



OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA RT-LAMP PARA DETECÇÃO DE PCA3 EM AMOSTRAS DE URINA PARA O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Mariana Hentz, Karina Mariante Monteiro*

*Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia (CBiot), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o tipo de câncer mais prevalente entre os homens no Brasil, com exceção dos tumores de pele não melanoma.¹ Atualmente, o diagnóstico do CaP se baseia em valores alterados na dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA), variações no tamanho da próstata através do exame de toque retal e na biópsia do tecido prostático. Entretanto, estes métodos apresentam limitações consideráveis, como inespecificidade de detecção e invasibilidade dos exames. Em vista disso, o biomarcador PCA3, um RNA longo não-codificador (lncRNA), altamente expresso em tumores de próstata², pode ser uma alternativa aos diagnósticos já conhecidos. Porém, a detecção de PCA3 é difícil, e uma nova técnica chamada LAMP (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop), vem despertando interesse para uso no diagnóstico molecular por sua alta sensibilidade, rapidez e por dispensar o uso de equipamentos sofisticados³. Com isso, nosso objetivo é identificar o lncRNA PCA3 em amostras de urina de pacientes com CaP através da técnica RT-LAMP como método diagnóstico do câncer de próstata.

METODOLOGIA



Coleta de amostras de urina de pacientes com suspeita de CaP, hiperplasia prostática benigna (HPB) e indivíduos saudáveis.

Extração de RNA de duas linhagem celulares de carcinoma de próstata: LNCap (expressa PCA3) e DU145 (não expressa PCA3).

Verificação da funcionalidade de dois conjuntos de primers desenhados pelo software PrimerExplorer V.5 para a técnica de RT-LAMP.

Padronização da técnica RT-LAMP a partir do RNA extraído das linhagens celulares utilizando o kit LavalAMP™ (Lucigen).

Avaliação da eficiência de reação a partir de amostras de RNA total e de amostras enriquecidas a partir da incubação com beads contendo sequências nucleotídicas complementares à sequência de PCA3.



Teste de aplicabilidade em amostras de urina de pacientes com CaP e HPB e de indivíduos saudáveis.

RESULTADOS

Amostras de Urina

Trinta e oito (38) amostras de urina de voluntários controle e cento e setenta e nove (179) amostras de urina de pacientes foram coletados e estão em processo de classificação de acordo com laudos de biópsias.

Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR

Uma reação de RT-PCR utilizando primers específicos para PCA3 mostrou que as duas linhagens celulares de câncer de próstata expressam esse lncRNA. (Figuras 1 e 2)

PERSPECTIVAS

Iniciar a padronização do RT-LAMP utilizando o RNA das células LNCap como controle positivo e de células não relacionadas com a próstata como controle negativo;

Realizar testes de eficiência de reação utilizando beads;

Testar a técnica RT-LAMP em amostras de urina dos três grupos em estudo.

