

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

MARIA EDUARDA AZAMBUJA AMARAL

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *BAX* e *BCL2* E SUA POSSÍVEL CORRELAÇÃO
COM A EXPRESSÃO GÊNICA DAS ISOFORMAS DO RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS**

Porto Alegre

JUNHO/2014

MARIA EDUARDA AZAMBUJA AMARAL

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *BAX* e *BCL2* E SUA POSSÍVEL CORRELAÇÃO
COM A EXPRESSÃO GÊNICA DAS ISOFORMAS DO RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS**

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: Patrícia Borba Martiny

Porto Alegre

JUNHO/2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e por possibilitar a realização do estudo.

À Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum da Silva, pela confiança e atenção, pelo exemplo profissional e pessoal passado todos os dias dentro do laboratório. Obrigado pela chance e pelo incrível conhecimento compartilhado.

À Patrícia Borba Martiny, pelo companheirismo, pelos abraços, pela confiança, pelo estímulo, pela amizade e principalmente pelos puxões de orelha e por me instigar a pensar e a formar uma opinião científica própria e crítica. Obrigado por tudo!

À Caroline Hillebrand, pela ajuda nos mínimos detalhes do trabalho desenvolvido, pela paciência nos momentos de desespero, pela amizade, pelo carinho e dedicação.

À Caetana Ledur, pelo companheirismo incansável durante essa jornada, pela cumplicidade, pelo auxílio e principalmente pela amizade criada. Conseguimos!

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, principalmente à Amanda Machado e à Lolita Schneider, pelas dicas e pelas discussões científicas. Obrigado!

À minha família, pela confiança e pela base sólida proporcionada, principalmente aos meus pais Renato e Suzana, meus maiores exemplos e professores da vida.

Muito Obrigado!

À minha irmã e melhor amiga Marina, com quem aprendo muito, pelos estímulos e apoio, pela paciência, pelos conselhos, pela preocupação, pela atenção e pelo companheirismo sincero. Muito obrigado por tornar tudo isso mais fácil. Te amo!

Aos amigos que ganhei durante a graduação, Giana, Luaninha, Dick, Déia, Pati, Léo e Eduardo, obrigado por tornar o dia-a-dia muito mais feliz, alegre e saudável.

Obrigado pelo companheirismo, pela amizade, por sempre me entender e principalmente por ter criado uma amizade para a vida inteira. Vocês são demais!

Aos meus amigos pela amizade verdadeira, pelo companheirismo, por entender minha ausência e me estimular. Obrigado, vocês são essenciais!

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO.....	7
INTRODUÇÃO GERAL.....	8
Próstata.....	8
Hiperplasia prostática benigna (HB).....	9
Câncer de Próstata (CaP).....	10
Receptor de androgênios e suas isoformas.....	11
O ciclo celular.....	15
Apoptose.....	16
Genes <i>BAX</i> e <i>BCL2</i>	20
TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	22
PERIÓDICO: The Prostate.....	22
TÍTULO: Análise da expressão gênica de <i>BAX</i> e <i>BCL2</i> em Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna.....	22
TÍTULO REDUZIDO: Análise de <i>BAX</i> e <i>BCL2</i> em Tumores Prostáticos.....	22
NORMAS DA REVISTA: Anexo I.....	22
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	47
BIBLIOGRAFIA GERAL.....	48
ANEXOS.....	54
Anexo I.....	54
Anexo II.....	58
Anexo III.....	61

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
cDNA	DNA complementar
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclina
CPRC	Câncer de Próstata Resistente à Castração
DBD	Domínio Central de Ligação ao DNA
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
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
mRNA	RNA mensageiro
PSA	Antígeno Prostático Específico
RT - qPCR	<i>PCR Real Time</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema para demonstrar as zonas de transição (azul), central (amarela) e periférica (rosa) da próstata humana. O corte 1 foi realizado na base da próstata, o 2 na região intermediária e o 3 no ápice prostático. Adaptado de (Bonekamp, Jacobs et al. 2011)	8
Figura 2: Esquema das modificações conformacionais originadas pela ativação do AR. T: testosterona, DHT: dihidrotestosterona, AR: receptor de androgênio, HSP: proteína de choque térmico. Adaptado de (Lonergan and Tindall 2011)	12
Figura 3: Estrutura esquemática das variantes do AR resultantes de <i>splicing</i> alternativo disponíveis no UniGene. A variante 1 representa a forma <i>full-length</i> do AR. Adaptado de (Guo and Qiu 2011).....	14
Figura 4: Esquema demonstrando o ciclo celular com suas etapas e os pontos de checagem. Adaptado de (O'Connor 2010).....	16
Figura 5: Via intrínseca de ativação da apoptose e possível regulação por BAX e BCL2 (Rocha 2007)	19
Figura 6: Possível desbalanço entre as proteínas da família BCL-2 relacionadas com o desenvolvimento oncogênico. (Adaptado de: (Wong 2011))......	19
Figura 7: Possíveis mecanismos de resistências à ablação androgênica em células prostáticas neoplásicas. Uma das características citadas é a superexpressão de <i>BCL2</i> . (Adaptado de (Schulman, Irani et al. 2010)	21

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo mais prevalente de câncer entre a população masculina e está entre os 3 tipos mais comuns de câncer diagnosticados entre homens de 184 países. A hiperplasia prostática benigna (HPB) acomete aproximadamente 80% dos homens com mais de 60 anos e se deve a um crescimento não maligno da próstata. Ambas patologias são dependentes da ativação do receptor de androgênios para o crescimento e a sobrevivência celular. Em aproximadamente 95% dos casos de CaP, mesmo após a terapia de privação de androgênios, as células desenvolvem um mecanismo de proliferação independente da ação hormonal, conhecida como recidiva tumoral. Com isto, muitos estudos tentam analisar como ocorre a ativação do receptor de androgênios de maneira independente da presença dos androgênios. Recentemente, foram identificadas variantes estruturais do receptor de androgênio (AR), conhecidas como isoformas. Entretanto, ainda há muita discussão acerca da variação da expressão e da função dessas isoformas tanto em tecido prostático normal, quanto em células prostáticas com alterações fisiopatológicas, como no CaP e na HPB. Dois genes frequentemente estudados em anomalias neoplásicas são o gene *BAX* e o *BCL2*, que codificam proteínas que levam o mesmo nome. A *BCL2* é uma proteína antiapoptótica que tem sido descrita como superexpressa em tumores mais agressivos gerando resistência à morte celular e estando associada ao pior prognóstico. Desta forma, a análise da expressão gênica de *BAX* e *BCL2* e a sua correlação com a expressão das isoformas do AR é de extrema importância para entender a regulação da proliferação celular prostática. Neste estudo foi encontrada uma maior expressão tanto do *BAX* (**P* < 0,001), quanto do *BCL2* (**P* = 0,029) em amostras de CaP quando comparadas à HPB. Além disso, houve uma correlação positiva no grupo CaP entre a expressão de *BCL2* e do AR (**P* = 0,020) e também entre o *BCL2* e o AR3 (**P* = 0,024). A identificação da expressão de genes reguladores da apoptose é de extrema importância para o estudo e o entendimento da proliferação celular tumoral descontrolada. A análise do AR, das AR-Vs e das suas correlações com os genes pró e antiapoptóticos têm sido um caminho promissor para a elucidação de mecanismos relacionados com o desenvolvimento de anomalias prostáticas.

INTRODUÇÃO GERAL

Próstata

A próstata é uma importante glândula do sistema reprodutor masculino que se localiza inferiormente à bexiga e anteriormente ao reto. Essa glândula é composta por três zonas distintas: zona periférica, de transição e central. Algumas doenças como carcinomas e prostatite crônica são mais frequentes na zona periférica, enquanto que a hiperplasia prostática benigna (HPB) é prevalente na zona de transição. A zona central caracteriza-se pela forma cônica, onde o ápice do cone está anatomicamente relacionado com os ductos ejaculatórios e com a porção prostática da uretra (Figura 1) (Velentzas, Nezis et al. 2007; Kai H. Hammerich 2009; Bonekamp, Jacobs et al. 2011). A glândula prostática contribui também para a composição do fluido seminal, sendo importante para a manutenção das condições ideais para fertilização (Shrivastava and Gupta 2012).

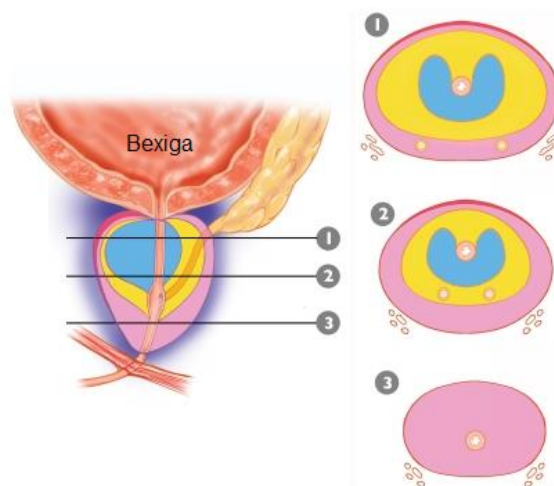


Figura 1: Esquema para demonstrar as zonas de transição (azul), central (amarela) e periférica (rosa) da próstata humana. O corte 1 foi realizado na base da próstata, o 2 na região intermediária e o 3 no ápice prostático. Adaptado de (Bonekamp, Jacobs et al. 2011)

O desenvolvimento e a função prostática são extremamente dependentes de androgênios (Welen and Damber 2011). A di-hidrotestosterona (DHT), um importante androgênio originado da conversão da testosterona pela enzima 5 α -redutase, possui

um papel importante na manutenção do balanço entre a taxa de proliferação e de morte celular na próstata normal (Carson and Rittmaster 2003).

A próstata possui dois compartimentos, o epitelial e o estromal. No epitelial existem dois tipos celulares: as células basais e as luminais. Estas células podem ser diferenciadas tanto pela morfologia quanto pelas propriedades biológicas. As luminais, também chamadas de secretoras, possuem uma baixa capacidade de proliferação e uma alta taxa apoptótica, além de serem dependentes de androgênios para realizar a divisão e manter a viabilidade celular. Como função principal, possuem a liberação do líquido prostático que contém o antígeno prostático específico (PSA) e é secretado em ductos e túbulos epiteliais que acabam na uretra prostática (Isaacs 1999; Velentzas, Nezis et al. 2007). As células basais, por sua vez, caracterizam-se pela independência de androgênios para realizar a divisão celular, além de possuir uma alta taxa de proliferação e um baixo índice apoptótico, conferindo, assim, características de células-tronco a esse tipo celular.

O compartimento estromal é composto por diversos tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais, nervosas, musculares lisas e inflamatórias. As células do estroma expressam o receptor de androgênios (AR) e possuem a capacidade de produzir um grande número de fatores de crescimento, que influenciam no desenvolvimento e na diferenciação prostática (Isaacs 1999; Schalken and van Leenders 2003). A importância da interação entre os compartimentos é demonstrada pelo fato de que o AR não é detectado no epitélio prostático durante o desenvolvimento fetal, enquanto que no compartimento estromal ele está expresso. Em homens adultos e jovens o AR está presente em ambos os compartimentos celulares. A resposta alterada e descontrolada aos androgênios está relacionada com o desenvolvimento das duas principais patologias prostáticas: HPB e Câncer de Próstata (CaP) (Welen and Damber 2011).

