

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

CAETANA MACHADO LEDUR

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TP53, MDM2 e CDKN1A EM
CÂNCER DE PRÓSTATA E HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA.**

Porto Alegre

MAIO/2014

CAETANA MACHADO LEDUR

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TP53, MDM2 e CDKN1A EM
CÂNCER DE PRÓSTATA E HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA**

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 Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum

Co-orientadora: M.Sc. Ana Caroline Hillebrand

Porto Alegre

MAIO/2014

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

Agradecimentos...

Agradeço à minha Orientadora, Prof^o Dr^o Ilma Simoni Brum, pelos ensinamentos, pelo apoio, incentivo e tranquilidade transmitida. Principalmente por me aceitar como aluna e por confiar no meu trabalho.

Agradeço à minha co-orientadora Ana Caroline Hillebrand por ser tão atenciosa e dedicada. Pela amizade, carinho, apoio, incentivo. Principalmente por todos os ensinamentos e pela orientação. Carol, eu sou muito grata por tudo que fez por mim.

Agradeço às colegas de laboratório Amanda de Barros Machado, Patrícia Martiny e Lolita Schneider pela amizade, pelos momentos agradáveis e pelo incentivo. Agradeço à minha amiga e colega de laboratório Maria Eduarda, por dividir aflições, dúvidas e medos. Pelo companheirismo e pela perspectiva de que tudo daria certo.

Agradeço muito à minha amiga Júlia, por ter me acolhido em Porto Alegre, pela amizade e pelo companheirismo diário. Por sempre me escutar e me aconselhar, por compartilhar medos e experiências, e, principalmente, por ser minha companheira de todas as horas.

Agradeço à minha amiga Helena Biasibetti por ser tão fiel e companheira em toda a trajetória da nossa graduação. Pela amizade, conselhos e pela motivação. Agradeço à Vitória Lawall pela amizade e pelos momentos de descontração. Agradeço à minha amiga Mariane Branco por ser minha família aqui em Porto Alegre. Por todos os conselhos e abraços, por estar comigo em momentos difíceis e me fazer companhia. Amiga, agradeço a Deus por ter te conhecido.

Agradeço a amizade e o apoio de todos meus amigos e familiares.

Agradeço à minha família, meu pai Décio, minha mãe Dilza e meu irmão Alfredo, de quem tenho maior orgulho nesse mundo. Agradeço por todo o incentivo, conselhos, atenção, e, principalmente, pelo amor, que permitiu que a saudade não atrapalhasse minha trajetória. Eu Amo Muito Vocês!

Agradeço por último ao meu namorado Frederico Zinhani, por ser tão atencioso, companheiro e compreensivo. Obrigado por entender a minha ausência e por me apoiar em minhas decisões.

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	4
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
1- INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Próstata	11
1.2 Câncer de próstata (CaP).....	12
1.3 Hiperplasia prostática benigna (HPB).....	14
1.4 Androgênios e receptor de androgênio.....	15
1.5 Ciclo celular	21
1.6 Apoptose.....	23
1.7 TP53 e MDM2.....	24
1.8 CDKN1A	27
2. ARTIGO	29
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS:.....	51
4. BIBLIOGRAFIA:.....	52
5. ANEXOS.....	54
5.1 Orientações da revista The Prostate	54
5.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	59
5.3 Carta de Aprovação do Comitê de Ética.....	61

Lista de Figuras

Figura 1. Delimitação de zonas prostáticas e a ocorrência de alterações prostáticas	11
Figura 2. Mecanismo de ação dos androgênios, exemplificado pela testosterona.	17
Figura 3. Estrutura esquemática das variantes de AR humano disponíveis no GenBank.....	19
Figura 4. O ciclo celular, fases e pontos de verificação	22
Figura 5. Mecanismo de ação de p53.	27

Lista de Abreviaturas

AR	Receptor de Androgênios
AR-Vs	Isoformas do Receptor de Androgênios
ARE	Elementos responsivos a Androgênios
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma2</i>
CaP	Câncer de Próstata
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	DNA complementar
CDKI	proteína inibidora de cinase dependente ciclina
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclina
CPRC	Câncer de Próstata Resistente à Castração
DBD	Domínio Central de Ligação ao DNA
DHT	Diidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Fas	Receptor Fas
Fase S	Fase de Síntese do Ciclo Celular
Fase M	Fase de Separação dos cromossomos e Divisão do Ciclo Celular
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
LBD	Domínio de Ligação C-terminal
LUTS	Sintomas do Trato Urinário Inferior
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
Mdm2	<i>Proteína Mdm2</i>

RNA_m	RNA mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa a partir de transcrição reversa
PSA	Antígeno Prostático Específico
p21	Proteína p21
p53	Proteína p53
TNF	fator de necrose tumoral
TP53	<i>Tumor protein p53</i>

Resumo

O câncer de próstata é o câncer mais comum no sexo masculino e consiste em uma doença com comportamento dependente de androgênios para a proliferação e manutenção tumoral. Deste modo, um dos tratamentos mais comuns para a doença consiste na terapia de ablação androgênica, química (fármacos antiandrogênicos) ou cirúrgica (orquidectomia). No entanto, grande parte dos pacientes, eventualmente, progride a uma condição refratária à depleção de androgênios. A sinalização androgênica na próstata se dá através do receptor de androgênios, que atua como fator de transcrição, sendo capaz de mediar a ativação ou repressão da transcrição de inúmeros genes. Dessa forma, este receptor apresenta um importante papel na proliferação e diferenciação de células prostáticas. Recentemente foram descritas variantes deste receptor geradas a partir de *splicing* alternativo. Estas variantes possuem deleção da região responsável pela ligação a hormônios androgênicos e, curiosamente, são constitutivamente ativadas, independentemente da presença destes hormônios. Assim, é de se esperar que as variantes estejam expressas em cânceres mais avançados, onde há depleção androgênica. Contudo, estas variantes já foram descritas na hiperplasia prostática benigna, uma doença proliferativa e não maligna. No câncer de próstata, como em outros tumores, as alterações em genes relacionados ao ciclo celular são críticas para a progressão tumoral. Genes como TP53 (*tumor protein p53*), MDM2 (*MDM2 oncogene, Mouse Double Minute 2*) e CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) podem apresentar alterações que contribuam para a proliferação tumoral e para um pior prognóstico. O gene TP53 é um gene supressor tumoral envolvido na resposta celular a danos ao DNA. Frequentemente é inativado em cânceres humanos, sendo que a perda de função está associada ao aumento da tumorigenicidade e ao tamanho do tumor. A inativação deste gene pode se dar através da proteína Mdm2, que é codificada pelo gene MDM2. Em condições normais, a proteína p53 encontra-se complexada com Mdm2, e, portanto, inativa. No entanto, em resposta a danos ao DNA, o complexo se desfaz devido à fosforilação de p53, o que a torna ativa. Assim, pode ser

desencadeada a ativação da transcrição de genes alvos como o gene CDKN1A. Este gene codifica a proteína p21^{Cip1/Waf1}, proteína inibidora de cinase dependente ciclina (CDKI), que promove a interrupção da síntese de DNA e do ciclo celular através da inibição das cinases dependentes de ciclinas (CDK). A proteína p21 apresenta funções que inibem a proliferação celular, e também funções que contribuem para a progressão tumoral. Assim, a elevada expressão de CDKN1A no câncer de próstata pode estar associada a metástases e à instabilidade genética. Nesse estudo buscamos analisar a expressão gênica dos genes TP53, MDM2 e CDKN1A e verificar a possível correlação com a expressão das isoformas do receptor de androgênios. A análise da expressão gênica foi realizada através da técnica RT-qPCR no grupo câncer de próstata (N=26) e no grupo HPB (N=27). A expressão gênica de todos os genes estudados foi significativamente maior no grupo câncer de próstata quando comparado ao grupo HPB ($P < 0,05$). Nas amostras de câncer de próstata, foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de RNAm do TP53 e do AR3/4/5. Também foi encontrada uma correlação positiva dos níveis de RNAm de MDM2 com o receptor de androgênios *full-length* e com a expressão das isoformas AR3/5/6. Desta forma, estes resultados ressaltam a participação dos genes estudados (TP53, MDM2 e CDKN1A) na proliferação celular no câncer de próstata. Além disso, as correlações encontradas com as isoformas do receptor de androgênios nos permitem dissertar acerca de uma possível interação entre os genes estudados e as isoformas, a fim de permitir a manutenção do processo tumoral no CaP.

1- Introdução

1.1 Próstata

A próstata é uma glândula acessória exclusiva do sistema genital masculino que contribui para a secreção do fluido seminal (McDougal, Wein et al. 2011). Ela situa-se abaixo da bexiga e é dividida em 3 zonas: a zona periférica, a zona de transição e a zona central. A zona periférica compreende a região localizada próxima à cápsula que envolve a próstata. É frequente nessa região o desenvolvimento de carcinomas e infecções prostáticas. A zona de transição, região entre a zona periférica e a central, é o local frequentemente envolvido com a hiperplasia prostática benigna (HPB). A região da próstata que envolve a uretra e os ductos seminais é denominada de zona central, e esta apresenta um formato cônico (Kai H. Hammerich 2009).

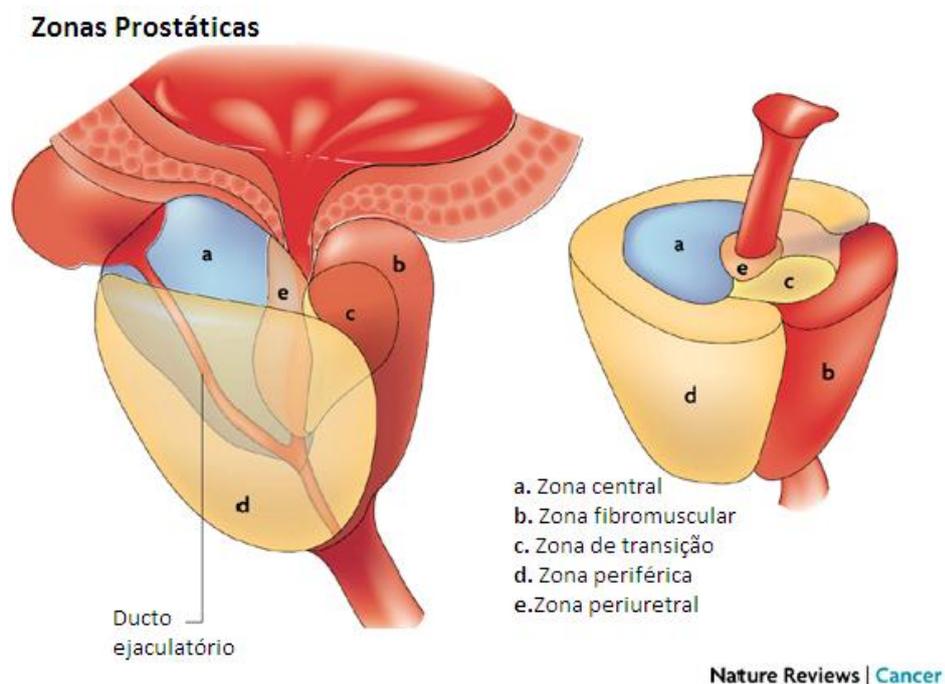


Figura 1. Delimitação de zonas prostáticas e a ocorrência de alterações prostáticas (De Marzo, Platz et al. 2007)

A próstata é composta por dois compartimentos celulares: epitelial e estromal (McDougal, Wein et al. 2011). O compartimento epitelial é composto por células luminais e basais. As células luminais são células diferenciadas e dependentes de androgênio. Além disso, elas apresentam baixa capacidade de proliferação e elevado índice de apoptose. Já as células basais na maioria das vezes são indiferenciadas e independentes de androgênios. Ao contrário das células luminais, as células basais apresentam alta capacidade proliferativa e baixo índice de apoptose (Schalken and van Leenders 2003).