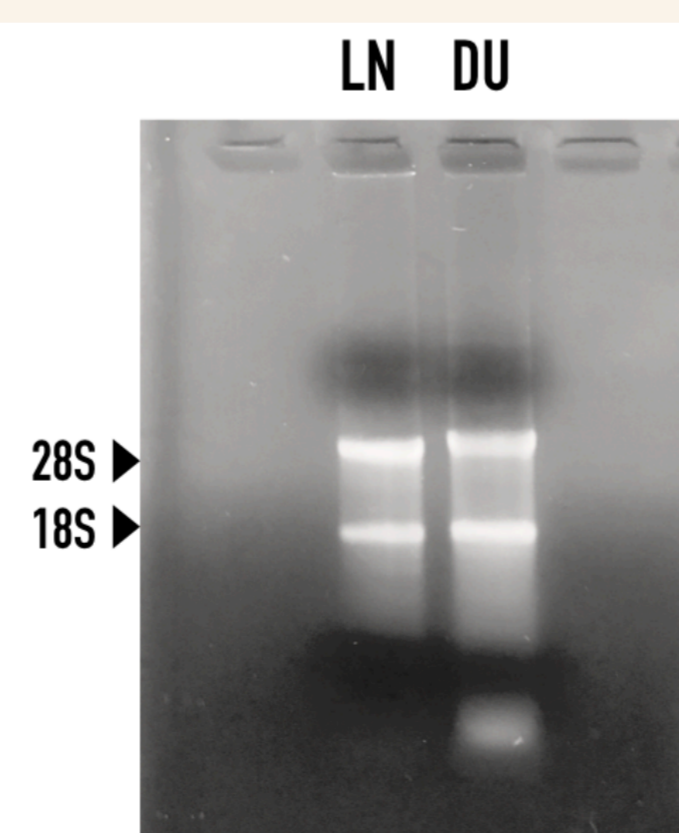


Figura 1. Extração de RNA de linhagens de carcinoma de próstata. Resultados da extração com TRIzol. Eletroforese em agarose 1%. LN=LNCap; DU=DU145. O gel apresenta as duas subunidades características do RNA.

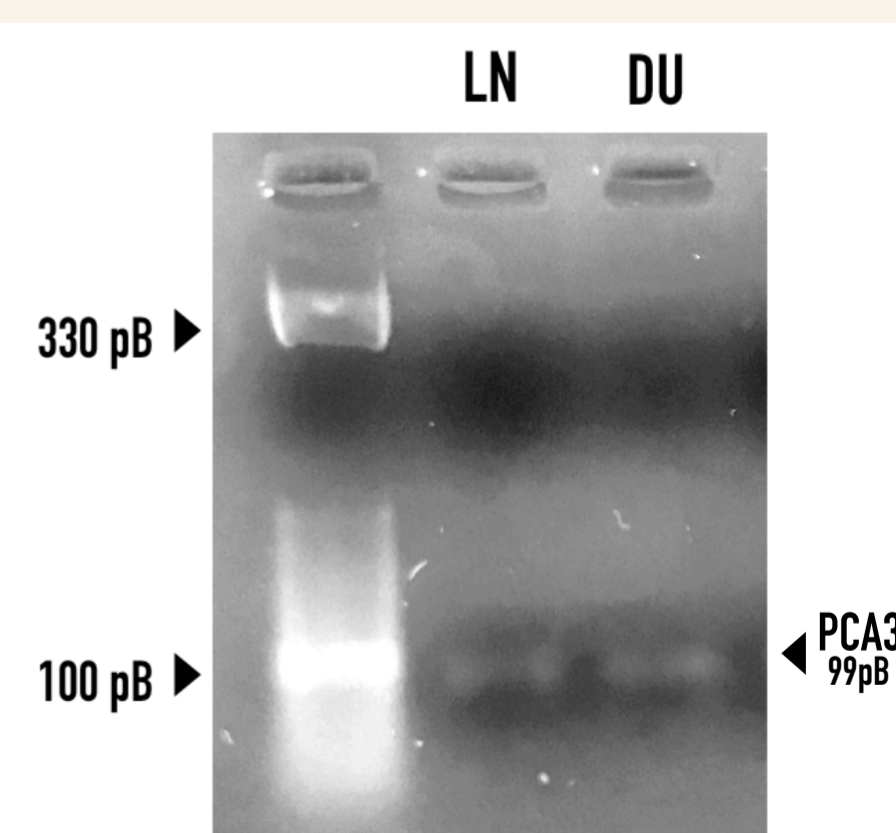


Figura 2. Expressão do lncRNA PCA3 em linhagens de carcinoma de próstata. Eletroforese em agarose 2%. LN=LNCap; DU=DU145. As bandas visualizadas indicam que ambas as linhagens, LNCap e DU145, expressam o lncRNA PCA3.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA).
2. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, et al. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 2002;62(9):2695-8.
3. T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita, and H. Kanda, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects," *Journal of Microbiology*, vol. 53, no. 1, pp. 1- 5, 2015.