Hiperplasia prostática benigna (HPB)

A HPB é uma condição histológica que acomete a glândula prostática e deve-se a um crescimento patológico não maligno da próstata, sendo resultado da proliferação

de células epiteliais e estromais. Apesar de ser uma doença muitas vezes assintomática, o crescimento prostático pode causar a compressão da uretra, sendo assim associado aos sintomas do trato urinário inferior (LUTS), o que resulta na diminuição na qualidade de vida dos pacientes (Cory and Adams 2002; McConnell, Roehrborn et al. 2003; Rocha 2007). Entre os sintomas do LUTS estão fluxo urinário reduzido, esforço para iniciar a micção, noctúria e sensação de esvaziamento incompleto da bexiga após a micção (O'Leary, Wei et al. 2008).

A etiologia exata da HPB não é bem conhecida, entretanto análises anatômicas e histológicas de tecidos hiperplásicos sugerem que o crescimento inicia na zona de transição, resultando na formação de nódulos (McVary 2006). Acredita-se que o surgimento destes nódulos hiperplásicos esteja relacionado com algum tipo de interação epitelial-estromal (Cunha 2008) ou com o desbalanço dos níveis e da função dos androgênios ou fatores de crescimento mediados pela DHT (Carson and Rittmaster 2003). O fato de os pacientes portadores dessa condição serem tratados eficientemente com medicamentos antagonistas de androgênio corrobora com a hipótese de que o desenvolvimento exacerbado da glândula seja dependente desses hormônios (Ho and Habib 2011).

O diagnóstico da HPB também é obtido pela dosagem do PSA, onde indivíduos com aumento da glândula prostática demonstram níveis séricos elevados e isso se deve à acentuada proliferação das células epiteliais. Já foi demonstrado que a utilização de inibidores de 5 α -redutase em pacientes com HPB levou a uma diminuição no volume prostático, nos níveis séricos de PSA e nos sintomas de LUTS (Cory and Adams 2002). Embora existam tratamentos para tal patologia, o número de casos ainda é bastante elevado e o entendimento da dos aspectos moleculares da HPB é necessário para uma maior compreensão do desenvolvimento da doença.

Câncer de Próstata (CaP)

O CaP é o segundo tipo mais prevalente de neoplasia entre a população masculina (Center, Jemal et al. 2012) e está entre os 3 cânceres mais comuns diagnosticados ente os homens de 184 países (Grossmann, Cheung et al. 2013).

Segundo o INCA, as estimativas de casos novos de câncer na população brasileira para o ano de 2014 colocam o CaP na primeira posição em todas as regiões do país, sem considerar os tumores de pele do tipo não-melanoma (INCA 2013). A incidência dessa patologia varia muito entre as populações e está bastante associada à idade, ao estilo de vida e à herança genética (Hemminki and Czene 2002; Kheterpal, Sammon et al. 2013).

Essa situação patológica, assim como a HPB, é intimamente dependente da ativação do receptor de androgênios para o crescimento e a sobrevivência celular. Entretanto, ainda há dúvidas se os androgênios são os responsáveis pelo desencadeamento dessa doença. Em aproximadamente 95% dos casos, mesmo após a terapia de privação androgênica, as células desenvolvem um mecanismo de proliferação independente da ação destes hormônios. Essa retomada da proliferação é conhecida como recidiva tumoral e caracteriza a doença como câncer de próstata resistente à castração (CPRC) (Guo and Qiu 2011; Grossmann, Cheung et al. 2013). Acredita-se que para ocorrer recidiva seja necessário que a sinalização do AR se mantenha ativada na célula, estimulando a proliferação celular mesmo na ausência de androgênios (Marcelli and Cunningham 1999; Chen, Welsbie et al. 2004; Grossmann, Cheung et al. 2013). Além disso, dados demonstram um aumento da expressão do AR em pacientes com CPRC e esse fato pode ser consequência da amplificação do gene que codifica o AR (Culig and Santer 2014). Sendo assim, é necessário analisar como ocorre a ativação do receptor de modo independente da presença dos androgênios.

Por fim, o câncer de próstata também pode estar relacionado com níveis elevados de PSA nos sangue. Acredita-se que esse aumento de PSA sérico ocorra pelo aumento da massa celular epitelial e pela destruição do tecido prostático, resultando em um extravasamento de PSA para a circulação sistêmica. (Jacobsen, Girman et al. 2001; Culig and Santer 2014)

Receptor de androgênios e suas isoformas

O AR regula uma grande quantidade de processos celulares, como proliferação, apoptose, migração, invasão e diferenciação. Esses efeitos androgênicos podem ser

desencadeados tanto pela testosterona quanto pela DHT, embora a DHT possua maior afinidade de ligação ao receptor quando comparada à sua precursora testosterona. O AR é um receptor nuclear que, quando na ausência de ligante, se encontra no citoplasma associado a proteínas de choque térmico, chaperonas e proteínas do citoesqueleto. A ligação do hormônio ao receptor leva à dissociação destas proteínas e à formação do complexo hormônio-receptor. Após, ocorre a dimerização desse complexo hormônio receptor, sua translocação para o núcleo e a ligação a elementos responsivos a androgênios (ARE, do inglês *Androgen Responsive Elements*), que estão localizados em regiões promotoras de genes alvo (Figura 2) (Taichman, Loberg et al. 2007; Lonergan and Tindall 2011; Culig and Santer 2014).

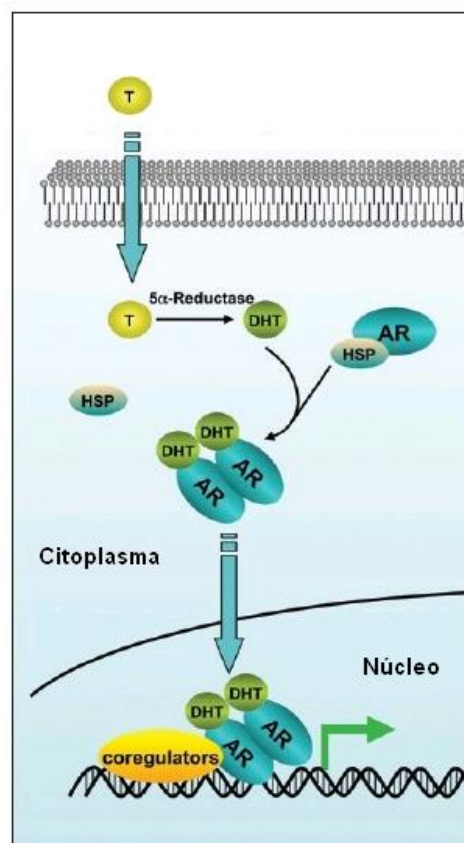


Figura 2: Esquema das modificações conformacionais originadas pela ativação do AR.

T: testosterona, DHT: dihidrotestosterona, AR: receptor de androgênio, HSP: proteína de choque térmico. Adaptado de (Lonergan and Tindall 2011)

Evidências demonstram que o crescimento prostático é dependente da ativação do AR e que sua presença é um componente indispensável da fisiopatologia do CaP e da HPB, a depleção androgênica tem sido um tratamento de escolha para pacientes com ambas neoplasias (Parsons, Carter et al. 2006; Taichman, Loberg et al. 2007; Ho and Habib 2011). Entretanto, muitos pacientes desenvolvem CPRC e essa recidiva muitas vezes é bastante agressiva, são necessários mais estudos acerca do tratamento adequado para estas patologias prostáticas.

O gene humano que codifica o AR caracteriza-se por possuir 8 éxons, que codificam importantes regiões deste receptor: o domínio de ativação N-terminal (NTD) – codificado pelo éxon 1, o domínio central de ligação ao DNA (DBD) – codificado pelos éxons 2 e 3, o domínio *hinge* e o domínio de ligação C-terminal (LBD) – codificados pelos éxons 4 a 8 (Hu, Dunn et al. 2009; Watson, Chen et al. 2010). A região N-terminal é responsável por desencadear a sinalização do receptor. A ligação do hormônio ao AR é indispensável para a translocação do receptor para o núcleo, onde, através do domínio DBD, liga-se ao DNA nos elementos responsivos a androgênios modulando a expressão gênica (Guo, Yang et al. 2009; Hu, Dunn et al. 2009).

Alterações na formação do AR têm sido amplamente estudadas. Uma importante característica identificada recentemente é a ocorrência do evento de processamento do pré-mRNA denominado *splicing* alternativo, que resulta na formação de isoformas do AR (AR-Vs). Quando o processo de *splicing* ocorre na sua forma original (retirada de íntrons), a forma resultante do AR é conhecida como *full-length* (expressão esta que se refere ao fato desta forma do AR apresentar os 8 éxons característicos). A deleção da região LBD originada pelo *splicing* alterantivo resulta em formas constitutivamente ativas do AR, sendo dispensável a ligação do hormônio ao receptor para que a transdução de sinal intracelular seja realizada (Guo, Yang et al. 2009). Recentemente, foram identificadas várias diferentes isoformas de AR (Figura 3) resultantes de *splicing* alternativo, que possuem a região N-terminal intacta e a região C-terminal com variações estruturais (Nagabhushan, Miller et al. 1996; Watson, Chen et al. 2010; Guo and Qiu 2011).

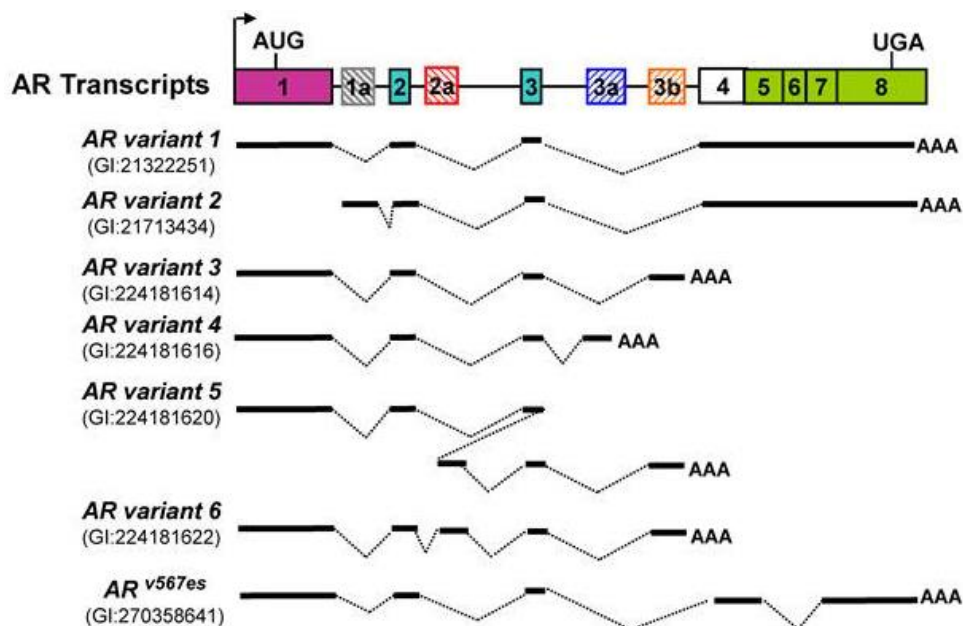


Figura 3: Estrutura esquemática das variantes do AR resultantes de *splicing* alternativo disponíveis no UniGene. A variante 1 representa a forma *full-length* do AR. Adaptado de (Guo and Qiu 2011)