O compartimento estromal é constituído por células musculares lisas, células nervosas, inflamatórias e fibroblastos (McDougal, Wein et al. 2011). As células deste compartimento ajudam a direcionar o desenvolvimento e a diferenciação epitelial. Estas células apresentam receptores hormônio-esteróides, receptores 5 α -adrenérgicos e também expressam a enzima 5 α -redutase I e II. Além disso, o fato de expressarem o receptor de androgênios (AR) as torna responsivas aos androgênios, embora estes hormônios não sejam requeridos para a sobrevivência celular (Schalken and van Leenders 2003). Os dois compartimentos, epitelial e estromal, interagem através de mecanismos de sinalização celular mediados pela diidrotestosterona (DHT) e por fatores de crescimento dependentes de DHT (Carson and Rittmaster 2003).

As alterações do tecido prostático são cada vez mais comuns. Um dos possíveis fatores relacionados com estas alterações é o aumento da expectativa de vida das populações. As alterações clinicamente mais importantes de proliferação anormal da próstata são a hiperplasia prostática benigna (HPB), e o câncer de próstata (CaP) (Ilic and Misso 2012).

1.2 Câncer de próstata (CaP)

O CaP é o tipo de câncer com maior prevalência no sexo masculino, estando atrás apenas do câncer de pele não-melanoma. Representa cerca de 10% do total de cânceres e consiste no sexto tipo mais comum no

mundo, sendo que sua incidência é maior em países desenvolvidos, quando comparados com não desenvolvidos (INCA 2014).

No Brasil, o CaP é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens. Para o ano de 2014, estima-se 68.800 novos casos de CaP, sendo que no ano de 2011, ocorreram 13.129 mortes por esta doença (INCA 2014). Nos últimos anos uma melhora nos métodos de diagnósticos e a modernização na qualidade dos sistemas de registros e informação dos casos no país, permitiram detectar um o aumento nas taxas de incidência no Brasil (INCA 2014). Nos EUA, o CaP apresenta-se como o segundo tipo câncer mais prevalente e como a segunda causa de morte de homens (Farrell, Petrovics et al. 2013), sendo que, para o ano de 2014 foi estimado que 233.000 novos casos serão diagnosticados e que 29.480 homens morrerão da doença (ACS 2014).

A incidência de CaP em diferentes grupos étnicos não é a mesma. Afro-americanos apresentam alta incidência de mortalidade por CaP quando comparados com outras raças. Pesquisadores sugerem que o status sócio econômico também pode contribuir significativamente para a diferença de incidência que existe entre as raças. Assim sendo, há evidências que a redução de acesso aos cuidados e tratamentos adequados esteja associada ao diagnóstico de maior número de CaP já em estado avançado, o que explicaria a sua maior prevalência em afro-americanos do que em caucasianos (Farrell, Petrovics et al. 2013).

Sabe-se que o CaP está associado à hereditariedade, visto que homens que possuem em suas famílias indivíduos com idade inferior a 55 anos e histórico de CaP, apresentam maior risco de desenvolver a doença do que homens que possuem parentes com histórico de CaP e idade superior a 55 anos. O número de membros da família afetados e a idade que desenvolveram o CaP também é um determinante importante para o risco de desenvolvimento deste tipo de câncer entre parentes. Os cânceres esporádicos representam cerca de 85% de todos os cânceres de próstata e cerca de 15% dos CaP são hereditários. O CaP hereditário corresponde a 43% da doença de início precoce (55 anos de idade ou mais jovem) e 9% de

todos os cânceres que ocorrem em torno dos 85 anos de idade (McDougal, Wein et al. 2011).

Atualmente, a investigação diagnóstica do câncer da próstata é feita através do exame de toque retal e a dosagem do nível sanguíneo do antígeno prostático específico (PSA). O PSA é uma proteína produzida pelas células prostáticas, sendo que sua expressão encontra-se alterada na HPB, no CaP e também nas prostatites. Deste modo, a dosagem do PSA é inespecífica no diagnóstico do CaP, embora auxilie na identificação de alterações na homeostasia normal da próstata (NCI 2014).

1.3 Hiperplasia prostática benigna (HPB)

A hiperplasia prostática benigna é uma alteração proliferativa que afeta as células musculares lisas e as células epiteliais da zona de transição da próstata (Ilic and Misso 2012). Logo, trata-se de uma doença relacionada com o aumento do número celular e a redução da apoptose (Carson and Rittmaster 2003).

A HPB apresenta um impacto significativo na qualidade de vida de homens acometidos (Kirby 2000). Ela pode acarretar na obstrução da uretra proximal pelo aumento da tonicidade e da resistência do músculo liso, ocasionando sintomas do trato urinário inferior. Os sintomas obstrutivos causados pela HPB são: aumento da frequência urinária, noctúria, incontinência urinária, fluxo urinário lento ou fraco e sensação de esvaziamento incompleto da bexiga (Ilic and Misso 2012). Os sintomas podem causar distúrbios no sono, ansiedade, interferência com atividades de lazer e atividades diárias habituais, e um senso de comprometimento do bem-estar, de modo que há uma diminuição na qualidade de vida dos homens com esta condição. Quando o tratamento da doença não é efetivo, pode ocorrer a progressão da doença de modo que acarrete em infecções do trato urinário e cálculos na bexiga, como também retenção urinária (Kirby 2000).

A HPB é a doença mais prevalente na próstata. Um estudo realizado por Garraway e cols. na Escócia relatou que 14% dos homens com idade entre 40-50 anos e 43% dos homens com idade superior a 60 anos apresentam HBP (Garraway, Collins et al. 1991). Evidências microscópicas demonstram que 50% dos homens aos 50 anos de idade e 90% dos homens aos 80 de idade apresentam HPB. Deste modo, grande parte dos homens que atingem a expectativa de vida são acometidos por esta doença (Carson and Rittmaster 2003). No ano de 2000, dados de Curkendall e cols. apresentados na reunião da Associação Europeia de Urologia, na Bélgica, mostraram que HPB apresenta prevalência similar à hipertensão e à diabetes (Kirby 2000).

O eixo de sinalização androgênica participa tanto do desenvolvimento normal da próstata com também do desenvolvimento da HPB. Embora a DHT esteja geralmente relacionada ao desenvolvimento normal da glândula prostática, um desbalanço na função ou nos níveis de androgênios, ou dos fatores de crescimento dependentes da DHT, podem causar a proliferação excessiva da glândula, levando assim ao desenvolvimento da HPB (Carson and Rittmaster 2003).

1.4 Androgênios e receptor de androgênio

O desenvolvimento normal da próstata está associado a diversas vias de sinalização, como vias parácrinas, autócrinas e também via fatores de transcrição. A testosterona e a diidrotestosterona (DHT) são exemplos de androgênios que estão associados a essas vias de sinalização (Ahmed, Ali et al. 2014), ou seja, tem importante função na diferenciação e maturação prostática (Ntais, Polycarpou et al. 2003). Portanto, alterações nas vias de sinalizações, como o aumento de níveis de androgênios podem vir a contribuir para o desenvolvimento do CaP (Ahmed, Ali et al. 2014).

A testosterona e DHT são os hormônios esteróides mais importantes no sexo masculino. Ambos exercem função sobre a glândula prostática através do receptor de androgênios (AR). Embora a testosterona apresente-

se em maiores níveis plasmáticos, a DHT, mesmo em menores níveis plasmáticos, possui uma ação mais potente em relação à sua precursora testosterona (Ntais, Polycarpou et al. 2003).

O AR é um membro da superfamília de receptores esteróides e é responsável por mediar os efeitos fisiológicos androgênicos (Hu, Dunn et al. 2009). O AR inativo encontra-se no citoplasma celular associado a proteínas de choque térmico e chaperonas. Quando a testosterona entra no citoplasma celular, ela é convertida pela enzima 5α -redutase em DHT, um metabólito com ação mais potente. A DHT liga-se ao AR tornando-o ativo, então, o complexo hormônio-receptor formado sofre diversas modificações conformacionais, como por exemplo, dissociação das chaperonas, fosforilação, dimerização e translocação para o núcleo da célula. O AR ativo no núcleo celular é capaz de se ligar no DNA de genes alvos, em regiões conhecidas como elemento responsivo aos androgênios (AREs), podendo recrutar diferentes fatores de transcrição (por exemplo, a DNA polimerase tipo II) e também diferentes cofatores, que atuam inibindo ou ativando a transcrição gênica (Guo, Yang et al. 2009).

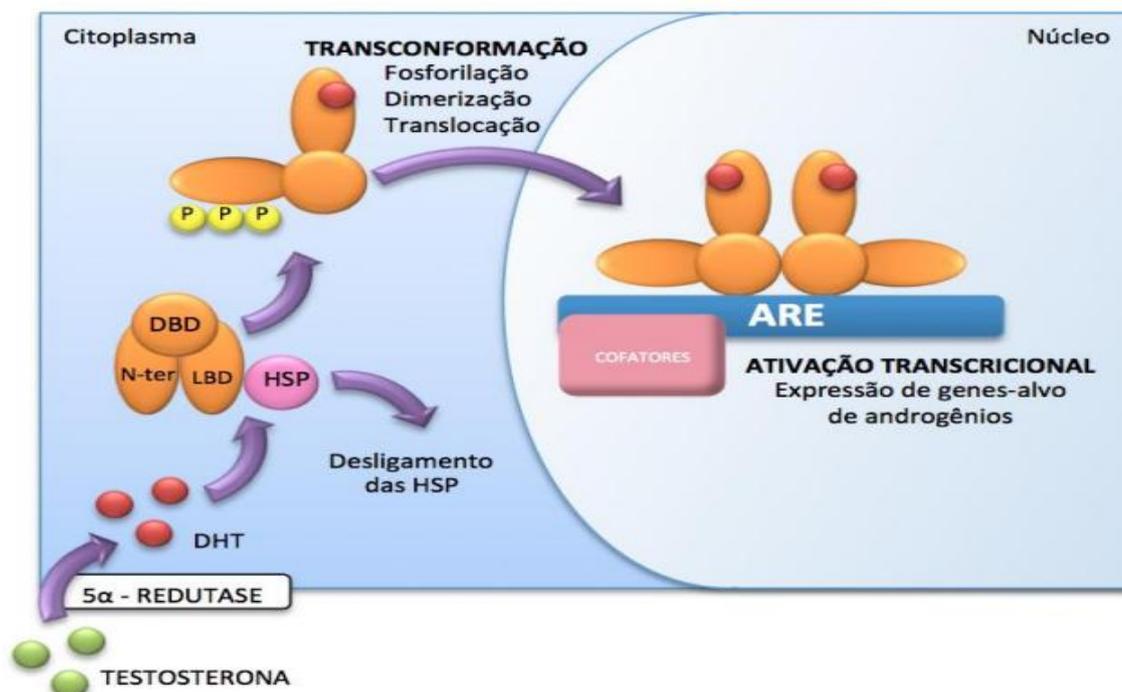


Figura 2. Mecanismo de ação dos androgênios, exemplificado pela testosterona. Adaptada de (Gobinet, Poujol et al. 2002).

O gene que codifica o AR está localizado no cromossomo Xq11-12 e é estruturalmente composto por 8 éxons. Estes éxons codificam multidomínios de proteínas, incluindo um domínio de transativação N-terminal (NTD), um domínio de ligação ao DNA (DBD) e um domínio de ligação ao ligante (LBD) na região C terminal. O domínio NTD é codificado pelo o éxon 1 e constitui aproximadamente 60% da região regulatória da proteína. O domínio DBD é codificado pelos éxons 2 e 3, e o domínio LBD pelos os éxons 4, 5, 6, 7 e 8 (Hu, Dunn et al. 2009). Este último domínio parece ser dispensável para a atividade transcricional de AR, pois a deleção desta região leva à ativação constitutiva de sua capacidade transcricional (Guo, Yang et al. 2009).

