavras supérfluas devem ser omitidas. Apresentar a versão do título para o inglês; 2) nome completo do(s) autor(es); 3) titulação acadêmica e indicação da instituição a que cada autor está filiado, acompanhada do respectivo endereço; 4) nome do departamento e/ou instituição no qual o trabalho foi realizado; 5) indicação do autor responsável pela correspondência; 6) se foi subvencionado, indicar o nome da agência de fomento que concedeu o auxílio; 7) se foi baseado em tese, indicar título, ano e instituição onde foi apresentada; 8) se foi apresentado em reunião científica, indicar nome, local e data de realização do evento.

Resumos e unitermos

Devem constar na segunda página dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 150 palavras para resumos não-estruturados e de 250 para resumos estruturados). Os resumos estruturados, a serem apresentados pelos artigos originais e de revisão, devem incluir as informações do conteúdo dos artigos, com a indicação dos cabeçalhos, que constituem a divisão formal do artigo. Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, fornecidos pelo autor, utilizando-se o vocabulário controlado Decs – Descritores em Ciências da Saúde (Bireme), acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem ser apresentados em português e inglês.

O endereço para correspondência do autor responsável deve vir no final do artigo.

Agradecimentos

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou às instituições que contribuíram substancialmente para a elaboração do trabalho. Virão antes das referências bibliográficas

Estrutura do texto

Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original inédita que possam ser replicados ou generalizados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e método, Resultados, Discussão e Conclusões. O uso de subtítulos é recomendado particularmente na Discussão do artigo. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e método. Para esses artigos exige-se a apresentação de um resumo estruturado em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução (Background), Objetivos (Objectives), Material e método (Material and method), Resultados (Results), Discussão (Discussion) e Conclusões (Conclusions). O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto.

Comunicações breves

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não-estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências bibliográficas.

Artigos de revisão e atualização

Artigos de revisão e/ou atualização apenas serão publicados por convite específico dos editores. Avaliação crítica sistematizada da literatura sobre determinado assunto, devendo conter conclusões. Devem conter até 5 mil palavras. A organização do texto do artigo, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

Relatos de casos

São trabalhos de observações clínicas originais acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A sua estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato(s) dos(s) caso(s), Discussão. Incluir um resumo não-estruturado no idioma do texto e em inglês.

Cartas aos Editores

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves, com no máximo 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se estiver explícita a frase para publicação. A carta deve ser assinada por todos os seus autores.

Referências

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, em ordem alfabética numerada. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das

referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo, e se mais de três autores colaboraram numa publicação, deve ser listado o primeiro seguido da expressão latina *et al.*

Exemplos:

- Artigos de periódicos (um só autor)

COTRIM, F.L.S. Coleta de sangue para dosagem de triglicerídeos. *J Bras Patol*, v. 33, n. 4, p. 201-02, 1997.

- Artigos de periódicos (mais de três autores)

ABREU, E.S. *et al.* Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica imuno-histoquímica e por hibridização *in situ*. *J Bras Patol*, v. 33, n. 4, p. 178-84, 1998.

- Artigo de periódico *on-line*

YAZLE, J.S.R. *et al.* Assistência hospitalar como indicador da desigualdade social. *Rev Saúde Publ*, São Paulo, v. 31, n. 5, 1997. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/rsp>. Acesso em: 23 mar. 1998.

- Livros no todo (dois autores)

RINGSVEN, M.K.; BOND, D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. Albany, N.Y.: Delmar Publishers, 1996.

- Capítulos ou parte de livro editado por outro autor

SCIVOLETO, R. Sistema nervoso autônomo. In: ZANINI, A. C.; OGA, S. *Farmacologia aplicada*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. Cap. 9; p. 97-141.

- Parte de livro em meio eletrônico

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: _____. *Entendendo o meio ambiente*. São Paulo, 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>. Acesso em: 8 mar. 1999.

- Evento em meio eletrônico

SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total da educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. *Anais eletrônicos...* Recife: UFPE, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em: 21 jan. 1997.

- Tese ou dissertação

Oliveira, C.M. *Isolamento e caracterização de estreptococos de placa dental*. Rio de Janeiro, 1974. Tese (doutoramento) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Citações no texto

Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão *et al.*, como, por exemplo, Higashi et al¹.[□]

Tabelas e figuras

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não-repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as Normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pelo IBGE (1993). As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos, etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras.

Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

Abreviações e nomes de medicamentos

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não-disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no System International (SI) entre parênteses.

Endereço para envio dos originais

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
R. Dois de Dezembro, 78/salas 909 e 910 – Catete
CEP 22220-040 – Rio de Janeiro-RJ – Brasil
Tel.: (21) 3077-1400 ou 3077-1408
E-mail: jbpml@sbpc.org.br

Silva, Rodrigo Bacelar da Costa
Método alternativo para obtenção de ácidos nucléicos a partir
de tecidos prostáticos parafinizados / Rodrigo Bacelar da Costa Silva.
– Recife: O Autor, 2009.

50 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Biologia molecular 2. Protocolo de extração de RNA 3.
Ácidos nucléicos 4. Tecido parafinado 5. Lesão tumoral
prostática | Título.

572.8 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB–2009–171