A proteína do AR *full-length* possui aproximadamente 110kDa. Análises proteicas realizadas em células que expressam o AR utilizando anticorpos contra a região N-terminal demonstram a presença de moléculas com peso molecular reduzido em relação à forma *full-length* (Tepper, Boucher et al. 2002; Guo and Qiu 2011). Essas informações corroboram para a ideia da ocorrência de *splicing* alternativo e formação de proteínas alteradas. Algumas AR-Vs são frequentemente expressas em CPRC que já originaram metástases. Além disso, acredita-se que a presença das isoformas possa ser um dos mecanismos que estimula a resistência à terapia de ablação androgênica. Embora as isoformas sejam constitutivamente ativas, há evidências que demonstram que as AR-Vs possam ser dependentes da presença da forma *full-length* do receptor para exercer suas funções (Hu, Dunn et al. 2009; Li, Chan et al. 2013). Embora existam dados na literatura, a presença e a função dos AR-Vs ainda é bastante controversa, sendo necessárias análises adicionais para um melhor embasamento científico (Guo, Yang et al. 2009; Hu, Dunn et al. 2009; Watson, Chen et al. 2010). No intuito de compreender o mecanismo de ação destas AR-Vs, têm-se sugerido que estas variantes

estejam envolvidas com o controle do ciclo celular, que é regulado por diversos genes relacionados à apoptose e à proliferação celular, mecanismos estes que possuem também a influência da sinalização desencadeada pela ativação do AR (Balk and Knudsen 2008).

O ciclo celular

A função principal do ciclo celular é duplicar a carga cromossômica da célula de forma precisa, além de segregar com exatidão as cópias de DNA geradas para as células-filhas geneticamente idênticas. O ciclo celular é um ponto crucial entre a morte e a proliferação celular. As principais fases do ciclo celular são a fase S, onde ocorre a síntese e a duplicação do DNA e pode ocupar cerca da metade do tempo de todo o ciclo celular, e a fase M, onde há a separação dos cromossomos duplicados e a citocinese, ou seja, a divisão citoplasmática que resulta no surgimento de duas novas células geneticamente idênticas. Esses dois eventos chaves do ciclo são separados por fases de intervalo extra, que são necessárias para que haja uma duplicação da massa proteica e de organelas celulares, além de serem pontos críticos para a regulação do ciclo. Essas fases são conhecidas como G1 e G2. A G1 localiza-se entre o fim da mitose e o início da síntese cromossomal e, nessa etapa, a célula é preparada para a correta síntese de material genético, além de haver um crescimento global da célula. Na G2, por outro lado, a célula já cresceu o suficiente e se prepara para entrar em divisão (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003; Elmore 2007; Maddika, Ande et al. 2007; Alberts 2010). A fase S, juntamente com a G1 e a G2, é conhecida como interfase. Essas fases intermediárias (G1 e G2) são importantes para que a célula possa monitorar o ambiente interno e externo, a fim de avaliar e assegurar as condições necessárias para dar correta continuidade à divisão. Caso o ambiente seja desfavorável, a célula pode retardar a fase G1 e entrar em um estado de repouso conhecido como G0, o qual pode durar dias, meses e até anos (Alberts 2010).

Para evitar uma proliferação alterada e descontrolada, existe um mecanismo de controle do ciclo celular. Esse controle é rigidamente programado para que propicie uma correta divisão em dado tempo. Os pontos de checagem ocorrem entre a fase G1

e S, entre a G2 e a mitose e no meio da mitose (Figura 4). As proteínas reguladoras responsáveis por esse mecanismo são as CDKs (cinases dependentes de ciclina), pertencentes à família das serina/treonina proteínas cinases e que são ativadas por sinais específicos durante a progressão da divisão (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003; Elmore 2007; Maddika, Ande et al. 2007; Alberts 2010).

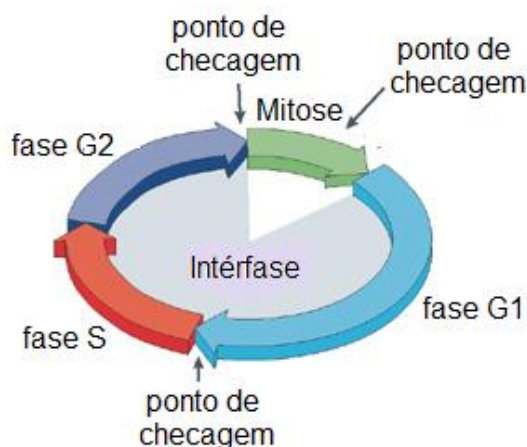


Figura 4: Esquema demonstrando o ciclo celular com suas etapas e os pontos de checagem. Adaptado de (O'Connor 2010)

Uma importante característica do mecanismo de controle é a sua possível adaptação e modificação, a fim de se adequar a tipos celulares específicos e a responder a sinais intra e extracelular diferenciados. Proteínas da família BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) podem ser classificadas como pró ou antiapoptóticas e aparecem de diferentes maneiras regulando o ciclo celular. Dois genes que codificam essas proteínas e que são bastante estudados pelas suas características pró e antiapoptóticas são, respectivamente, os genes *BAX* e o *BCL2* (Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003; Zinkel, Gross et al. 2006; Maddika, Ande et al. 2007; Chipuk, Moldoveanu et al. 2010).

Apoptose

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, abrange um grupo de características morfológicas e de mecanismos bioquímicos dependentes de energia. É um processo fisiológico natural responsável pela remoção de células e de

tecidos alterados e exerce um papel importante na manutenção homeostática, impedindo a proliferação de células injuriadas que podem comprometer o correto funcionamento do organismo. Muitas doenças, como o câncer e alterações neurológicas, são originadas a partir de mecanismos apoptóticos ineficazes. Algumas características celulares bem definidas da apoptose são a aparência nuclear picnótica (ou seja, o excesso de condensamento da cromatina), o encolhimento celular, a formação de bolhas na membrana plasmática seguida pela fragmentação citoplasmática e a separação da célula em pequenos fragmentos conhecidos como corpos apoptóticos ou apoptossomos (Elmore 2007; Wong 2011; Ouyang, Shi et al. 2012).

Alterações bioquímicas também ocorrem durante o evento apoptótico, como a ativação das caspases e a clivagem de DNA e de proteínas. As caspases são proteínas que possuem a capacidade de clivar resíduos de ácido aspártico gerando quebras em proteínas celulares vitais. Além disso, as caspases possuem a habilidade de ativar DNases resultando na fragmentação do DNA. Embora essas características estejam presentes na maioria dos eventos apoptóticos, é possível que existam apoptoses caspase-independentes e sem quebra de DNA (Wong 2011; Ouyang, Shi et al. 2012). Outra característica importante desse evento celular é a translocação do fosfolípido de membrana fosfatidilserina para a porção externa da membrana plasmática, o que possibilita o reconhecimento pelos macrófagos que atuam fagocitando esses restos celulares sem ativação de componentes pró-inflamatórios (Ouyang, Shi et al. 2012).

Já foram descritas diversas vias que desencadeiam a apoptose, entretanto aqui será citada apenas a via intrínseca por demonstrar relação com os genes analisados em questão (genes *BAX* e *BCL2*). A via intrínseca, como já diz o nome, é ativada dentro da célula, seja por mecanismos intra ou extracelulares. A depleção de fatores de crescimento, o estresse oxidativo, a hipóxia e as altas concentrações citoplasmáticas de cálcio são exemplos desses mecanismos. Após a célula receber o estímulo, os sinais desencadeados intracelularmente convergem para a mitocôndria e resultam no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial pela perda do seu potencial de membrana. Consequentemente, moléculas pró-apoptóticas – como o citocromo C -

que normalmente estão sequestradas no espaço transmembrana mitocondrial, são liberadas para o citoplasma. O citocromo C então estimula a ativação da caspase 9 – iniciadora - e a formação do apoptossomo (Elmore 2007; Rocha 2007; Wong 2011). A principal família de genes que controla os eventos de apoptose é a BCL-2, que possui aproximadamente 25 genes codificantes. Como exemplo de proteínas pró e antiapoptóticas provenientes dessa família temos, respectivamente, BAX e BCL2 (Cory and Adams 2002). Essas proteínas, juntamente com outras também pertencentes à mesma família, podem determinar se a célula responde ao estímulo de apoptose ou não. Acredita-se que o principal mecanismo pelo qual essas proteínas agem seja pela regulação da saída ou da manutenção do citocromo C na mitocôndria via alteração do potencial de membrana (Figura 5) (Elmore 2007; Rocha 2007). A proteína BAX normalmente aparece na forma de monômero no citoplasma. Após sofrer uma sequência de estímulos, essa proteína altera a sua conformação e se transloca para a membrana mitocondrial, gerando uma alteração na permeabilidade de membrana e a liberação do citocromo C. A proteína BCL2, por sua vez, possui a capacidade de se ligar à proteína BAX e formar um heterodímero, impedindo que a mesma se transloque para a membrana mitocondrial e desencadeie a via de apoptose. Além disso, já foi relatado que a relação entre BAX e BCL2 é extremamente importante para a evolução do evento apoptótico (Lin, Kokontis et al. 2006; Chipuk, Moldoveanu et al. 2010; Parrondo, de Las Pozas et al. 2013).

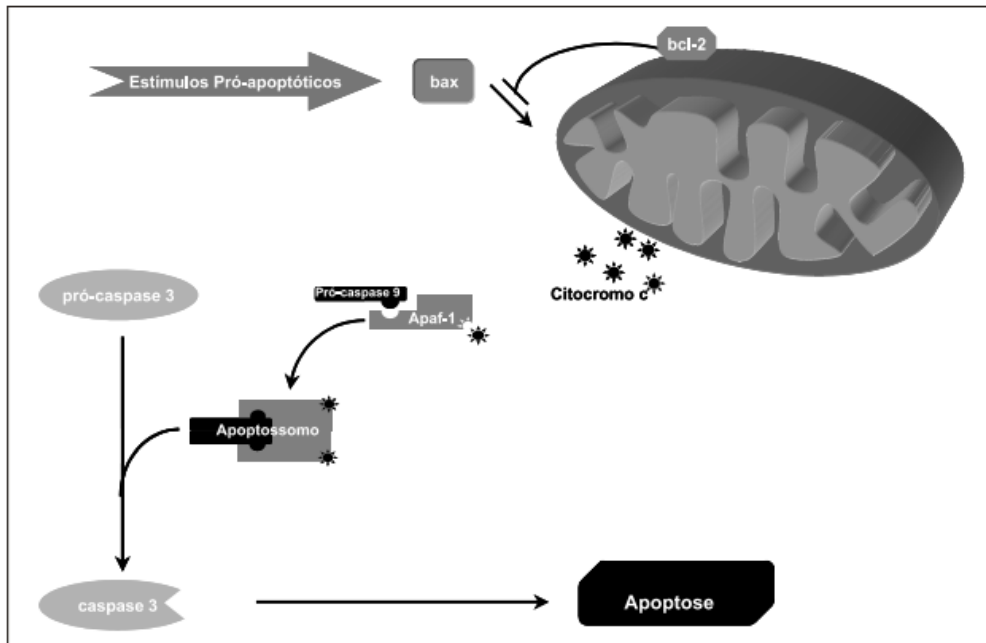


Figura 5: Via intrínseca de ativação da apoptose e possível regulação por BAX e BCL2 (Rocha 2007)

Entretanto, ainda são necessários estudos adicionais acerca da maneira como essas proteínas influenciam no evento de apoptose. Por fim, acredita-se que um dos mecanismos responsáveis pelo desencadeamento do câncer seja o desbalanço na taxa de proteínas pró-apoptóticas/antiapoptóticas, havendo uma superexpressão das segundas (Wong 2011) (Figura 6).