O CaP apresenta comportamento dependente de androgênios para seu crescimento e sobrevivência. Um dos tratamentos mais comuns para o tratamento do CaP consiste na terapia de ablação androgênica, química (fármacos antiandrogênicos) ou cirúrgica (orquidectomia). No entanto, na maioria dos pacientes, o CaP eventualmente progride à uma condição refratária à depleção de androgênios. Desta forma, o CaP tornou-se um foco

intensivo de estudo para entender os mecanismos subjacentes à transição para o CaP resistente à ablação androgênica (Guo, Yang et al. 2009).

Recentemente foi descrito que o AR apresenta diversas isoformas, as quais são produtos gerados pelo evento de processamento do pré-mRNA conhecido como *splicing* alternativo. Estudos em diversas linhagens celulares evidenciam o importante papel destas isoformas no desenvolvimento e progressão do CaP. No ano de 2009, foi demonstrada na literatura científica a expressão de diferentes isoformas do AR em tecido de CaP e de HPB, e também em diferentes linhagens celulares como CWR22Rv1, VCap e LNCaP (Guo, Yang et al. 2009; Hu, Dunn et al. 2009). As isoformas descritas foram: AR3 (também chamada de AR-V7), AR4 (AR-V1), AR5 (AR-V4) E AR6 (AR-V3). Estas isoformas apresentam os domínios NTD e DBD intactos, porém não expressam as regiões *hinge* e LBD, de forma que as terapias antiandrogênicas convencionais dirigidas à região LBD não apresentam ação sobre a função destas variantes do AR (Guo, Yang et al. 2009).

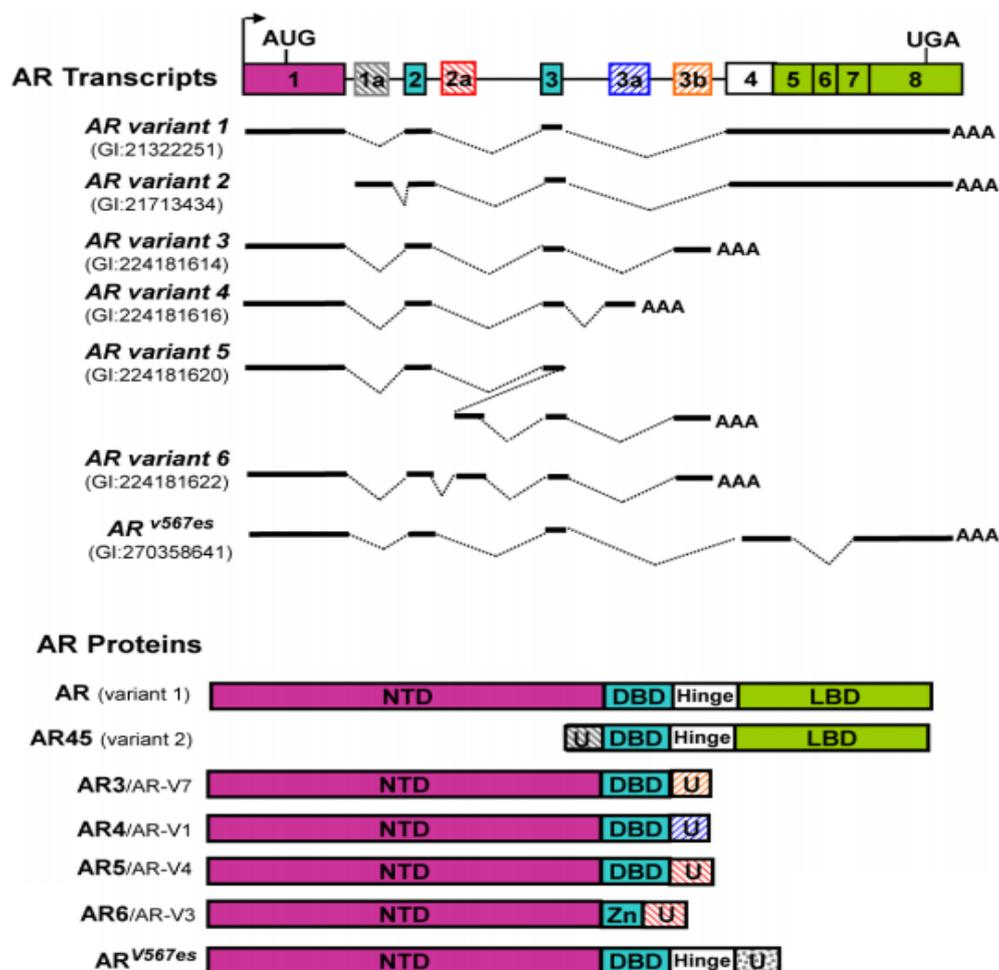


Figura 3. Estrutura esquemática das variantes de AR humano disponíveis no GenBank. As linhas grossas representam os éxons e as finas os íntrons (Guo, Yang et al. 2009).

Dentre as isoformas AR identificadas até agora, o AR3 (AR-V7) parece ser uma das principais variantes constitutivamente ativas em linhagens celulares de CaP (Guo, Yang et al. 2009). Um estudo de Guo et al. identificou as isoformas AR3, AR4 e AR5 na linhagem celular CWR22Rv1, que tem como característica a sua resistência à ablação androgênica. Nesse estudo foi verificado que a isoforma de expressão mais abundante é o AR3 (Guo and Qiu 2011). Também foi demonstrado que estas três variantes do AR estudadas foram capazes de induzir ativação da proliferação independente de androgênios na linhagem celular estudada, embora o AR3 pareça ser mais ativo em relação às outras duas variantes (Guo and Qiu 2011). Estes resultados acima descritos, associados à identificação desta isoforma também na HPB, sugerem que o AR3 pode desempenhar um papel

importante na regulação da homeostase normal da glândula prostática. Este grupo também retratou que o aumento na expressão de AR3 na linhagem celular LNCaP promove o crescimento celular mesmo em meio com redução de androgênios (Guo and Qiu 2011). Além disso, a superexpressão de AR3 em LNCaP resulta no aumento da proliferação celular e a depleção dessa variante endógena em CWR22Rv1 resulta na diminuição da proliferação. Em CaP resistentes à castração, o AR3 é superexpresso quando comparado com amostras de CaP sem ablação androgênica. Aliás, o aumento de AR e AR3 ocorre rapidamente após a ablação androgênica, em torno de 2 dias, e atinge níveis máximos no 14º dia. Estes dados demonstram a importância da presença de androgênios no ambiente celular, os quais atuam como moléculas chave na regulação da expressão das isoformas, que favorecem uma vantagem na proliferação celular em condições de ablação androgênica (Haile and Sadar 2011).

As variantes de AR podem exercer diferentes funções celulares em função do compartimento subcelular no qual estão localizadas. Por exemplo, em células COS-1 e LNCaP, AR3 é localizado principalmente no núcleo, sugerindo um papel na regulação da transcrição gênica. AR4 parece estar principalmente localizado no citoplasma, sugerindo uma função citoplasmática, enquanto que a variante AR8 está associada à membrana plasmática, podendo atribuir aspectos dinâmicos aos tipos celulares. É notável que a localização subcelular de uma determinada isoforma de AR pode ser dinâmica e varia em diferentes tipos de células. Por exemplo, ao contrário de células COS-1 e LNCaP, a localização do AR3 em células DU145 é bastante heterogênea e difusa no citoplasma, em cerca de 50% das células (Guo, Yang et al. 2009).

O AR pode atuar como fator de transcrição, sendo responsável por mediar a ativação ou repressão da transcrição de inúmeros genes. Essa modulação da transcrição gênica pode ocorrer pelo recrutamento de coativadores ou correpressores. Deste modo, o AR apresenta um importante papel na regulação da proliferação e diferenciação de células prostáticas, tornando-se um alvo de estudo para o entendimento da fisiopatologia do

CaP (Dean and Knudsen 2013). Contudo, a descoberta de genes alvos regulados pelo AR ainda é um desafio. Isso deve-se ao fato de que os genes alvos não se comportam igualmente em CaP resistentes à castração e em condições induzidas por androgênios em linhagens celulares. Em células específicas, a expressão de determinados genes é resultado do recrutamento de proteínas correguladoras específicas pelo AR. Assim, é de se esperar que variantes que não possuem determinadas regiões no RNAm apresentem alterações na interface da proteína, que podem alterar o recrutamento de co-reguladores. Além disso, já foram descritos diversos genes alvos das AR-V, como o gene KLK3 (que codifica o PSA), que tem sua transcrição ativada pela isoforma ARV567es. Ademais, a ausência de AR3 altera a expressão de um conjunto de 188 genes na linhagem CWR22Rv1. Portanto, a expressão de genes alvos das AR-V podem revelar biomarcadores para auxiliar na identificação de tumores resistentes a ablação androgênica (Haile and Sadar 2011).

1.5 Ciclo celular

O ciclo celular é um processo que visa à divisão celular viável pela duplicação do DNA cromossômico e posterior segregação em duas células-filhas geneticamente idênticas. É dividido em 2 fases: a interfase e a mitose (M), sendo a primeira constituída por 3 estágios: G1, S e G2. O ciclo celular é regulado por pontos de checagem constituídos por cinases dependentes de ciclinas (CDKs). As CDKs ativas durante o ciclo celular são 5: CDK2, CDK4 e CDK6 que pertencem ao estágio G1, CDK 2 no estágio S, e a CDK 1 no estágio G2 e na interfase (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003).

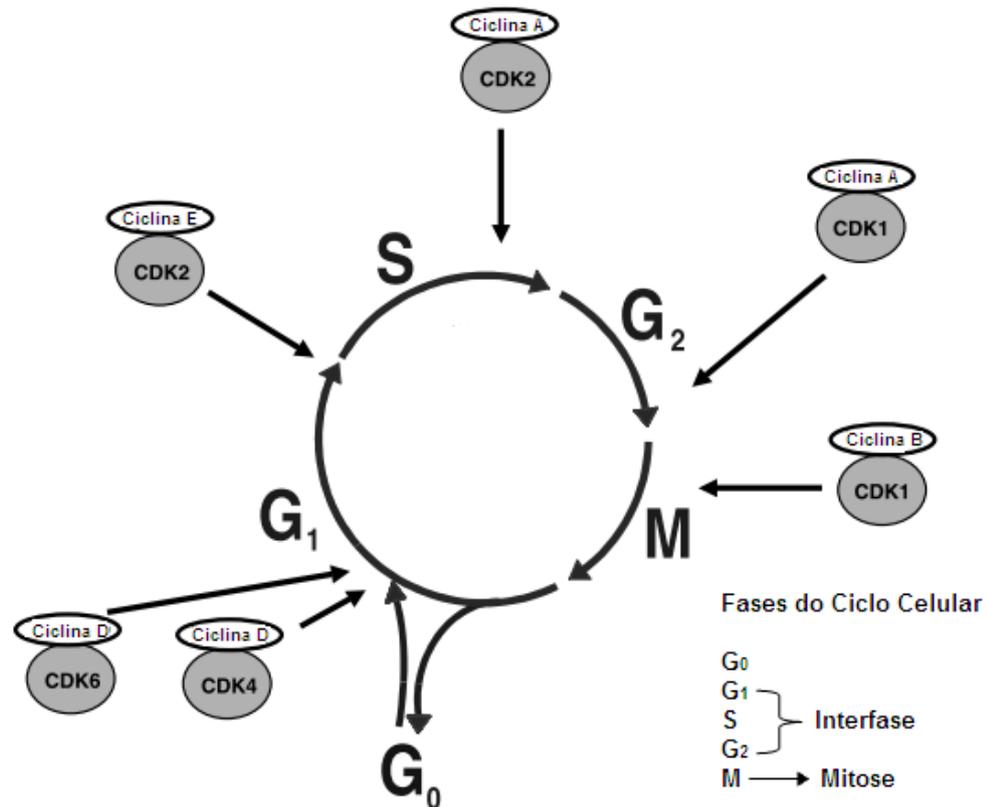


Figura 4. O ciclo celular, fases e pontos de verificação (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003).