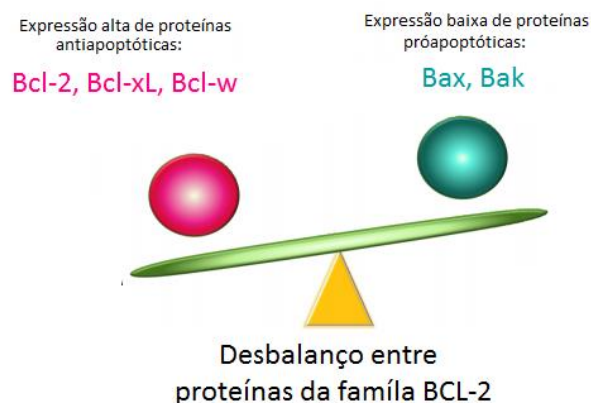


Figura 6: Possível desbalanço entre as proteínas da família BCL-2 relacionadas com o desenvolvimento oncogênico. (Adaptado de: (Wong 2011)).

Genes BAX e BCL2

Nos animais, a principal forma de morte celular durante a manutenção da homeostase é a apoptose. Esse tipo de morte programada é caracterizado pela ativação de proteínas caspases, as quais atuam através da fragmentação do DNA, de alterações nas membranas plasmáticas, da estimulação do encolhimento celular e da rápida degradação silenciosa da célula, sem que ocorram reações adversas devido ao extravasamento de conteúdo celular (Chipuk, Moldoveanu et al. 2010).

A família BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) compreende um conjunto de genes que codificam proteínas responsáveis pela manutenção do balanço entre os sinais de sobrevivência e de apoptose celular. Esse equilíbrio é dado pela união de proteínas pró e antiapoptóticas que, juntas, exercem certas funções como o controle da integridade da membrana mitocondrial e regulação da apoptose (Chipuk, Moldoveanu et al. 2010). O gene *BCL2* (Gene ID: 596) codifica uma proteína antiapoptótica encontrada no epitélio basal da próstata e acredita-se que sua superexpressão seja um dos mecanismos de resistência à ablação androgênica que o CPRC desenvolve para resistir à morte celular (Schulman, Irani et al. 2010) (Figura 7). Já foi descrito também que o *BCL2* superexpresso está relacionado com pior prognóstico da doença. Presume-se que esse grupo de moléculas iniba a apoptose pela ligação a proteínas pró-apoptóticas, como a BAX (*BCL2-associated X protein*, Gene ID: 581), também pertencente à família BCL-2 (Khor, Moughan et al. 2007; Chipuk, Moldoveanu et al. 2010).

A proteína BAX, por outro lado, caracteriza-se pela sua função biológica pró-apoptótica. Ela aparece primeiramente no epitélio secretório da próstata, o qual é mais susceptível a apoptose causada pela privação androgênica (Khor, Moughan et al. 2007). Acredita-se que essas proteínas agem através da sua dimerização e ligação à membrana mitocondrial, criando poros e alterando a permeabilidade da membrana, o que resulta na liberação do Citocromo C para o citosol e a na ativação da via apoptótica das caspases (ou via intrínseca da apoptose) (Chipuk, Moldoveanu et al. 2010; Parrondo, de Las Pozas et al. 2013).

Desta forma, a análise acerca da expressão dos genes que codificam essas proteínas é de extrema importância para entender a proliferação celular prostática.

Adicionando-se a isso, o estudo da correlação entre a expressão gênica das isoformas do AR e dos genes *BAX* e *BCL2*, é um importante alvo de estudo para auxiliar na compreensão da fisiopatologia do desenvolvimento dos tumores prostáticos (HPB e CaP). Dessa forma, os principais objetivos desse estudo são analisar a expressão gênica de *BAX* e *BCL2* em amostras de CaP e HPB e correlacionar os dados obtidos nessa análise com os níveis de expressão gênica das isoformas do AR (AR3, AR4, AR5 e AR6) em células de CaP e de HPB. É importante salientar que a expressão gênica das isoformas do AR foi realizada em um projeto paralelo.

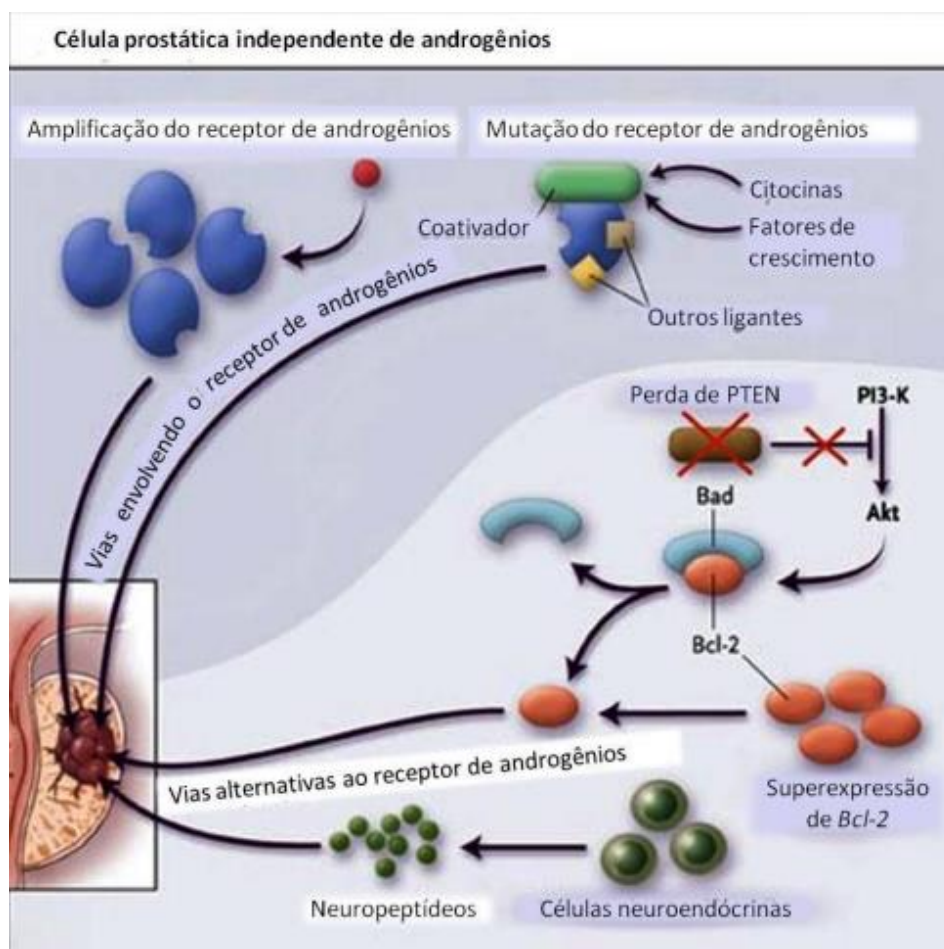


Figura 7: Possíveis mecanismos de resistências à ablação androgênica em células prostáticas neoplásicas. Uma das características citadas é a superexpressão de BCL2.

(Adaptado de (Schulman, Irani et al. 2010))

TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

PERIÓDICO: The Prostate

TÍTULO: Análise da expressão gênica de *BAX* e *BCL2* em Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna

TÍTULO REDUZIDO: Análise de *BAX* e *BCL2* em Tumores Prostáticos

NORMAS DA REVISTA: Anexo I

***Análise da expressão gênica de BAX e BCL2 em Câncer de
Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna***

Análise de BAX e BCL2 em Tumores Prostáticos

Maria Eduarda Azambuja Amaral^{1,2}; Ana Caroline Hillebrand, MSc^{1,2}; Patrícia Borba Martiny, MSc^{1,2}; Brasil Silva Neto, PhD³; 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: este trabalho foi financiado pelo FIPE-HCPA sob número 12-0320.

RESUMO:

INTRODUÇÃO: O objetivo do presente estudo é analisar e comparar a expressão dos genes *BAX* e *BCL2* em amostras de câncer de próstata (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB) e correlacionar a expressão desses genes com a expressão do receptor de androgênio (AR) e das isoformas do AR.

MÉTODOS: a análise da expressão gênica de *BAX* e *BCL2* foi realizada a partir de amostras de tecido prostático de pacientes que possuíam câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna utilizando a técnica de PCR quantitativo (RT-qPCR).

RESULTADOS: A expressão gênica de *BAX* foi de 0,86 (0,65 – 1,22) no grupo HPB e 2,17 (0,92 – 3,56) no grupo CaP (**P* < 0,001). O gene *BCL2* apresentou expressão de 0,82 (0,66 – 1,17) no grupo HPB e 1,25 (0,63 – 2,84) no grupo CaP (**P* = 0,029). A análise de correlação demonstrou uma correlação positiva no grupo CaP entre a expressão de *BCL2* com o AR (**P* = 0,020) e com a isoforma AR3 (**P* = 0,024). A expressão de *BAX* não apresentou correlação com o AR ou suas isoformas.

CONCLUSÃO: Ambos os genes *BAX* e *BCL2* foram significativamente mais expressos no grupo CaP em relação ao grupo HPB. A correlação entre o gene *BCL2* e os genes AR e AR3 sugere uma associação entre a via de sinalização androgênica e o processo antiapoptótico na regulação do processo de formação tumoral. A identificação da expressão de genes reguladores da apoptose é de extrema importância para o estudo e o entendimento da proliferação celular tumoral descontrolada. A análise do AR e das AR-Vs e das suas correlações com os genes pró e antiapoptóticos têm sido um caminho promissor para a elucidação de mecanismos relacionados com o desenvolvimento de anomalias prostáticas.

PALAVRAS-CHAVE: apoptose, tumores prostáticos, receptor de androgênio e isoformas do receptor de androgênios.