Antes das células entrarem no estágio G₁ da interfase, elas permanecem em um estágio G₀, o qual não faz parte da subdivisão tradicional do ciclo celular. Em G₀ as células não estão em crescimento e nem em proliferação. Quando a célula recebe estímulos para iniciar o ciclo celular, ela passa para o estágio G₁ da interfase. Dentre as alterações celulares estão o aumento do tamanho e a síntese das proteínas necessárias para a duplicação do DNA. Antes da passagem para a fase S, a célula passa por um ponto de verificação, pela CDK2, em que é analisado se a célula está apta a realizar a duplicação cromossômica, processo que ocorre no estágio S. Em seguida a célula entra no estágio G₂, onde ocorre a síntese proteica e a duplicação de organelas celulares, como também o crescimento celular. Entre o estágio G₂ da interfase e a fase M, a célula passa pelo segundo ponto de verificação, por uma CDK1, onde é analisada a qualidade do DNA replicado na fase S e é realizada a avaliação das

condições celulares para a fase (M) (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003).

A fase da mitose é dividida em 4 etapas: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Na prófase, as moléculas de DNA são condensadas, e então, passam a ser chamadas cromátides-irmãs. Na metáfase ocorre o rompimento do envelope celular e as cromátides-irmãs alinham-se ao fuso mitótico. Neste momento, a célula passa pelo terceiro ponto de verificação onde o sistema de controle aciona a anáfase para prosseguir o ciclo. Na anáfase ocorre a separação das cromátides-irmãs, e na telófase, estas são empacotadas em núcleos distintos (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003).

Em tumores, ocorrem alterações genéticas no controle do ciclo celular, como em genes supressores tumorais e proto-oncogenes, acarretando na proliferação celular exagerada. Desta forma, a manutenção do ciclo celular normal é de suma importância no controle de muitas doenças.

1.6 Apoptose

A apoptose é um processo irreversível de morte celular programada, cujo objetivo é manter a homeostase das células dos tecidos (Norbury and Hickson 2001). Trata-se de um mecanismo complexo e sofisticado, envolvendo uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia (Elmore 2007).

Várias condições podem desencadear a apoptose; no entanto, faz-se necessário um sinal pró-apoptótico para o início do processo. Na presença do sinal, a célula sofre alterações como: compactação e segregação da cromatina, condensação do citoplasma, encolhimento celular e fragmentação nuclear e celular (Norbury and Hickson 2001; Elmore 2007). As proteínas responsáveis por desencadear as alterações compõem a família das caspases, sendo as caspases 2, 8, 9 e 10 iniciadoras e as caspases 3, 6 e 7 executoras (Riedl and Shi 2004; Elmore 2007).

O mecanismo de apoptose pode ocorrer através da via extrínseca ou intrínseca. Na primeira via, os receptores presentes na superfície celular, que podem ser TNF (fator de necrose tumoral) tipo 1 ou Fas (Receptor Fas), ligam-se a ligantes externos e desencadeiam a ativação da caspase 8, que possibilita a ativação das caspases executoras (Riedl and Shi 2004; Elmore 2007).

A segunda via é ativada em casos de dano ou estresse celular. A ativação desta via resulta no aumento da permeabilidade mitocondrial e a consequente liberação da proteína *citocromo c* para o espaço citoplasmático, promovendo assim a ativação das caspases executoras. A regulação da segunda via é alcançada através da interação de proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas que constituem a família Bcl-2. No momento em que uma célula recebe um sinal pró-apoptótico, ocorre um desbalanço na interação das proteínas no sentido pró-apoptótico levando à apoptose (Riedl and Shi 2004; Elmore 2007).

Tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca acabam no momento em que as caspases executoras são ativadas. Estas caspases permitem a degradação do material nuclear, de proteínas nucleares e do citoesqueleto através da ativação de endonucleases citoplasmáticas e proteases. As caspases executoras também tem ação sobre a citoqueratina e proteínas do citoesqueleto da membrana plasmática. Após a ação destas caspases, as alterações morfológicas e bioquímicas das células apoptóticas podem ser observadas (Slee, Adrain et al. 2001).

1.7 TP53 e MDM2

O gene TP53 (*tumor protein p53*) é um gene supressor tumoral envolvido na resposta celular a danos ao DNA. A proteína codificada por este gene, p53, é capaz de induzir uma série de genes alvos, tais como CDKN1A e Bax, levando a uma parada no ciclo celular (nos pontos de controle G1-S e G2-M) ou induzindo a apoptose (Liu, Zhu et al. 2013).

Alvo de transativação relevante da p53, o gene CDKN1A codifica a proteína p21^{CIP1/WAF1} inibidora de cinase dependente de ciclina. A superexpressão deste gene, que ocorre em casos de superexpressão de p53, bloqueia o crescimento celular em G1, pois inibe a ciclina que realiza a checagem nesta fase. Em caso de inativação do gene TP53, a célula perde a capacidade de responder adequadamente a danos do DNA, o que permite uma base para o acúmulo de mutações adicionais que promovem o fenótipo tumoral (Momand and Zambetti 1997).

A p53 tem importante papel na apoptose. Dependendo do grau e da circunstância em que a p53 é ativada, pode ser tomada a decisão celular para iniciar a morte celular após a exposição a danos ao DNA. Os mecanismos para a p53 induzir a apoptose devem-se a indução da transcrição dos genes FAS, BAX ou NOXA, que codificam os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2. Contudo, a p53 não é necessariamente pró-apoptótica, pois também atua retardando e bloqueando a morte de células (Norbury and Hickson 2001).

O gene TP53 é frequentemente inativado em cânceres humanos, sendo que a perda de função deste gene está associada ao aumento da tumorigenicidade e no tamanho do tumor. A inativação deste gene pode ocorrer por mutações no gene, alterações da localização subcelular da proteína p53, ou por proto-oncogenes como MDM2 (*MDM2 oncogene, Mouse Double Minute 2*) (Momand and Zambetti 1997).

No câncer de próstata, as mutações no gene do TP53 são encontradas em tumores avançados, como também podem estar associadas ao surgimento de metástases e à independência androgênica (Downing, Russell et al. 2003). Existem evidências que a proteína p53 pode estar relacionada à sinalização da regulação androgênica, contudo, os mecanismos de como o processo ocorre são difíceis de ser interpretados (Cronauer, Schulz et al. 2004). Um estudo de Burchardt e cols. mostrou que a diminuição da expressão de p53 na linhagem LNCaP permite a formação de tumores resistentes à ablação androgênica em ratos castrados, enquanto em células LNCaP com expressão normal de p53 ocorre o contrário. Este

resultado aumenta a evidência que p53 pode vir a regular diretamente a sinalização androgênica pelo AR e essa interação pode ocorrer devido à complexidade de ambas as proteínas (Burchardt, Burchardt et al. 2001).

Em condições normais, a p53 está presente em concentrações muito baixas, pelo fato de estar no citoplasma celular interagindo com a proteína Mdm2, a qual a inativa (Liu, Zhu et al. 2013). O gene que codifica a proteína Mdm2 está localizado em humanos no cromossomo 12q13-14. A proteína Mdm2 possui 491 aa e apresenta em sua estrutura dois dedos de zinco e um domínio ácido (Momand and Zambetti 1997). A transcrição de MDM2 é ativada e regulada pela proteína p53, que se liga ao promotor do gene. Por sua vez, a proteína p53 é inibida por Mdm2 (Golubovskaya and Cance 2013). Os mecanismos pelos quais Mdm2 inibe funcionalmente p53 podem ocorrer devido à ocultação do domínio ácido presente na p53, ou também por prevenir a ligação da p53 ao DNA (Momand and Zambetti 1997).

A interação entre Mdm2 e p53 é interrompida quando ocorre a exposição celular a fatores estressores, como radiações ionizantes, radicais livres, hipóxia e perturbações por reagentes químicos. O complexo Mdm2-p53 se desfaz devido à fosforilação de p53, que a deixa ativa. Com a ativação da p53, esta é rapidamente translocada ao núcleo da célula, onde liga-se ao DNA de genes alvos, como CDKN1A, para, ou permitir o reparo ao DNA, ou levar a células à apoptose (Liu, Zhu et al. 2013).

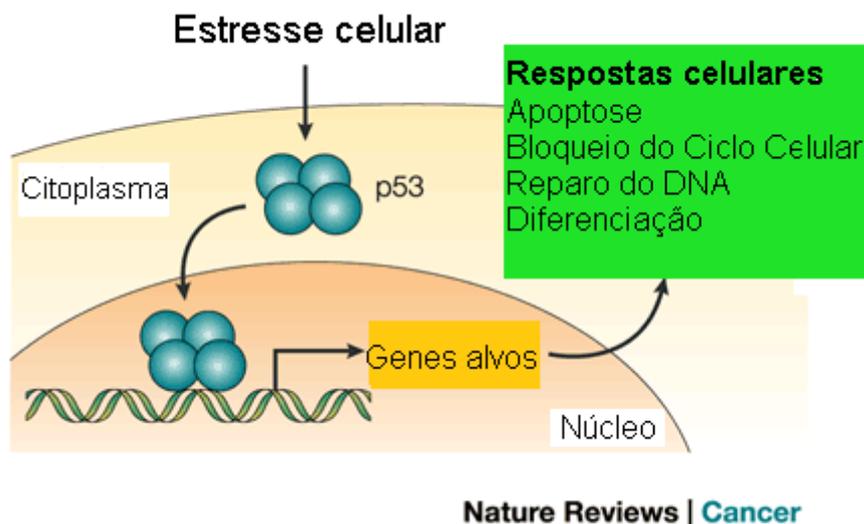


Figura 5. Mecanismo de ação de p53. Adaptado de (Chene 2003).

Para o desenvolvimento celular normal, é muito importante que haja um equilíbrio entre Mdm2 e p53. A importância do equilíbrio entre essas proteínas foi demonstrada correlacionando os níveis de Mdm2 e p53 livres e do complexo Mdm2-p53 em linhagens celulares. Uma linhagem que apresenta superexpressão de Mdm2 e que não contém a proteína p53 detectável, e esta não se apresenta complexada ao Mdm2, possui alta taxa de proliferação, portanto, apresenta características tumorigênicas. Já uma linhagem que superexpressa p53 artificialmente e acumula esta proteína livre, realiza paradas na fase G1 da interfase do ciclo celular e apresenta menor taxa de proliferação. No entanto, em células normais em proliferação, são encontrados baixos níveis de p53 e Mdm2. Além disso, as células que apresentam superexpressão de Mdm2 são incapazes de parar em G1 em resposta à p53, fato que demonstra a importância da relação de equilíbrio funcional entre estas duas proteínas (Momand and Zambetti 1997).

1.8 CDKN1A

O gene CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) codifica a proteína p21^{Cip1/Waf1}, primeira inibidora de cinase dependente ciclina (CDKI) identificada. Esta proteína contém 164 aa, com peso molecular de 20kDa. Ela apresenta papel importante no ciclo celular, pois inibe as CDKs do tipo 2,

3, 4 e 6, promovendo assim, a interrupção da síntese de DNA e do ciclo celular. A nomeação Cip se dá devido ao fato da interação com as CDKs, e a nomeação Waf1 é devida a ativação por p53 (Cmielova and Rezacova 2011).

Esta proteína é de extrema relevância no estudo de tumores. Como possui função inibitória da proliferação celular, pode contribuir para o potencial supressor tumoral. Assim, a ausência da proteína é marcada pela proliferação com DNA danificado, o que permite a progressão tumoral (Cmielova and Rezacova 2011). A proteína também pode apresentar atividade antiapoptótica, pois a parada no ciclo celular protege que as células sofram apoptose induzida por estresse, assim, pode ser considerada oncogênica (Gartel and Tyner 2002).