INTRODUÇÃO:

A próstata é uma importante glândula do sistema reprodutor masculino que contribui para a composição do fluido seminal (1). O desenvolvimento e a função prostática são extremamente dependentes de androgênios, como a testosterona e a di-hidrotestosterona (DHT) (2). A hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma condição patológica não maligna de etiologia e causa pouco conhecidas que acomete aproximadamente 80% dos homens maiores de 60 anos e 90% dos acima de 90 anos (2). Nessa patologia ocorre o crescimento exacerbado principalmente da zona de transição da próstata ocasionando a obstrução da uretra e resultando em sintomas que reduzem a qualidade de vida dos pacientes, como dificuldade de micção e propensão a desenvolver infecções urinárias. Portadores dessa patologia geralmente são tratados eficientemente com fármacos antagonistas de androgênios como, por exemplo, a Finasterida, a qual atua de forma competitiva inibindo a enzima 5 α -redutase responsável pela conversão da testosterona em DHT. Sendo assim, esse fato corrobora com a hipótese de que o desenvolvimento exacerbado da glândula prostática é dependente dos hormônios androgênios (3). O câncer de próstata (CaP) é segundo tipo mais prevalente de neoplasia entre a população masculina (4) e está entre os três cânceres mais diagnosticados entre os homens de 184 países (5). Essa situação patológica, assim como a HPB, é dependente da ativação do receptor de androgênios para o crescimento da glândula prostática. Com isto, a terapia de privação androgênica (ou castração) é amplamente utilizada como tratamento, contendo o crescimento celular. Em 95% dos casos, mesmo após a terapia, as células desenvolvem uma maneira de proliferar independentemente da presença de androgênios. Essa retomada de crescimento celular é conhecida

como recidiva tumoral e caracteriza o câncer como câncer de próstata resistente à castração (CPRC) (5-8).

O receptor de androgênios (AR) regula uma grande quantidade de processos fisiológicos, como proliferação, apoptose, migração, invasão e diferenciação. Alterações no processamento do mRNA do AR geradas por *splicing* alternativo resultam em isoformas deste receptor, identificadas como AR-Vs. As AR-Vs possuem a região N-terminal intacta enquanto que a região C-terminal, que é responsável pela ligação aos hormônios, com variações estruturais (6,9,10). Acredita-se que essa alteração resulte em formas constitutivamente ativas do AR, de forma que a ligação do hormônio ao receptor torna-se indispensável para que ocorra a transdução de sinal (11). Além disso, presume-se que a presença de AR-Vs possa ser um evento necessário e estimulante para o desenvolvimento da resistência à terapia de ablação androgênica.

A família BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) compreende um conjunto de genes que codificam proteínas responsáveis pela manutenção do balanço entre os sinais de sobrevivência e de apoptose celular. Um dos genes dessa família é o *BCL2*, que codifica uma proteína antiapoptótica encontrada no epitélio basal da próstata. Estudos demonstraram que este gene pode estar superexpresso no CRPC, resultando em uma resistência à morte celular e associando-se a um pior prognóstico. Já foi relatado que esse grupo de moléculas inibe a apoptose, pela formação de heterodímeros com proteínas pró-apoptóticas também pertencentes à família BCL-2, como a BAX (*BCL2-associated X protein*) (12,13). O gene *BAX*, por outro lado, é responsável pela produção de uma proteína pró-apoptótica. A proteína BAX encontra-se principalmente no epitélio secretório da próstata, o qual

é mais susceptível a apoptose causada pela privação androgênica (13). Acredita-se que essas proteínas atuem induzindo a apoptose através da homodimerização e da ligação à membrana mitocondrial, gerando poros na mitocôndria e ocasionando a alteração do potencial de membrana e a liberação do citocromo C para o citosol. A presença do citocromo C no citosol, por sua vez, desencadeia a via intrínseca da apoptose pela formação do apoptossomo (12,14).

Portanto, analisar a correlação entre a expressão das AR-Vs e os genes *BAX* e *BCL2* em amostras de HPB e CaP é um importante alvo de estudo para compreender a fisiopatologia do desenvolvimento desses tumores prostáticos. Sendo assim, os principais objetivos desse estudo são analisar a expressão gênica de *BAX* e *BCL2* em amostras de CaP e HPB e correlacionar estes dados obtidos com os níveis de expressão gênica das isoformas do *AR* (*AR4*, *AR3/5/6*, *AR5/6*, *AR(3/5/6)/AR(5/6)*).

MATERIAIS E MÉTODOS:

Coleta das amostras: após as cirurgias de CaP e HPB, foram retirados dois fragmentos prostático onde um foi enviado ao Serviço de Patologia do HCPA, a fim de confirmar ou não a presença de câncer de próstata ou de hiperplasia prostática benigna, e o outro foi conservado em nitrogênio líquido para posterior análise.

População e Amostra: Foram selecionados 53 pacientes masculinos provenientes do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com idade entre 45 e 81 anos com diagnóstico de CaP ou HPB. Estes pacientes não foram submetidos a nenhum tipo de hormônio terapia e também não possuíam diagnóstico de nenhuma neoplasia concomitante. Os pacientes do grupo CaP foram submetidos à Prostatovesiculectomia ou à Prostatectomia Radical, enquanto que os do grupo HPB e foram submetidos à Ressecção Transuretral de Próstata ou à Prostatectomia

Aberta. No grupo CaP foram avaliados 26 pacientes, e para o grupo HPB foram selecionados 27 indivíduos. Todos os pacientes foram consultados sobre a utilização do tecido para o estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo II).

Extração de RNA, quantificação e síntese de cDNA: a extração de RNA total foi realizada a partir de 0,2g de tecido utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, EUA) segundo o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi purificado utilizando o sistema PureLink®RNA Mini Kit (Ambion by Life Technologies). A quantificação foi realizada com 1µL da solução de RNA purificada utilizando espectrofotômetro para ácidos nucleicos (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, EUA). A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias (260nm/280nm) foi superior a 1,6. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 2µg de RNA total utilizando o kit Super Script III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, EUA). As amostras foram armazenadas a -20°C até a utilização na reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

Amplificação por PCR em Tempo Real: a análise da expressão gênica de *BAX* e *BCL2* foi normalizada pelo gene beta-2-microglobulina (B2M) e realizada através do PCR em Tempo Real (StepOne Plus, Applied Biosystems) utilizando o sistema de sondas de hidrólise Taqman® (Applied Biosystems), que consiste em um par de *primers* e uma sonda. Os ensaios para avaliação da expressão gênica foram adquiridos da empresa Life Technologies® (B2M – Hs00180269_m1; *BAX* – Hs00180269_m1; *BCL2* – Hs00608023_m1). Em todas as placas foi realizada uma curva-padrão composta por 5 pontos em duplicata e com concentrações de cDNA conhecidas, que foi

utilizada para quantificar as amostras. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar [*threshold cycle* (Ct)].

Expressão gênica do AR e das AR-Vs: as análises da expressão gênica do AR (AR1/2) e das isoformas do AR (AR4, AR3/5/6, AR5/6, AR(3/5/6)/AR(5/6)) foram realizadas em um outro estudo do nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) e os resultados obtidos foram utilizados para comparar com a expressão gênica dos alvos do presente estudo. É importante salientar que existe uma grande similaridade entre as sequências das isoformas AR3, AR5 e AR6 o que impossibilitou, no estudo anterior, o desenho de ensaios específicos para essas isoformas. Sendo assim, a abordagem utilizada foi a amplificação em conjunto das isoformas AR3, AR5 e AR6 (AR3/5/6) e das isoformas AR5 e AR6 (AR5/6). A fim de inferir um valor para a expressão do AR3, optou-se pela realização da razão AR(3/5/6)/AR5/6, que se admitiu corresponder aos níveis de expressão gênica do AR3.

Análise Estatística: Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade da amostra. Considerando a distribuição não paramétrica, foi realizado o teste *U* de Mann-Whitney para analisar a expressão dos transcritos *BAX* e *BCL2*. Para a correlação entre os resultados de expressão gênica dos genes analisados com as demais variáveis estudadas, foi utilizado o teste de correlação de Spearman. A diferença foi considerada significativa quando o $P < 0,05$. As análises foram realizadas com a utilização do programa SPSS 20.0.

RESULTADOS:

Caracterização das amostras estudadas:

As principais características clínicas dos pacientes em estudo estão apresentadas na Tabela I. Os valores das idades dos pacientes [percentil 50 (25 – 75)] entre os grupos foi de 66 (60,0 – 69,0) para HPB e 64,5 (60 – 69) para CaP, não sendo diferente entre os grupos ($P = 0,741$). A dosagem séria de PSA pré-operatório [percentil 50 (25 – 75)] foi de 5,6 (4,42 – 12,55) ng/dL para HPB e de 8 (5,58– 11,9) ng/dL para o grupo CaP, sendo significativamente maior no CaP ($*P = 0,009$). Nos pacientes do grupo CaP, também foram avaliados os parâmetros patológicos de agressividade do tumor, como o escore de Gleason (avalia a graduação histológica das células tumorais) e o estadiamento tumoral (avalia a extensão do tumor). Das 26 amostras, 19 (73,1%) apresentaram escore de Gleason menor ou igual 7(3+4) e 7 (26,9%) apresentaram o escore maior ou igual a 7(4+3). Quanto ao estadiamento patológico, (pT), 17 amostras (65,4%) apresentaram estadiamento pT2 e 9 (34,6%) amostras demonstraram estadiamento pT3. A definição comumente utilizada para a recidiva bioquímica é um nível sérico de antígeno prostático específico (PSA) maior que 0,2 ng/ml, seguido de uma nova dosagem confirmatória (15). Nos pacientes analisados, 6 (23,1%) apresentaram recidiva bioquímica. O peso prostático após a remoção cirúrgica foi de 39 (32 – 45,5)g para o grupo CaP, no grupo HPB este fator não foi avaliado devido a obtenção do material por diferentes métodos cirúrgicos.

Tabela I: Características clínicas e patológicas dos pacientes avaliados. ^αOs valores estão demonstrados em Percentil 50 (25 – 75). ^βDados demonstrados em porcentagem (%). ^γDados não analisados para pacientes com HPB

	CaP (N = 26)	HPB (N = 27)	Valor - P
Idade ^α	64,5 (60 – 69)	66 (60 – 69)	0,741
PSA pré-operatório (ng/dL) ^α	8 (5,58– 11,9)	5,6 (4,42 – 12,55)	*0,009
Peso prostático (g) ^α	46 (34,5 – 83,0)	n/a	n/a
Escore Gleason ≤7 (3+4) ^{βγ}	73,1	n/a	n/a
Escore Gleason ≥7 (4+3) ^{βγ}	26,9	n/a	n/a
pT2 ^{βγ}	65,4	n/a	n/a
pT3 ^{βγ}	34,6	n/a	n/a
Recidiva Bioquímica ^{βγ}	23,1	n/a	n/a

Análise dos níveis de mRNA de BAX:

Foram utilizadas amostras de 27 pacientes com diagnóstico de HPB e 26 pacientes com diagnóstico de CaP para avaliar a expressão gênica de BAX. A expressão tecidual do mRNA foi quantificada por RT-qPCR. A expressão gênica [mediana (percentil 25% -75%) unidades arbitrárias] do transcrito BAX foi de 0,86 (0,65 – 1,22) para o grupo HPB e 2,17 (0,92 – 3,56) para o grupo CaP, apresentando diferença entre os grupos (*P < 0,001) (Figura 1).

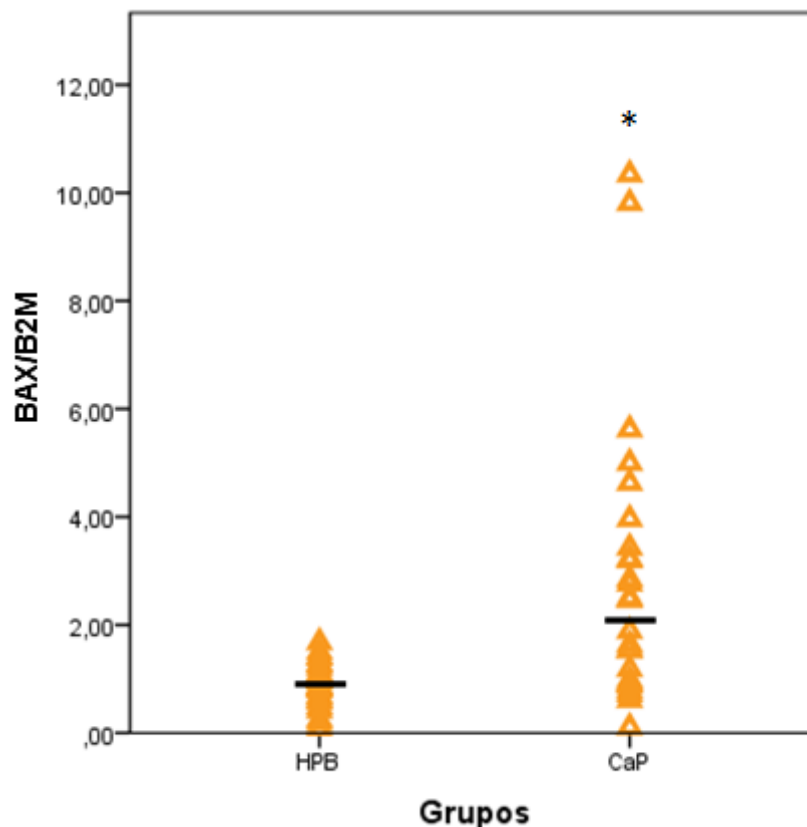


Figura 1: Expressão gênica de *BAX* em tecido prostático de pacientes com HPB (Hiperplasia Prostática Benigna) e CaP (Câncer de Próstata). Dados apresentados como mediana (HPB = 0,86; CaP = 2,17). * $P < 0,001$. B2M (beta-2-microglobulina)

Análise dos níveis de mRNA de *BCL2*:

As mesmas amostras utilizadas na avaliação de *BAX* foram usadas para a análise da expressão gênica de *BCL2*. A expressão tecidual do mRNA foi quantificada por qPCR. A expressão gênica [mediana (percentil 25% -75%) unidades arbitrárias] do transcrito *BCL2* foi de 0,82 (0,66 – 1,17) para o grupo HPB e 1,25 (0,63 – 2,84) para o grupo CaP, apresentando diferença entre os grupos e sendo maior no grupo CaP (* $P = 0,029$) (Figura 2).

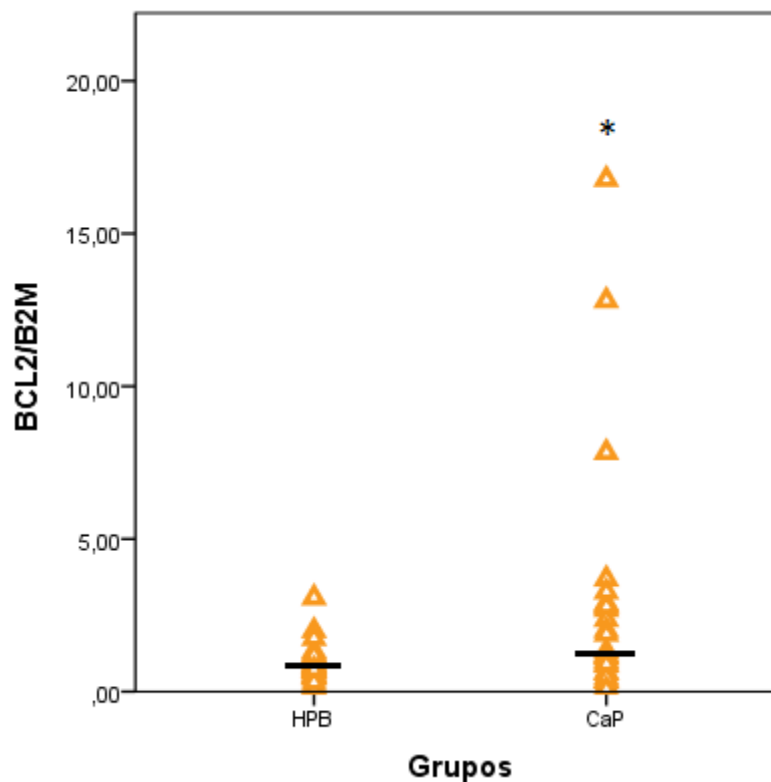


Figura 2: expressão gênica de *BCL2* em tecido prostático de pacientes com HPB (Hiperplasia Prostática Benigna) e CaP (Câncer de Próstata). Dados apresentados como mediana (HBP = 0,82; CaP = 1,25). * $P = 0,029$. B2M (beta-2-microglobulina).

Análise da razão *BCL2/BAX*:

A análise [mediana (percentil 25% -75%) unidades arbitrárias] da relação *BCL2/BAX* foi de 1,19 (0,81 – 1,41) para o grupo HPB e 0,79 (0,39 – 1,86) para o grupo CaP, não apresentando diferença entre os grupos ($P = 0,188$) (Figura 3).

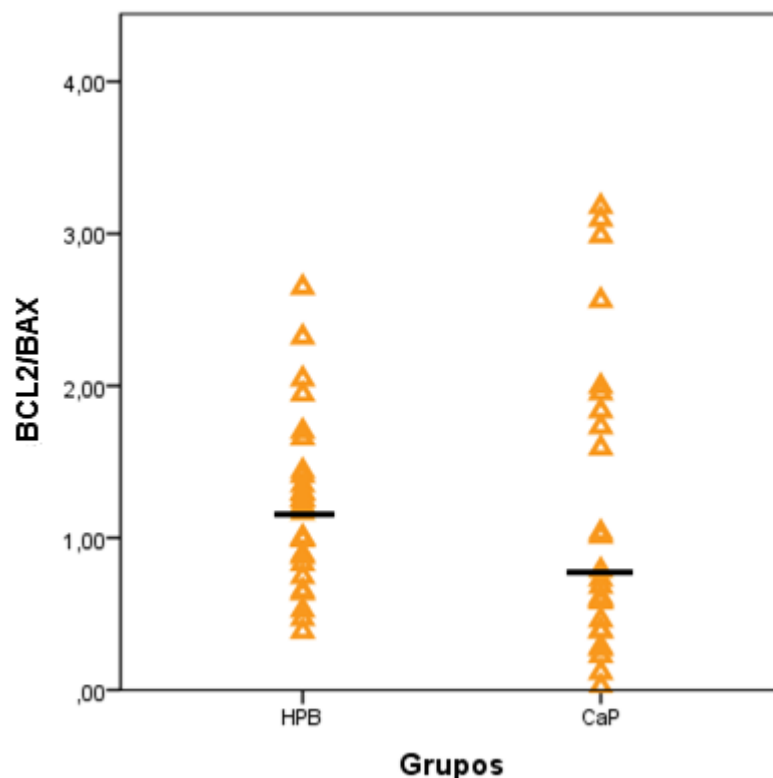


Figura 3: análise da relação $BCL2/BAX$ em tecido prostático de pacientes com HPB (Hiperplasia Prostática Benigna) e CaP (Câncer de Próstata). Dados apresentados como mediana (HBP = 1,19; CaP = 0,79). $P = 0,188$.

Análise da correlação dos gene BAX e $BCL2$ e da razão $BCL2/BAX$ com o AR e suas isoformas [$AR4$; $AR3/5/6$; $AR5/6$; $(AR3/5/6)/(AR5/6)$]:

A fim de avaliar se há alguma possível associação entre a expressão dos genes estudados e a expressão do receptor de androgênios e de suas isoformas, realizamos um teste de correlação entre os resultados de expressão obtidos. Os dados estão demonstrados na Tabela II. No grupo CaP foi encontrada correlação positiva entre os níveis de mRNA de $BCL2$ e do AR (0,464; $*P = 0,020$). A razão $(AR3/5/6)/(AR5/6)$ (que infere a expressão da isoforma $AR3$) correlacionou-se positivamente com a expressão de $BCL2$ (0,450; $*P = 0,024$). A razão $BCL2/BAX$ não

teve correlação com o AR e suas isoformas no grupo CaP. No grupo HPB não foi encontrada nenhuma correlação.

Tabela II: Dados obtidos da expressão gênica de *BAX*, de *BCL2* e da razão *BCL2/BAX* com a expressão do AR e dos AR-Vs. Apresentados como r(P) onde r = coeficiente de correlação. Nenhuma correlação foi encontrada no grupo HPB.

CaP	<i>AR1/2</i>	<i>AR4</i>	<i>AR3/5/6</i>	<i>A5/6</i>	<i>(AR3/5/6)/(AR5/6)</i>
<i>r (P)</i>					
<i>BAX</i>	0,326 (=0,059)	0,383 (=0,059)	0,362 (=0,076)	- 0,148 (=0,497)	0,303 (=0,141)
<i>BCL2</i>	0,464 (=0,020*)	0,128 (=0,543)	0,228 (=0,272)	- 0,333 (=0,104)	0,450 (=0,024*)
<i>BCL2/BAX</i>	0,143 (=0,475)	- 0,054 (=0,790)	0,177 (=0,377)	0,094 (=0,641)	- 0,171 (=0,394)

DISCUSSÃO:

O CaP é uma doença heterogênea, com diferentes características de comportamento, por este motivo, define subgrupos com alto risco de recorrência bioquímica após o tratamento cirúrgico. Os pacientes analisados em nosso estudo apresentaram, em sua maioria, baixo escore de Gleason (73,1% classificados como menor ou igual a 7(3+4)) e estadiamento tumoral em T2 (65,4%). Estes dados refletem na baixa taxa de recidiva bioquímica entre os pacientes (23,1%) (16).

Nesse estudo, observamos um aumento na expressão gênica de *BAX* e *BCL2* nos pacientes do grupo CaP quando comparados com os pacientes do grupo HPB. Estes resultados corroboram com os dados de Iacopino e cols (17), onde foi encontrado uma expressão elevada de *BCL2* e *BAX* em amostras de pacientes que possuíam CaP em relação aos que tinham HPB (17). Esses dois genes são pertencentes a uma família gênica que codifica proteínas pró e antiapoptóticas, que é amplamente estudada na oncologia (17-19). Além disso, outros estudos demonstraram que em tumores, como carcinoma de mama e leucemias, o *BCL2* está superexpresso, sugerindo a importância deste alvo de estudo de neoplasias (20-24).

Estudos de Karnak, D e Xu, Liang (25) demonstraram que níveis elevados de *BCL2* estão relacionados com a resistência tumoral a uma gama de quimioterápicos (25). Mesmo que os pacientes avaliados não tenham demonstrado alta agressividade tumoral em sua maioria, ainda assim observamos o aumento de expressão dos genes *BAX* e *BCL2*, sugerindo que a alteração de genes relacionados à apoptose é essencial para o desenvolvimento do tumor.