A transcrição do gene CDKN1A é induzida por mecanismos dependentes e independentes de p53 (Gartel and Tyner 2002). Quando dependente de p53, a regulação acontece em situação desagradável à célula. A proteína p53 induz o aumento da transcrição de CDKN1A para que ocorra a interrupção do ciclo celular (Cmielova and Rezacova 2011). O aumento da expressão de CDKN1A no câncer de próstata pode estar associado a metástases e à instabilidade gênica (Ceccarelli, Santini et al. 2001), sendo que o aumento da sua expressão pode ser devido à regulação por p53 ou até por hormônios androgênicos (Lu, Liu et al. 1999). Existem evidências de que androgênios podem regular positivamente a expressão de CDKN1A através de um elemento responsável a androgênios (ARE, *androgen response element*) presente no promotor do CDKN1A (Lu, Liu et al. 1999). Desse modo, é possível que o AR ativado, em situações de ausência de androgênios, possa regular a expressão de CDKN1A. A elevada expressão de p21 em câncer está relacionada com um pior prognóstico da doença, e assim, pode estar associada a condições de ausência de androgênios (Martinez, Yang et al. 2002).

2. Artigo

TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

PERIÓDICO: The Prostate

TÍTULO: Análise da Expressão Gênica de TP53, MDM2 e CDKN1A e sua possível correlação com as isoformas do Receptor de Androgênios

TÍTULO REDUZIDO: Análise de TP53, MDM2 e CDKN1A em Tumores Prostáticos

NORMAS DA REVISTA: Anexo I

Título: Análise da Expressão Gênica de TP53, MDM2 e CDKN1A e sua possível correlação com as isoformas do Receptor de Androgênios

Título reduzido: Expressão de TP53, MDM2 e CDKN1A em tumores da próstata.

Caetana Machado Ledur ^{1,2}; Ana Caroline Hillebrand, MSc ^{1,2}; Patrícia Borba Martiny, MSc ^{1,2}; Brasil Silva Neto, PhD ³; *Ilma Simoni Brum PhD ^{1,2}

¹ Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

² Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas Porto Alegre, Brasil

³ Serviço de Urologia - Hospital de Clínicas Porto Alegre, Brasil

* Autor correspondente:

Rua Sarmiento Leite, 500

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, Brasil

Fone: 51 3308 3559

Endereço de email: Ilma@ufrgs.br

Financiamento: FIPE-HCPA 120320

RESUMO

Introdução: O câncer de próstata (CaP) é dependente de androgênios para a proliferação e manutenção do tumor, sendo a sinalização androgênica dada através do receptor de androgênios (AR). As variantes desse receptor (AR-Vs), geradas a partir de *splicing* alternativo, são constitutivamente ativas e apresentam expressão elevada em CaP mais avançados, onde há depleção androgênica. Genes como TP53 (*tumor protein p53*), MDM2 (*MDM2 oncogene, Mouse Double Minute 2*) e CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) são essenciais para o controle do ciclo celular e podem apresentar alterações que contribuam para a proliferação tumoral e um pior prognóstico. A análise dos genes do ciclo celular e a possível correlação com a expressão das AR-Vs pode permitir um melhor entendimento acerca da patogênese do CaP.

Métodos: A expressão gênica de TP53, MDM2 e CDKN1A foi realizada por RT-qPCR em 26 amostras de CaP e 27 de hiperplasia prostática benigna (HPB) de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Resultados: Todos os genes analisados foram superexpressos no CaP em relação à HPB ($P < 0,05$). No grupo CaP, a expressão dos genes TP53 e do AR3/5/6 foi correlacionada positivamente, além disso, a expressão de MDM2 foi correlacionada com a do AR *full-length* e do AR3/5/6. O gene CDKN1A não apresentou nenhuma correlação com as variantes do AR.

Conclusão: A maior expressão dos genes TP53, MDM2 e CDKN1A no CaP, pode estar envolvida com a tentativa de reversão o processo neoplásico. A correlação dos genes com as AR-Vs pode sugerir que existe uma correção entre as AR-Vs e os genes do ciclo celular.

PALAVRAS-CHAVE: tumores da próstata, ciclo celular, variantes de *splicing* do receptor de androgênios, *splicing* alternativo.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento normal da próstata depende do eixo de sinalização androgênica, sendo a testosterona e a diidrotestosterona (DHT) os hormônios androgênicos que estão associados à funcionalidade desta glândula (1). Estes hormônios podem ligar-se ao receptor de androgênios (AR), desencadeando a sinalização androgênica, que é necessária para o desenvolvimento normal da próstata assim como para a progressão do câncer de próstata (CaP) (2,3).

O receptor de androgênios apresenta multidomínios de proteínas, incluindo um domínio de transativação N-terminal (NTD), um domínio de ligação ao DNA (DBD) e um domínio de ligação ao ligante (LBD) na região C-terminal. Este último domínio parece ser dispensável para a atividade transcricional de AR, uma vez que a deleção desta região leva à ativação constitutiva de sua capacidade transcricional (4). Como o câncer de próstata (CaP) apresenta comportamento dependente de androgênios para seu crescimento e sobrevivência, um dos tratamentos mais comuns consiste na terapia de ablação androgênica, química (fármacos antiandrogênicos) ou cirúrgica (orquidectomia). No entanto, na maioria dos pacientes, o CaP eventualmente progride à uma condição refratária à depleção de androgênios (4).

Recentemente foram descritas isoformas do AR, que são produtos gerados pelo evento de processamento do pré-mRNA conhecido como *splicing* alternativo. Estudos em linhagens celulares evidenciam o importante papel destas isoformas no desenvolvimento e progressão do CaP. Já foram descritas várias isoformas em CaP e HPB, dentre elas estão: AR3 (também chamada de AR-V7), AR4 (AR-V1), AR5 (AR-V4) E AR6 (AR-V3). Estas isoformas apresentam os domínios NTD e DBD intactos, porém perdem as regiões *hinge* e LBD, de forma que as terapias antiandrogênicas convencionais dirigidas à região LBD não apresentam ação sobre a função destas variantes do AR, e a progressão tumoral é favorecida (2,4).

O AR atua como fator de transcrição e é capaz de mediar a ativação ou repressão da transcrição de inúmeros genes, o que pode ocorrer através do recrutamento de coativadores ou correpressores. Devido a isso, ele apresenta um importante papel na proliferação e diferenciação de células prostáticas (5). Sabe-se que as células tumorais apresentam alterações no ciclo celular que permitem sua sobrevivência e, no câncer, genes do ciclo celular como TP53 (*tumor protein p53*), MDM2 (*MDM2 oncogene, Mouse Double Minute 2*) e CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) podem apresentar alterações que contribuam para a proliferação tumoral.

O gene TP53 é um gene supressor tumoral envolvido na resposta celular a danos ao DNA. A proteína codificada por este gene é capaz de induzir uma série de genes alvos, tais como CDKN1A, levando a parada no ciclo celular (nos pontos de controle G1-S e G2-M) (6). A proteína p21^{Cip1/Waf1} inibidora de cinase dependente ciclina (CDKI) é codificada por

CDKN1 e apresenta papel importante no ciclo celular, pois inibe as CDKs do tipo 2, 3, 4 e 6, promovendo assim, a interrupção da síntese de DNA e do ciclo celular (7). A inativação de TP53 é frequente em cânceres e pode ocorrer através de mutações no gene, alterações da localização subcelular da proteína p53, ou por proto-oncogenes como MDM2 (8). A transcrição de MDM2 é ativada e regulada pela proteína p53. Por sua vez, a proteína p53 é inibida por Mdm2 (9). As duas proteínas estão complexadas no citoplasma e este complexo se desfaz em condições de estresse, devido à fosforilação de p53, que deixa esta proteína ativa para exercer suas funções (6).

Levando em consideração o papel do AR no desenvolvimento prostático e proliferação tumoral, a participação dos genes TP53, MDM2 e CDKN1A na manutenção e controle do ciclo celular, este estudo é de grande importância para um melhor entendimento acerca da patogênese do CaP e da HPB. Por conseguinte, o objetivo deste estudo consiste em analisar os níveis de RNAm de TP53, MDM2 e CDKN1A, e posteriormente, verificar sua possível correlação com a expressão gênica do AR e das variantes do AR (AR3, AR4, AR5 e AR6).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras de CaP (N = 26) foram oriundas de prostatectomia radical e prostatovesicuclectomia, e as amostras de HPB (N = 27) de prostatectomia aberta e ressecção transuretral. A confirmação do

diagnóstico foi realizada pelo serviço de patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os pacientes escolhidos atenderam os critérios de inclusão, tendo sido considerados como critérios de exclusão: nenhuma outra neoplasia concomitante e não ter recebido hormonioterapia ou quimioterapia.

Aspectos éticos

Este estudo faz parte de um projeto maior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, que já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, sob número 12-0320. Todos os pacientes que participaram da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo 5.2) autorizando a utilização do material para a pesquisa.

Extração de RNA total, purificação e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizada a partir de 0,2g de tecido prostático, utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, EUA) segundo o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi purificado com o kit PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, EUA), segundo o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA purificado foi realizada no espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia) nos comprimentos de onda 260 e 280nm. O RNA foi considerado puro quando a razão das absorbâncias 260/280 nm apresentou valor superior a 1,6. A síntese do cDNA foi realizada por transcrição reversa utilizando o kit Super Script III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, EUA), a partir de 2µg de RNA total purificado.

Amplificação por RT-qPCR

A análise de expressão gênica a partir de RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa a partir de transcrição reversa) foi realizada utilizando o termocilador StepOne Plus™ (Applied Biosystems®). Foram utilizadas sondas de hidrólise TaqMan® (Life Technologies, EUA) para os genes alvos: TP53 (Hs01034249_m1), MDM2 (Hs00242813_m1), CDKN1A (Hs00355782_m1), B2M (Hs00984230_m1). A quantificação relativa das amostras foi realizada através de uma curva padrão contendo 5 pontos em duplicada com concentração conhecida de um *pool* de cDNA. A quantificação de cada amostra foi realizada a partir do ciclo limiar (Cq) e a expressão dos níveis de mRNA de todos genes alvos foi normalizada pelo gene endógeno beta-2-microglobulina (B2M).

Expressão gênica de AR e das AR-Vs

As análises de expressão gênica de AR e das AR-Vs foram realizadas por Hillebrand e cols. (dados não publicados). Para a amplificação do AR total foi utilizado o ensaio Hs00171172_m1 (Life Technologies), que é específico para os transcritos 1 (GI:349501065 - *full-length*) e 2 (GI:349501066) do AR (sendo denominado AR1/2). Para amplificação das isoformas foram utilizados os seguintes ensaios: AR4, AR3/5/6 e AR5/6. Dada a alta similaridade entre as sequências das isoformas AR3, AR5 e AR6, não é possível o desenho de ensaio específico para cada isoforma, optando-se pela amplificação das isoformas em conjunto. A fim de inferir um valor para a expressão do AR3, optou-se pela razão das expressões

(AR3/5/6) / (AR5/6). A expressão de todos os genes alvos foi normalizada pela B2M (10). Todos os ensaios foram sintetizados pela Life Technologies.