O gene *BAX* codifica a proteína BAX que, por sua vez, atua promovendo a apoptose. Em nosso estudo, observamos um aumento dos níveis de mRNA de *BAX* em amostras de CaP quando comparadas com HPB (*P < 0,001), corroborando com outro estudo da literatura (17). Além disso, já foi descrita a expressão gênica elevada de *BAX* em relação ao *BCL2* em

tumores prostáticos, o que se sugere que, pela característica pró-apoptótica do gene *BAX*, a sua expressão pode estar elevada em neoplasias e anomalias proliferativas justamente para tentar regredir e impedir a proliferação exacerbada (17). Entretanto, como a função e a ação da proteína *BAX* são reduzidas na presença da proteína *BCL2* pela formação do heterodímero *BAX-BCL2*, é importante analisar a razão da expressão de ambas.

Já foi descrito que a formação de heterodímeros citoplasmáticos entre *BAX* e *BCL2* podem atuar como agentes proliferativos (19,26). Com isso, é de extrema importância a análise da razão *BCL2/BAX*, uma vez que se a presença de *BCL2* for elevada em relação à de *BAX*, a formação de heterodímeros pode estar aumentada impedindo que *BAX* atue estimulando indução de apoptose.

Também avaliamos a razão *BCL2/BAX*, embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre os grupos. Acreditamos que esse resultado deve-se ao fato de que a elevação da expressão de *BCL2* ocorreu de maneira paralela à elevação da expressão de *BAX*, mantendo a proporção da razão. Portanto, hipotetizamos que esse aumento da expressão de *BAX* seja uma reação da célula a fim de tentar combater a proliferação celular, resultando em tipos tumorais menos agressivos. Adicionando-se a isso, outra possível hipótese para justificar a não diferença entre a razão *BCL2/BAX* e os grupos CaP e HPB é o fato de a maioria dos pacientes do grupo CaP (73,1%) possuírem um escore de Gleason baixo [menor ou igual 7 (3+4)], visto que já foi descrito na literatura que altos níveis de *BCL2* estão expressos em

cânceres de próstata mais agressivos (13,16,18). Possivelmente se os pacientes analisados no presente estudo tivessem tipos celulares mais agressivos, poderíamos esperar expressões maiores de *BCL2* e a razão *BCL2/BAX* possivelmente estaria elevada no grupo CaP quando comparado ao HPB.

Analisamos a presença de associação entre a expressão de *BCL2* e fatores como recidiva bioquímica e escore de Gleason. Não foi observada diferença de expressão gênica de *BAX* e *BCL2* em amostras de CaP nos diferentes escores de Gleason (dados não mostrados). Além disso, não identificamos diferença de expressão de *BCL2* em pacientes que sofreram recidiva quando comparados com aqueles que não sofreram (dados não mostrados). Apesar de não termos observado correlação entre a expressão de *BCL2* e fatores como recidiva bioquímica e elevado escore de Gleason, dados da literatura já relataram que há superexpressão de *BCL2* em pacientes com CRPC (27). E ainda, pacientes com elevado escore de Gleason e que apresentaram recidiva bioquímica expressam altos níveis de *BCL2* quando comparados a pacientes sem recidiva e com Gleason menor (13,28). Levando em consideração os dados da literatura, acreditamos que não foi observada diferença de *BCL2* e *BAX* entre pacientes que recidivaram e que não recidivaram pelo fato de o número de pacientes que recidivaram ser muito pequeno ($N = 6$). Além disso, o entendimento da instabilidade genética que ocorre durante o desenvolvimento oncológico e a agressividade tumoral é essencial para

desvendar os mecanismos moleculares relacionados ao câncer e tentar contornar essas alterações a fim de combater a alta proliferação celular.

Utilizando os dados da expressão gênica do *AR* e das *AR-Vs* obtidas em estudo prévio do grupo (29) foi possível avaliar a correlação com a expressão gênica de *BAX* e de *BCL2*. Cabe salientar que as isoformas do *AR* são consideradas constitutivamente ativas e independem da presença de ligante para desencadear a sinalização intracelular. Foi encontrada uma correlação significativa apenas no grupo CaP entre a expressão de *BCL2* e do receptor de androgênios (*AR1/2*) e entre *BCL2* e a expressão do *AR3* [salientando que a expressão do *AR3* foi inferida a partir da razão $(AR3/5/6)/(AR5/6)$]. Embora a análise dos produtos gerados do *splicing* alternativo que ocorre no pré-mRNA do *AR* ainda seja bastante recente, alguns estudos já demonstraram a presença das isoformas em amostras de CaP (11,30,31). Corroborando com os nossos dados, já foi demonstrado que duas maneiras de manter a proliferação celular e, possivelmente, resultar em uma progressão tumoral para CPRC, seriam a superexpressão do *AR* e do *BCL2* (32). Foi identificada uma correlação positiva entre a expressão de *BCL2* e a presença da isoforma *AR3* (33). Interessantemente, estudos já demonstraram que em linhagens celulares a presença de *AR3* é essencial para a proliferação em um ambiente de privação androgênica (34) e relacionaram a expressão elevada do *AR3* com o aumento da produção de proteínas indispensáveis para que ocorra a transição epitelial-mesenquimal, evento necessário para a metástase (35).

Dessa maneira, acredita-se que a correlação positiva da expressão de *BCL2* com o *AR* e com a isoforma *AR3* seja importante para o desencadeamento da proliferação celular, do desenvolvimento tumoral e também para manutenção da proliferação celular frente à ablação androgênica. Embora no presente estudo não tenhamos identificado uma correlação entre a razão *BCL2/BAX* e a expressão do *AR* e das *AR-Vs*, já foi descrito que quanto maior esta razão, maior a expressão do *AR* (33).

CONCLUSÃO:

Ambos os genes *BAX* e *BCL2* foram significativamente mais expressos no grupo CaP em relação ao grupo HPB. A correlação entre o gene *BCL2* e os genes *AR* e *AR3* no grupo CaP sugere uma associação entre a via de sinalização androgênica e o processo antiapoptótico na regulação do processo de formação tumoral. A análise acerca das diferentes isoformas do receptor de androgênio e da sua relação com a expressão de genes relacionados à regulação apoptótica é de extrema importância para o entendimento da progressão tumoral e mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar as questões ainda não respondidas.

FINANCIAMENTO: este projeto foi financiado pelas seguintes agências de fomento – FINEP/UNICAMP, CNPq, Capes e FAPERGS e aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA sob nº 12- 0320 (Anexo III).

CONFLITO DE INTERESSE: todos os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Shrivastava A, Gupta VB. Various treatment options for benign prostatic hyperplasia: A current update. *J Midlife Health* 2012;3(1):10-19.
2. Welen K, Damber JE. Prostate diseases--role of sex steroids and their inhibitors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(2):355-367.
3. Ho CK, Habib FK. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. *Nat Rev Urol* 2011;8(1):29-41.
4. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol* 2012;61(6):1079-1092.
5. Grossmann M, Cheung AS, Zajac JD. Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013;27(4):603-616.
6. Guo Z, Qiu Y. A new trick of an old molecule: androgen receptor splice variants taking the stage?! *Int J Biol Sci* 2011;7(6):815-822.
7. Marcelli M, Cunningham GR. Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3463-3468.
8. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, Sawyers CL. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 2004;10(1):33-39.
9. Nagabhushan M, Miller CM, Pretlow TP, Giaconia JM, Edgehouse NL, Schwartz S, Kung HJ, de Vere White RW, Gumerlock PH, Resnick MI, Amini SB, Pretlow TG. CWR22: the first human prostate cancer xenograft with

strongly androgen-dependent and relapsed strains both in vivo and in soft agar. *Cancer Res* 1996;56(13):3042-3046.

10. 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.
11. 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.
12. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010;37(3):299-310.
13. Khor LY, Moughan J, Al-Saleem T, Hammond EH, Venkatesan V, Rosenthal SA, Ritter MA, Sandler HM, Hanks GE, Shipley WU, Pollack A. Bcl-2 and BAX expression predict prostate cancer outcome in men treated with androgen deprivation and radiotherapy on radiation therapy oncology group protocol 92-02. *Clin Cancer Res* 2007;13(12):3585-3590.
14. Parrondo R, de Las Pozas A, Reiner T, Perez-Stable C. ABT-737, a small molecule Bcl-2/Bcl-xL antagonist, increases antimitotic-mediated apoptosis in human prostate cancer cells. *PeerJ* 2013;1:e144.
15. Oh JJ, Hong SK, Lee S, Sohn SJ, Lee SE. Diabetes mellitus is associated with short prostate-specific antigen doubling time after radical prostatectomy. *Int Urol Nephrol* 2013;45(1):121-127.

16. Cho IC, Chung HS, Cho KS, Kim JE, Joung JY, Seo HK, Chung J, Park WS, Hong EK, Lee KH. Bcl-2 as a predictive factor for biochemical recurrence after radical prostatectomy: an interim analysis. *Cancer Res Treat* 2010;42(3):157-162.
17. Iacopino F, Angelucci C, Lama G, Zelano G, La Torre G, D'Addessi A, Giovannini C, Bertaccini A, Macaluso MP, Martorana G, Sica G. Apoptosis-related gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. *Anticancer Res* 2006;26(3A):1849-1854.
18. Baspinar S, Bircan S, Orhan H, Kapucuoglu N, Bozkurt KK. The relation of beclin 1 and bcl-2 expressions in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate adenocarcinoma: A tissue microarray study. *Pathol Res Pract* 2014.
19. Catz SD, Johnson JL. BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis* 2003;8(1):29-37.
20. Guo R, Overman M, Chatterjee D, Rashid A, Shroff S, Wang H, Katz MH, Fleming JB, Varadhachary GR, Abbruzzese JL. Aberrant expression of p53, p21, cyclin D1, and *BCL2* and their clinicopathological correlation in ampullary adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2014;45(5):1015-1023.
21. Mehta SV, Shukla SN, Vora HH. Overexpression of *BCL2* protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: its correlation with FLT3. *Neoplasma* 2013;60(6):666-675.
22. Rahmani A, Alzohairy M, Babiker AY, Rizvi MA, Elkarimahmad HG. Clinicopathological significance of PTEN and *BCL2* expressions in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5(9):965-971.