Análise estatística

A expressão gênica de todos os genes analisados não apresentou distribuição normal, sendo então analisada pelo teste de Mann-Whitney. O teste de correlação utilizado foi o teste de Spearman. A expressão gênica e a correlação foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS 20 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

RESULTADOS

Características das amostras estudadas

As características principais das amostras estudadas estão dispostas na tabela I. A mediana de idade (percentil 25 - 75) não foi diferente entre os grupos, 68 (60,50 - 69,50) para o grupo HPB e 64 (60 - 69) para o grupo CaP (* $P = 0,714$). A mediana da dosagem sérica de PSA pré-operatório foi de 5,6 (4,42 - 12,55) ng/dL no grupo HPB e 8,0 (5,58 - 11,90) ng/dL no grupo CaP, sendo maior no grupo CaP quando comparada ao grupo HPB ($P = 0,009$). O escore de Gleason (avalia a graduação histológica das células tumorais), estadiamento tumoral (extensão do tumor), peso da próstata e recidiva bioquímica foram avaliadas somente no grupo CaP. A mediana do peso da próstata em amostras de CaP foi de 39,00 g (32,00 - 45,50). Das 26 amostras de CaP, 19 (73,1%) apresentaram Gleason ≤ 7 (3+4) e 7 (26,9%)

amostras ≥ 7 (4+3). Quanto ao estadiamento, 16 (61,5%) amostras foram classificadas como T2 e 10 (38,5%) como T3. Já no que se refere à recidiva bioquímica, 6 pacientes (23,1%) recidivaram, ou seja, apresentaram em 2 dosagens de PSA pós-operatório valores $\geq 0,2$ ng/dL, e 20 (76,9 %) pacientes não tiveram recidiva até o momento.

Tabela I. Caracterização das amostras estudadas. ¹ dados não avaliados para as amostras de hiperplasia prostática benigna. ² dados apresentados em número de amostra (%). ³ Teste de Mann-Whitney.

	HPB (n=27)	CaP (n=26)	Valor-P
Idade (mediana(percentil 25-75))	64,00 (60,00 – 69,00)	64,50 (60 – 69)	0,714 ³
PSA pré-operatório (ng/dL) (mediana(percentil 25-75))	5,6 (4,42 – 12,55)	8,0 (5,58 – 11,90)	0,009 ³
Peso da peça (g) ¹	-	39 (32 – 45,50)	n/a
Score de Gleason ^{1,2}	-		n/a
Gleason ≤ 7 (3+4)		19 (73,1%)	
Gleason ≥ 7 (4+3)		7 (26,9%)	
Estadiamento (pTNM) ^{1,2}	-		n/a
T2		16 (61,5%)	
T3		10 (38,5%)	
Recidiva Bioquímica ^{1,2}	-		n/a
Sim		6 (23,1%)	
Não		20 (76,9%)	

Análises dos níveis de mRNA dos genes TP53, MDM2 e CDKN1A

Para a análise de expressão gênica do TP53, MDM2 e CDKN1A, o cDNA de 27 amostras de HPB e 26 amostras de CaP foi analisado. A expressão tecidual dos mRNAs foi quantificada por RT-qPCR.

Os dados de expressão gênica de todos os genes estudados não apresentaram distribuição normal, sendo considerados não paramétricos. A expressão gênica (tabela II) [mediana (percentil 25% - 75%)] de TP53 foi de 0,9967 (0,3952 - 1,4472) no grupo HPB e 1,5580 (0,8471 - 2,8556) no grupo CaP, sendo mais expresso no CaP em relação à HPB (* $P=0,012$)(Figura 1-Material suplementar).

A expressão gênica de MDM2 foi de 1,1464 (0,8073 - 2,3870) no grupo HPB e 3,5086 (1,6486 - 8,1505) no grupo CaP, sendo maior no grupo CaP que no grupo HPB (* $P<0,001$) (Figura 2-Material suplementar).

.A expressão gênica CDKN1A foi de 0,6452 (0,3477 – 0,9680) no grupo HPB e 2,3317 (0,7825 – 3,9038) no grupo CaP, sendo maior no grupo CaP que no grupo HPB. (* $P<0,001$) (Figura 3-Material suplementar).

Tabela II. Resultados da Expressão Gênica de TP53, MDM2 e CDKN1A em hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

	HPB	CaP	<i>P</i>
TP53	0,9967 (0,3952 - 1,4472)	1,5580 (0,8471-2,8556)	0,012 *
MDM2	1,1464 (0,8073 - 2,3870)	3,5086 (1,6486 - 8,1505)	0,001 *
CDKN1A	0,6452 (0,3477 – 0,9680)	2,3317 (0,7825 – 3,9038)	0,001 *

Para verificar a presença de correlação entre as variáveis estudadas, foi realizado o teste de correlação de Spearman. A correlação entre TP53 e MDM2 foi positiva no grupo HPB (0,792; * $P < 0,01$) e também no grupo CaP (0,807; * $P < 0,01$) (dados não mostrados). Para as variáveis idade, Gleason, estadiamento e recidiva bioquímica, não foi encontrada nenhuma correlação com a expressão dos genes em estudo.

Também foi avaliada a possível correlação entre os genes alvos estudados (TP53, MDM2 e CDKN1A) e as isoformas do receptor de androgênios estudadas por Hillebrand e cols., (dados não publicados)(10). Nas amostras de HPB não foi encontrada nenhuma correlação. Nas amostras de CaP, foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis mRNA de TP53 e do AR3/5/6 (0,438; $P = 0,028$) (tabela III). Nesse mesmo grupo, a expressão do gene MDM2 apresentou uma correlação positiva com a expressão do AR1/2 (0,434; $P = 0,030$) e com a do AR3/5/6 (0,482; $P = 0,015$). A expressão gênica do gene CDKN1A não apresentou correlação significativa com nenhuma isoforma do receptor de androgênios.

Tabela III. Correlação entre dados analisados em amostras de câncer de próstata. Apresentadas como r (P). As variáveis p21, AR4, Razão (AR3/5/6)/(5/6) foram testadas, mas não apresentaram correlação com nenhuma das outras variáveis.

CaP	Razão			
r (P)	AR1/2	AR	AR3/5/	(AR3/5/6)
		4	6	/ (5/6)
TP53	-	-	0,438 (0,028)	-
MDM2	0,434 (0,030)	-	0,482 (0,015)	-
CDKN1A	-	-	-	-

DISCUSSÃO

Na glândula prostática, os androgênios são essenciais para a manutenção da proliferação e diferenciação das células epiteliais (11). O AR atua como fator de transcrição, sendo responsável pela regulação da transcrição de inúmeros genes, podendo mediar o recrutamento de coativadores e correpressores da transcrição gênica. Assim, o AR exerce um papel importantíssimo na regulação normal da próstata (5). Portanto, como a biologia do CaP é vinculada à atividade do AR, muitos estudos buscam entender quais as contribuições específicas da perda da regulação do AR em vários contextos celulares (5).

O epitélio normal prostático e o CaP apresentam expressão diferencial de diversos genes. Genes que exercem funções como transdução de sinais, geralmente são superexpressos, enquanto genes supressores tumorais são

pouco expressos. No entanto, a baixa expressão de genes supressores tumorais, junto com a diminuição da apoptose e a elevada proliferação, podem ser considerados fatores favoráveis para o câncer (12). Contudo, a conservação da regulação do ciclo celular é fundamental para determinar se a célula irá se diferenciar, proliferar ou se irá morrer (11). No presente estudo foi analisada a expressão gênica dos genes TP53, MDM2 e CDKN1A, genes importantíssimos na regulação do ciclo celular.

Resultados prévios encontrados pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) demonstraram que, embora a expressão da forma *full-length* do AR (AR1/2) não apresente expressão diferencial entre as amostras de CaP e HPB, as AR-Vs são diferencialmente expressas entre estes dois tecidos. Com base nestas evidências, pode-se assumir a participação das AR-Vs tanto no início do desenvolvimento tumoral, quanto na manutenção da proliferação celular e recidiva tumoral do CaP. Visto isso, optou-se por estudar genes-chave na regulação do ciclo celular no intuito de compreender melhor o mecanismo pelo qual as AR-Vs podem dirigir a manutenção e proliferação celular no CaP.

Os presentes resultados demonstram a superexpressão dos genes TP53 e MDM2 no CaP quando comparado à HPB. Análises de imunohistoquímica realizadas por Ji e cols. corroboram com estes resultados (13). Pelo fato do gene TP53 ter um importante papel como supressor tumoral com função de regular a progressão no ciclo celular (5), o aumento da expressão gênica de TP53 pode estar relacionado a respostas ao estresse celular (ex.: dano ao DNA) a fim de reverter a transformação neoplásica (14). No entanto, a perda do gene TP53 pode afetar a

proliferação celular e permitir a progressão tumoral (5). Mutações em TP53 são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tipos de câncer (15); contudo, não são comuns em CaP primário, embora possam ocorrer com o avanço da doença (16), sendo descritas em 45% de amostras de CaP que sofreram metástase óssea (17).

Nosso resultado referente à superexpressão de MDM2 no CaP condiz com um estudo de Leite e cols. que encontrou que MDM2 é superexpresso em amostras de CaP de pacientes submetidos a prostatectomia radical. Além disso, estes autores demonstraram que a expressão de MDM2 está associada à taxa de proliferação celular, pelo fato de estar significativamente associada ao volume tumoral. A elevada expressão de MDM2 também pode estar associada a um pior prognóstico e a tumores mais agressivos (17); todavia, em nossas análises não encontramos correlação com o escore de Gleason e o estadiamento do tumor.

Em condições normais à célula, os níveis de Mdm2 e p53 geralmente são baixos e estão em equilíbrio (6), o que parece ter importante papel, visto que quando em desequilíbrio pela maior expressão do gene MDM2, ocorrem alterações no ciclo celular que favorecem a proliferação e o processo tumoral (8). Nossos resultados mostraram uma correlação fortemente positiva entre MDM2/TP53 em HPB e em CaP sugerindo o equilíbrio destes genes em ambos grupos. Assim, mesmo que tenhamos encontrado uma elevada expressão destes genes no CaP, a presença do equilíbrio é importante para a manutenção do ciclo celular.

Também encontramos aumento na expressão gênica de CDKN1A no CaP quando comparado à HPB. Devido ao fato de CDKN1A ser regulado pela proteína p53 (7) e a expressão do gene TP53 estar aumentada no CaP, nossos resultados sugerem que o aumento de CDKN1A pode ser devido à sua regulação via p53. A função supressora tumoral do gene CDKN1A pode explicar estes resultados, visto que a parada do ciclo celular em resposta a algum dano, no intuito de reverter a transformação neoplásica do CaP, pode ser um mecanismo de proteção da célula frente à carcinogênese, posto que a não expressão (ou ausência) desse gene pode favorecer o processo tumoral. De maneira controversa, a proteína codificada por CDKN1A, p21, pode exercer função antiapoptótica, possibilitando a progressão tumoral. O aumento desta proteína já foi descrita em câncer de próstata e mama, e em muitos casos está correlacionada com agressividade tumoral (7).

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa observamos que os níveis de mRNA do AR 3/5/6 estão mais elevados nas amostras de CaP do que nas amostras de HPB ($P = 0,044$)(10), e, ao correlacionarmos estes dados com os resultados encontrados pelo presente estudo, encontramos uma correlação positiva entre os níveis de expressão de mRNA do TP53 com os níveis de expressão do mRNA do AR3/5/6. Este resultado demonstra que quando ocorre o aumento da expressão gênica de AR3/5/6, ocorre o aumento em paralelo da expressão de TP53.

Embora na literatura esta correlação tenha sido demonstrada somente entre o AR (não suas isoformas) e o TP53 (16,18), podemos acreditar que esta discrepância entre os dados pode ser devida ao fato de que no presente trabalho avaliamos de maneira separada a expressão do AR *full-*

length e de suas isoformas. Ainda nesse sentido, Guseva e cols. sugerem que a interação entre o AR e o p53 ocorre através do domínio DBD (*DNA binding domain*), região que também está expressa nas isoformas do AR. Juntos, esses dados nos permitem assumir que sim, as isoformas em questão também interagem com o p53, embora sejam necessários experimentos mais detalhados para comprovar isto.

Tanto p53 quanto AR são fatores de transcrição que podem regular a transcrição de diversos genes, sendo também possível a regulação entre ambos (16). Existem evidências que p53 pode modular a sinalização androgênica, pois a elevada expressão de p53 na linhagem celular PC-3 diminui a transativação no promotor do gene KLK3 (que codifica o PSA) pelo AR (19). Outro estudo sugere que a diminuição da expressão de p53 na linhagem LNCaP permite a formação de tumores resistentes à ablação androgênica em ratos castrados, enquanto em células LNCaP com expressão normal de p53 ocorre o contrário (20). Além disso, Guseva e cols. sugerem que a interação entre ambas as proteínas ocorre devido a sua complexidade funcional e que na presença da proteína p53, a interação com o AR restringe os sítios de ligação do AR nos genes alvos. Já na ausência de p53, o AR consegue se ligar nas regiões AREs e ativar a transcrição de genes levando a proliferação prostática (18). Portanto, enquanto que os níveis de mRNA do p53 e do AR3/5/6 estão positivamente correlacionados, estudos de interação proteína-proteína sugerem que p53 regula negativamente a proteína AR (21), isto é, podemos acreditar que esta interação pode ser devida a uma tentativa da célula em minimizar ou até

abolir a sinalização androgênica exercida pelo AR e também por suas isoformas, isto tudo em busca da reversão neoplásica.

Também encontramos uma correlação positiva entre a expressão do MDM2 e a expressão do AR *full-length* e AR3/5/6. A elevada expressão das AR-Vs geralmente está relacionada a cânceres refratários à ablação androgênica, visto que nestas amostras os níveis de expressão das AR-Vs são significativamente mais elevados do que em amostras de CaP primário (2,4), e nestes, mais elevados que na HPB (10). Além disso, a superexpressão das isoformas está relacionada à recidiva tumoral em pacientes submetidos à cirurgia para retirada do tumor (4,10). No entanto, interações entre AR, AR-Vs e Mdm2 são pouco descritas. Uma interação descrita na literatura sugere que a proteína Mdm2 age como uma E3 ubiquitina ligase, induzindo a ubiquitinação do AR e promovendo a sua degradação (22). Contudo, a presença de mutações em MDM2 pode dar origem a proteínas incapazes de promover a degradação do AR (5). Embora exista uma correlação positiva entre as expressões de MDM2 com o AR *full-length* e AR3/5/6, é possível que a interação proteína-proteína ocorra de forma negativa. Deste modo, a elevada expressão dos genes em estudo no CaP e a associação com as AR-Vs nos sugerem novos caminhos para o entendimento do desenvolvimento do CaP.

CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram a maior expressão dos genes TP53, MDM2 e CDKN1A no carcinoma comparado à HPB, evidenciando a participação dos genes estudados no desenvolvimento e na manutenção da proliferação celular no CaP. Do mesmo modo, as correlações encontradas com as isoformas do receptor de androgênios sugerem uma possível interação entre os genes estudados e as isoformas, evidenciando a interação entre a via de sinalização androgênica e genes alvo do ciclo celular. Entretanto, estudos precisam ser realizados para um melhor entendimento destas interações entre proteínas.

SUPORTE FINANCEIRO

As agências financiadoras deste trabalho foram: CAPES, CNPq, FAPERGS, FIPE/HCPA.

CONFLITO DE INTERESSE

Todos autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Ahmed A, Ali S, Sarkar FH. Advances in androgen receptor targeted therapy for prostate cancer. *J Cell Physiol* 2014;229(3):271-276.
2. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, Han M, Partin AW, Vessella RL, Isaacs WB, Bova GS, Luo J. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2009;69(1):16-22.
3. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, Kim K, Sawyers CL. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(39):16759-16765.
4. Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, Kong X, Melamed J, Tepper CG, Kung HJ, Brodie AM, Edwards J, Qiu Y. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res* 2009;69(6):2305-2313.
5. Dean JL, Knudsen KE. The role of tumor suppressor dysregulation in prostate cancer progression. *Curr Drug Targets* 2013;14(4):460-471.
6. Liu C, Zhu Y, Lou W, Nadiminty N, Chen X, Zhou Q, Shi XB, deVere White RW, Gao AC. Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. *Prostate* 2013;73(4):418-427.
7. Cmielova J, Rezacova M. p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]. *J Cell Biochem* 2011;112(12):3502-3506.
8. Momand J, Zambetti GP. Mdm-2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem* 1997;64(3):343-352.
9. Golubovskaya VM, Cance WG. Targeting the p53 pathway. *Surg Oncol Clin N Am* 2013;22(4):747-764.
10. Hillebrand AC. Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata e a sua possível associação com a agressividade do tumor. Porto Alegre: UFRGS; 2013.
11. Lu S, Liu M, Epner DE, Tsai SY, Tsai MJ. Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter. *Mol Endocrinol* 1999;13(3):376-384.
12. Romics I, Banfi G, Szekely E, Krenacs T, Szende B. Expression of p21(waf1/cip1), p27 (kip1), p63 and androgen receptor in low and high Gleason score prostate cancer. *Pathol Oncol Res* 2008;14(3):307-311.
13. Ji K, Wang B, Shao YT, Zhang L, Liu YN, Shao C, Li XJ, Li X, Hu JD, Zhao XJ, Xu DQ, Li Y, Cai L. Synergistic suppression of prostatic cancer cells by coexpression of both murine double minute 2 small interfering RNA and wild-type p53 gene in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338(1):173-183.
14. Chappell WH, Lehmann BD, Terrian DM, Abrams SL, Steelman LS, McCubrey JA. p53 expression controls prostate cancer sensitivity to

- chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. *Cell Cycle* 2012;11(24):4579-4588.
15. Saidi S, Georgiev V, Stavridis S, Penev M, Stankov O, Dohcev S, Banev S, Danilovski O, Ivanovski O, Popov Z. Evaluation of the value of p53 protein expression in the extra-capsular extension of prostate cancer. *Prilozi* 2011;32(2):213-220.
 16. Guseva NV, Rokhlin OW, Bair TB, Glover RB, Cohen MB. Inhibition of p53 expression modifies the specificity of chromatin binding by the androgen receptor. *Oncotarget* 2012;3(2):183-194.
 17. Leite KR, Franco MF, Srougi M, Nesrallah LJ, Nesrallah A, Bevilacqua RG, Darini E, Carvalho CM, Meirelles MI, Santana I, Camara-Lopes LH. Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14(5):428-436.
 18. Guseva NV, Rokhlin OW, Glover RA, Cohen MB. P53 and the proteasome regulate androgen receptor activity. *Cancer Biol Ther* 2012;13(7):553-558.
 19. Cronauer MV, Schulz WA, Burchardt T, Ackermann R, Burchardt M. Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines. *Oncogene* 2004;23(20):3541-3549.
 20. Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, Ghafar M, Chen MW, Anastasiadis A, de la Taille A, Kiss A, Buttyan R. Reduction of wild type p53 function confers a hormone resistant phenotype on LNCaP prostate cancer cells. *Prostate* 2001;48(4):225-230.
 21. Alimirah F, Panchanathan R, Chen J, Zhang X, Ho SM, Choubey D. Expression of androgen receptor is negatively regulated by p53. *Neoplasia* 2007;9(12):1152-1159.
 22. Lin HK, Wang L, Hu YC, Altuwaijri S, Chang C. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J* 2002;21(15):4037-4048.

MATERIAIS SUPLEMENTARES

Figura 1.

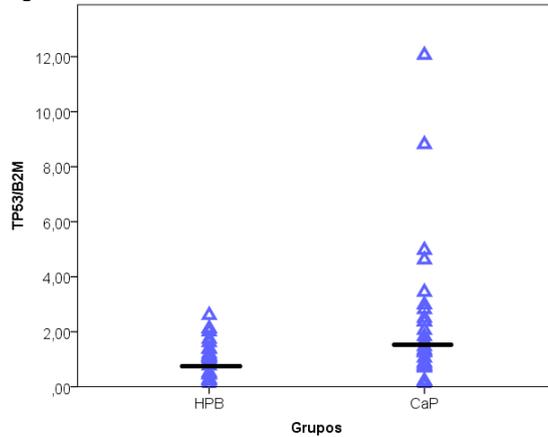


Figura 2.

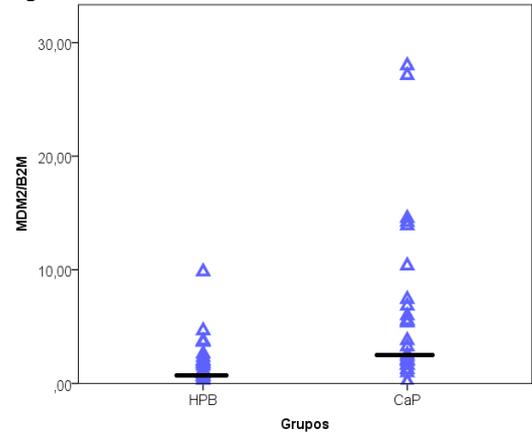


Figura 3.

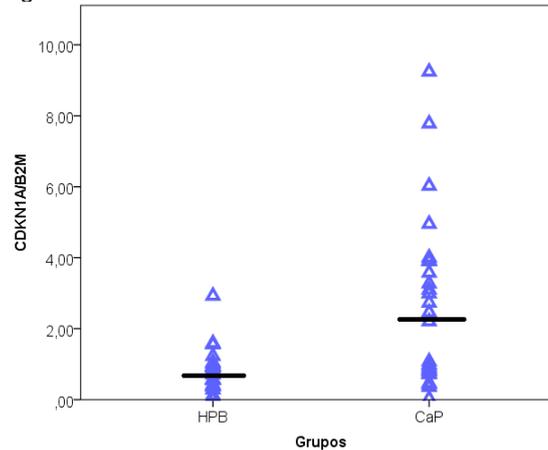


Figura 1. Expressão Gênica do TP53 em tecido prostático de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Cada ponto representa um paciente. As barras indicam a mediana da expressão gênica (HPB = 0,9967; CaP = 1,5580) $P = 0,012$

Figura 2. Expressão Gênica do MDM2 em tecido prostático de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Cada ponto representa um paciente. As barras indicam a mediana da expressão gênica (HPB = 1,1464; CaP = 3,5086) $P = 0,001$

Figura 3. Expressão Gênica do CDKN1A em tecido prostático de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Cada ponto representa um paciente. As barras indicam a mediana da expressão gênica (HPB = 0,6452; CaP = 2,3317) $P = 0,001$

3. Conclusões e Perspectivas:

Nesse trabalho conseguimos verificar que os genes TP53, MDM2 e CDKN1A estão mais expressos no CaP, resultado que permite um melhor entendimento desta doença. Além disso, a presença de correlação entre os níveis de mRNA de TP53, MDM2 e CDKN1A e das AR-V em CaP destacam o importante papel destas isoformas no desenvolvimento e recidiva do CaP.

Como perspectivas do trabalho, serão realizadas análises para verificar a expressão proteica de p53, Mdm2 e p21 pelo ensaio de ELISA. Por esta mesma técnica, serão realizadas dosagens intrateciduals de testosterona e diidrotestosterona. A expressão proteica da isoforma AR3 será avaliada por imunocitoquímica.

4. Bibliografia:

- ACS. (2014). "American Cancer Society: What are the key statistics about prostate cancer?" Retrieved 18/05/14 2014.
- Ahmed, A., S. Ali, et al. (2014). "Advances in androgen receptor targeted therapy for prostate cancer." *J Cell Physiol* **229**(3): 271-276.
- Burchardt, M., T. Burchardt, et al. (2001). "Reduction of wild type p53 function confers a hormone resistant phenotype on LNCaP prostate cancer cells." *Prostate* **48**(4): 225-230.
- Carson, C., 3rd and R. Rittmaster (2003). "The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia." *Urology* **61**(4 Suppl 1): 2-7.
- Ceccarelli, C., D. Santini, et al. (2001). "Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators." *Int J Cancer* **95**(2): 128-134.
- Chene, P. (2003). "Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **3**(2): 102-109.
- Cmielova, J. and M. Rezacova (2011). "p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]." *J Cell Biochem* **112**(12): 3502-3506.
- Cronauer, M. V., W. A. Schulz, et al. (2004). "Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines." *Oncogene* **23**(20): 3541-3549.
- De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2007). "Inflammation in prostate carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* **7**(4): 256-269.
- Dean, J. L. and K. E. Knudsen (2013). "The role of tumor suppressor dysregulation in prostate cancer progression." *Curr Drug Targets* **14**(4): 460-471.
- Downing, S. R., P. J. Russell, et al. (2003). "Alterations of p53 are common in early stage prostate cancer." *Can J Urol* **10**(4): 1924-1933.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death."
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Farrell, J., G. Petrovics, et al. (2013). "Genetic and Molecular Differences in Prostate Carcinogenesis between African American and Caucasian American Men." *Int J Mol Sci* **14**(8): 15510-15531.
- Garraway, W. M., G. N. Collins, et al. (1991). "High prevalence of benign prostatic hypertrophy in the community." *Lancet* **338**(8765): 469-471.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." *Mol Cancer Ther* **1**(8): 639-649.
- Gobinet, J., N. Poujol, et al. (2002). "Molecular action of androgens." *Mol Cell Endocrinol* **198**(1-2): 15-24.
- Golubovskaya, V. M. and W. G. Cance (2013). "Targeting the p53 pathway." *Surg Oncol Clin N Am* **22**(4): 747-764.
- Guo, Z. and Y. Qiu (2011). "A new trick of an old molecule: androgen receptor splice variants taking the stage?!" *Int J Biol Sci* **7**(6): 815-822.
- Guo, Z., X. Yang, et al. (2009). "A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth." *Cancer Res* **69**(6): 2305-2313.
- Haile, S. and M. D. Sadar (2011). "Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer." *Cell Mol Life Sci* **68**(24): 3971-3981.
- Hu, R., T. A. Dunn, et al. (2009). "Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer." *Cancer Res* **69**(1): 16-22.

- Ilic, D. and M. Misso (2012). "Lycopene for the prevention and treatment of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: a systematic review." *Maturitas* **72**(4): 269-276.
- INCA. (2014). "INCA: Incidência de Câncer de Próstata." Retrieved 25/04, 2014.
- Kai H. Hammerich, G. E. A., and Thomas M. Wheeler (2009). "Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer." *Cambridge University Press*.
- Kirby, R. S. (2000). "The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade?" *Urology* **56**(5 Suppl 1): 3-6.
- Liu, C., Y. Zhu, et al. (2013). "Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells." *Prostate* **73**(4): 418-427.
- Lu, S., M. Liu, et al. (1999). "Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter." *Mol Endocrinol* **13**(3): 376-384.
- Martinez, L. A., J. Yang, et al. (2002). "p21 modulates threshold of apoptosis induced by DNA-damage and growth factor withdrawal in prostate cancer cells." *Carcinogenesis* **23**(8): 1289-1296.
- McDougal, W. S., A. J. Wein, et al. (2011). *Campbell-Walsh Urology*.
- Momand, J. and G. P. Zambetti (1997). "Mdm-2: "big brother" of p53." *J Cell Biochem* **64**(3): 343-352.
- NCI. (2014). "National Cancer Institute:Prostate-Specific Antigen (PSA) Test." Retrieved 18/05/14 2014.
- Norbury, C. J. and I. D. Hickson (2001). "Cellular responses to DNA damage." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 367-401.
- Ntais, C., A. Polycarpou, et al. (2003). "Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes." *Eur J Endocrinol* **149**(6): 469-477.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 897-907.
- Schalken, J. A. and G. van Leenders (2003). "Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology." *Urology* **62**(5 Suppl 1): 11-20.
- Slee, E. A., C. Adrain, et al. (2001). "Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis." *J Biol Chem* **276**(10): 7320-7326.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, et al. (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." *Cell Prolif* **36**(3): 131-149.

5. Anexos

5.1 Orientações da revista *The Prostate*

Author Guidelines

All editorial correspondence should be sent to: Heather Wallace, Assistant Managing Editor, *The Prostate* Editorial Office, John Wiley & Sons, Inc., E-mail: TheProstate@wiley.com. **The Journal requires that authors submit electronically via the online submission site at [ScholarOne Manuscripts](#) (formerly known as Manuscript Central).**

Title page. This should contain the complete title of the paper: the names, titles, and affiliations of all authors; the institution at which the work was performed (specific to the department level); the name, address, telephone and fax numbers, and E-mail address for all correspondence; and a shortened title, not more than 40 characters, to be used as a running head. Each manuscript should have no more than nine authors. If a manuscript was worked on by a group, one or more authors may be named from this group. The other members of the group are not considered authors, but may be listed in an acknowledgment. Contract grant acknowledgment, giving the name of the contract grant sponsor and the contract grant number must be supplied, if applicable, as the last item of the title page. Other acknowledgments must be supplied at the end of the manuscript.

Disclosure Statement. All authors must disclose any affiliations that they consider to be relevant and important with any organization that to any author's knowledge has a direct interest, particularly a financial interest, in the subject matter discussed. Such affiliations include, but are not limited to, employment by an industrial concern, ownership of stock, membership on a standing advisory council or committee, a seat on the board of directors, or being publicly associated with a company or its products. Other areas of real or perceived conflict of interest would include receiving honoraria or consulting fees or receiving grants or funds from such corporations or individuals representing such corporations. This requirement will apply to every sort of article submitted to the Journal, including original research, reviews, editorials, letters to the editor, and any others, and should be disclosed at the time of submission. The simplest remedy for conflict of interest is disclosure. In the Journal, disclosure will henceforth be achieved by the inclusion of a short footnote with each published article. This information will be held in

confidence while the paper is under review. It will not be shared with peer reviewers, and it will not influence the editorial decision to accept or reject the manuscript. When an article is accepted for publication, the editors will usually discuss with the authors the manner in which such information is to be presented.

Abstract. This should be a factual condensation of the entire work structured into four paragraphs titled, **Background**, **Methods**, **Results**, and **Conclusions**. The abstract should not exceed 350 words.

Key words. Supply a list of 3 to 6 key words or phrases (not in title) that will adequately index the subject matter of the article.

Text. The text should follow the format: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusions. Use subheadings and paragraph titles whenever possible. Place Acknowledgments as the last element of the text, before the references. Text length should be within 25 double-spaced pages. Length limits include title page, abstract, body, references, and figure legends. Authors whose first language is not English should arrange for their manuscripts to be written in idiomatic English prior to submission. Please use American Style. If photographs of human subjects are used, a copy of the signed consent form must accompany the manuscript. Letters of permission must be submitted with any material that has previously been published.

Supporting Information: Supporting information will be published as submitted and will not be corrected or checked for scientific content, typographical errors or functionality. The responsibility for scientific accuracy and file functionality remains entirely with the authors. A disclaimer will be displayed to this effect with any supporting information published. Supporting information should always be provided in its final format, as it will not be copyedited or changed from its original format. It will not be available for review prior to publication. Supporting tables or figures may be made cited within the text and will be made available to readers at an online link; those additional files should be classified as supplemental files for review when the paper is submitted online.

References.

In the text, cite references as numerals in brackets. The final list should be in numerical order, by the order they appear in the text, and include full article titles, names of all authors (not et al.), and inclusive page numbers. Abbreviate journal names according to Index Medicus style. Note the following examples:

Journal articles:

Neri R. Pharmacology and pharmacokinetics of flutamide. *Urology* 1989;34:19-21.

Books:

2. Goldstein SR. Endovaginal ultrasound, 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1991. 1223 p.

Articles in books:

3. de Voogt HJ. Biology in the prostate. In: Smith PH, Pavone-Macaluso M, editors. *Urological oncology: reconstructive surgery, organ conservation, and restoration of function*. New York: Wiley-Liss; 1991. p 207-212.

Legends. A descriptive legend must accompany each illustration and must define all abbreviations used therein.

Tables. Each table must have a title. Tables should be numbered in order of appearance with Roman numerals and be referred to by number in the text.

Illustrations. Use illustrations sparingly. They should be numbered in one consecutive series using arabic numerals and be cited in order in the text. Four-color illustrations will be considered for publication. However, the author will be required to bear the cost of their publication. The charge for one page of color is \$950. Second, and subsequent pages, up to four, will cost \$500 each.

Rapid Communications

The Editorial Board will consider Rapid Communications upon completion of review. This will be published at no cost to the author. This report should contain the equivalent of six double-spaced typed pages (including any figures, tables, or references) with generous margins.

Note to NIH Grantees. Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Guidelines for Electronic Submission**File Requirements:**

Text. Must be submitted in Word (DOC or RTF). Do not embed tables or figures. Please include the title page, synopsis, abstract,

main body, references, acknowledgements, and figure legends in a single file. Length should be within 25 double-spaced pages.

Tables. Must be created using the Table tool in Word (DOC or RTF). Each table must be in a separate file, and the files should be named by table # (i.e., table 1, table 2, etc.).

Figures. Each file must contain a single figure and be named by figure # (i.e., figure 1, figure 2, etc.). Files containing individual panels will not be accepted. Figures must be in TIFF or EPS. Resolution 1200 dpi for line art (simple bar graphs, charts, or non-photographic artwork) 600 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines) 300 dpi for halftones (black and white photographs) and color figures.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

CONFLICT OF INTEREST

Please disclose all financial arrangements within the past two years, including consultancies, stock ownership, equity interest, patent-licensing agreements, research support, major honoraria, etc. you have with a company whose product figures prominently in the manuscript you are submitting, sending a letter to the editor, or providing an editorial. Please provide the same information for similar relationships with a company making a competing product to that which is featured in the manuscript. If the Editor finds that such activities raise the appearance of a conflict, he may recommend disclosure in a footnote. Otherwise, the information will remain confidential.

For additional details on manuscript and illustrations, please visit <http://journalauthors.wiley.com>

5.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata.

Prezado

Senhor

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna (aumento da próstata) e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar à formação desses tumores.

Como o senhor tem o diagnóstico de _____ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendada cirurgia para a retirada da glândula, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em uma coleta de amostra de sangue e a permitir que após retirada da peça cirúrgica três pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético (análise da expressão de genes). O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia, e este procedimento não apresenta nenhum risco para sua saúde.

Quanto à coleta sanguínea, o Sr. será submetido à coleta de 10 mL de sangue venoso, hoje, após lhe explicarmos este termo de compromisso e o senhor assiná-lo ou então no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais. Os riscos envolvidos com essa coleta são os riscos inerentes ao procedimento, sendo a ocorrência de pequenos hematomas (manchas roxas) a alteração mais comum.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras de sangue e de tecido para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação de características genéticas específicas 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. Não haverá nenhuma despesa para sua participação neste projeto. O senhor receberá uma via deste termo de consentimento, sendo que a qualquer momento o seu consentimento em participar deste estudo poderá ser retirado. 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 ou 99969044), Prof. Dr. Milton Berger (51 33598286), Prof. Dr. Brasil Silva Neto (51 99922398) e a pós-graduanda Ana Caroline Hillebrand (51 33083559 ou 81531606). 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 (51 33598304).

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi uma via deste termo de consentimento e também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____

**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE- CENTRO DE PESQUISA
EXPERIMENTAL
LAGOM (LABORATÓRIO 12106) - RUA RAMIRO BARCELOS, 2350 - BAIRRO
RIO BRANCO - FONE: 51 33597625- PORTO ALEGRE
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR ENDÓCRINA E TUMORAL
(LABORATÓRIO 09) - RUA SARMENTO LEITE, 500 - CENTRO - FONE: 51
33083559 - PORTO ALEGRE**

5.3 Carta de Aprovação do Comitê de Ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 120320

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

ILMA SIMONI BRUM DA SILVA

MILTON BERGER

VANDERLEI BIOLCHI

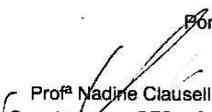
ANA CAROLINE HILLEBRAND

Título: Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata e a sua possível associação com a agressividade do tumor.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 23 de novembro de 2012.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora CEP/HCPA