23. Pich A, Margaria E, Chiusa L. Bcl-2 expression in male breast carcinoma. *Virchows Arch* 1998;433(3):229-235.
24. Temmim L, Luqmani YA, Jarallah M, Juma I, Mathew M. Evaluation of prognostic factors in male breast cancer. *Breast* 2001;10(2):166-175.
25. Karnak D, Xu L. Chemosensitization of prostate cancer by modulating Bcl-2 family proteins. *Curr Drug Targets* 2010;11(6):699-707.
26. Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(2):111-121.
27. Taichman RS, Loberg RD, Mehra R, Pienta KJ. The evolving biology and treatment of prostate cancer. *J Clin Invest* 2007;117(9):2351-2361.
28. Anvari K, Seilanian Toussi M, Kalantari M, Naseri S, Karimi Shahri M, Ahmadnia H, Katebi M, Sedighi Pashaki A, Dayani M, Broumand M. Expression of Bcl-2 and *BAX* in advanced or metastatic prostate carcinoma. *Urol J* 2012;9(1):381-388.
29. 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 [Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.
30. Zhao H, Coram MA, Nolley R, Reese SW, Young SR, Peehl DM. Transcript levels of androgen receptor variant AR-V1 or AR-V7 do not predict recurrence in patients with prostate cancer at indeterminate risk for progression. *J Urol* 2012;188(6):2158-2164.
31. Jernberg E, Thysell E, Bovinder Ylitalo E, Rudolfsson S, Crnalic S, Widmark A, Bergh A, Wikstrom P. Characterization of prostate cancer bone metastases

according to expression levels of steroidogenic enzymes and androgen receptor splice variants. *PLoS One* 2013;8(11):e77407.

32. Schulman CC, Irani J, Morote J, Schalken JA, Montorsi F, Chlosta PL, Heidenreich A. Testosterone measurement in patients with prostate cancer. *Eur Urol* 2010;58(1):65-74.
33. Amirghofran Z, Monabati A, Gholijani N. Androgen receptor expression in relation to apoptosis and the expression of cell cycle related proteins in prostate cancer. *Pathol Oncol Res* 2004;10(1):37-41.
34. Liu LL, Xie N, Sun S, Plymate S, Mostaghel E, Dong X. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene* 2013.
35. Sun F, Chen HG, Li W, Yang X, Wang X, Jiang R, Guo Z, Chen H, Huang J, Borowsky AD, Qiu Y. Androgen receptor splice variant AR3 promotes prostate cancer via modulating expression of autocrine/paracrine factors. *J Biol Chem* 2014;289(3):1529-1539.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS:

Neste estudo verificamos que os genes *BAX* e *BCL2* estão mais expressos em amostras de CaP, o que sugere que esses genes reguladores da apoptose estão relacionados com o desencadeamento desta doença. Além disso, a correlação dos níveis de mRNA do *BCL2* e *AR* e do *BCL2* e do *AR3* em CaP demonstram um importante envolvimento das isoformas do AR no desenvolvimento do CaP.

Como perspectivas do presente estudo têm a realização de análises da expressão proteica das isoformas do receptor de androgênio e das proteínas BAX e BCL2, afim de corroborar com os dados de expressão gênica obtidos por este estudo.

BIBLIOGRAFIA GERAL:

- Alberts, B. (2010). *Biologia Molecular da Celula*, Artmed Editora.
- Amirghofran, Z., A. Monabati, et al. (2004). "Androgen receptor expression in relation to apoptosis and the expression of cell cycle related proteins in prostate cancer." *Pathol Oncol Res* 10(1): 37-41.
- Anvari, K., M. Seilanian Toussi, et al. (2012). "Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma." *Urol J* 9(1): 381-388.
- Balk, S. P. and K. E. Knudsen (2008). "AR, the cell cycle, and prostate cancer." *Nucl Recept Signal* 6: e001.
- Baspinar, S., S. Bircan, et al. (2014). "The relation of beclin 1 and bcl-2 expressions in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate adenocarcinoma: A tissue microarray study." *Pathol Res Pract*.
- Bonekamp, D., M. A. Jacobs, et al. (2011). "Advancements in MR imaging of the prostate: from diagnosis to interventions." *Radiographics* 31(3): 677-703.
- Carson, C., 3rd and R. Rittmaster (2003). "The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia." *Urology* 61(4 Suppl 1): 2-7.
- Catz, S. D. and J. L. Johnson (2003). "BCL-2 in prostate cancer: a minireview." *Apoptosis* 8(1): 29-37.
- Center, M. M., A. Jemal, et al. (2012). "International variation in prostate cancer incidence and mortality rates." *Eur Urol* 61(6): 1079-1092.
- Chen, C. D., D. S. Welsbie, et al. (2004). "Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy." *Nat Med* 10(1): 33-39.
- Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, et al. (2010). "The BCL-2 family reunion." *Mol Cell* 37(3): 299-310.
- Cho, I. C., H. S. Chung, et al. (2010). "Bcl-2 as a predictive factor for biochemical recurrence after radical prostatectomy: an interim analysis." *Cancer Res Treat* 42(3): 157-162.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* 2(9): 647-656.
- Culig, Z. and F. R. Santer (2014). "Androgen receptor signaling in prostate cancer." *Cancer Metastasis Rev*.

- Cunha, G. R. (2008). "Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future." *Differentiation* 76(6): 578-586.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.
- Grossmann, M., A. S. Cheung, et al. (2013). "Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27(4): 603-616.
- Guo, R., M. Overman, et al. (2014). "Aberrant expression of p53, p21, cyclin D1, and Bcl2 and their clinicopathological correlation in ampullary adenocarcinoma." *Hum Pathol* 45(5): 1015-1023.
- 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.
- Hemminki, K. and K. Czene (2002). "Age specific and attributable risks of familial prostate carcinoma from the family-cancer database." *Cancer* 95(6): 1346-1353.
- Hillebrand, A. C. (2013). Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata e a sua possível associação com a agressividade do tumor. *Departamento de Fisiologia*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Ho, C. K. and F. K. Habib (2011). "Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH." *Nat Rev Urol* 8(1): 29-41.
- 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.
- Iacopino, F., C. Angelucci, et al. (2006). "Apoptosis-related gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma." *Anticancer Res* 26(3A): 1849-1854.

- INCA. (2013). "INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014." Retrieved 09/01/2014, 2014, from http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014.
- Isaacs, J. T. (1999). "The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop?" *Urol Clin North Am* 26(2): 263-273.
- Jacobsen, S. J., C. J. Girman, et al. (2001). "Natural history of benign prostatic hyperplasia." *Urology* 58(6 Suppl 1): 5-16; discussion 16.
- Jernberg, E., E. Thysell, et al. (2013). "Characterization of prostate cancer bone metastases according to expression levels of steroidogenic enzymes and androgen receptor splice variants." *PLoS One* 8(11): e77407.
- 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*.
- Karnak, D. and L. Xu (2010). "Chemosensitization of prostate cancer by modulating Bcl-2 family proteins." *Curr Drug Targets* 11(6): 699-707.
- Kheterpal, E., J. D. Sammon, et al. (2013). "Effect of metabolic syndrome on pathologic features of prostate cancer." *Urol Oncol* 31(7): 1054-1059.
- Khor, L. Y., J. Moughan, et al. (2007). "Bcl-2 and Bax expression predict prostate cancer outcome in men treated with androgen deprivation and radiotherapy on radiation therapy oncology group protocol 92-02." *Clin Cancer Res* 13(12): 3585-3590.
- Li, Y., S. C. Chan, et al. (2013). "Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines." *Cancer Res* 73(2): 483-489.
- Lin, Y., J. Kokontis, et al. (2006). "Androgen and its receptor promote Bax-mediated apoptosis." *Mol Cell Biol* 26(5): 1908-1916.
- Liu, L. L., N. Xie, et al. (2013). "Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells." *Oncogene*.
- Lonergan, P. E. and D. J. Tindall (2011). "Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression." *J Carcinog* 10: 20.

- Maddika, S., S. R. Ande, et al. (2007). "Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy." Drug Resist Updat 10(1-2): 13-29.
- Marcelli, M. and G. R. Cunningham (1999). "Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia." J Clin Endocrinol Metab 84(10): 3463-3468.
- McConnell, J. D., C. G. Roehrborn, et al. (2003). "The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia." N Engl J Med 349(25): 2387-2398.
- McVary, K. T. (2006). "BPH: epidemiology and comorbidities." Am J Manag Care 12(5 Suppl): S122-128.
- Mehta, S. V., S. N. Shukla, et al. (2013). "Overexpression of Bcl2 protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: its correlation with FLT3." Neoplasma 60(6): 666-675.
- Nagabhushan, M., C. M. Miller, et al. (1996). "CWR22: the first human prostate cancer xenograft with strongly androgen-dependent and relapsed strains both in vivo and in soft agar." Cancer Res 56(13): 3042-3046.
- O'Connor, C. M. A., J. U (2010). *Essentials of Cell Biology*. M. N. E. Cambridge.
- O'Leary, M. P., J. T. Wei, et al. (2008). "Correlation of the International Prostate Symptom Score bother question with the Benign Prostatic Hyperplasia Impact Index in a clinical practice setting." BJU Int 101(12): 1531-1535.
- Oh, J. J., S. K. Hong, et al. (2013). "Diabetes mellitus is associated with short prostate-specific antigen doubling time after radical prostatectomy." Int Urol Nephrol 45(1): 121-127.
- Ouyang, L., Z. Shi, et al. (2012). "Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis." Cell Prolif 45(6): 487-498.
- Parrondo, R., A. de Las Pozas, et al. (2013). "ABT-737, a small molecule Bcl-2/Bcl-xL antagonist, increases antimitotic-mediated apoptosis in human prostate cancer cells." PeerJ 1: e144.
- Parsons, J. K., H. B. Carter, et al. (2006). "Metabolic factors associated with benign prostatic hyperplasia." J Clin Endocrinol Metab 91(7): 2562-2568.

- Pich, A., E. Margaria, et al. (1998). "Bcl-2 expression in male breast carcinoma." Virchows Arch 433(3): 229-235.
- Rahmani, A., M. Alzohairy, et al. (2012). "Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma." Int J Clin Exp Pathol 5(9): 965-971.
- Reed, J. C. (2002). "Apoptosis-based therapies." Nat Rev Drug Discov 1(2): 111-121.
- Rocha, I. G. A. R. A. B. d. (2007). "Apoptosis: Programmed Cell Death." Revista Brasileira de Cancerologia 53(3): 9.
- 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.
- Schulman, C. C., J. Irani, et al. (2010). "Testosterone measurement in patients with prostate cancer." Eur Urol 58(1): 65-74.
- Shrivastava, A. and V. B. Gupta (2012). "Various treatment options for benign prostatic hyperplasia: A current update." J Midlife Health 3(1): 10-19.
- Sun, F., H. G. Chen, et al. (2014). "Androgen receptor splice variant AR3 promotes prostate cancer via modulating expression of autocrine/paracrine factors." J Biol Chem 289(3): 1529-1539.
- Taichman, R. S., R. D. Loberg, et al. (2007). "The evolving biology and treatment of prostate cancer." J Clin Invest 117(9): 2351-2361.
- Temnim, L., Y. A. Luqmani, et al. (2001). "Evaluation of prognostic factors in male breast cancer." Breast 10(2): 166-175.
- Tepper, C. G., D. L. Boucher, et al. (2002). "Characterization of a novel androgen receptor mutation in a relapsed CWR22 prostate cancer xenograft and cell line." Cancer Res 62(22): 6606-6614.
- Velentzas, A. D., I. P. Nezis, et al. (2007). "Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell death during *Drosophila virilis* oogenesis." Autophagy 3(2): 130-132.
- 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.

- Watson, P. A., Y. F. Chen, et al. (2010). "Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 107(39): 16759-16765.
- Welen, K. and J. E. Damber (2011). "Prostate diseases--role of sex steroids and their inhibitors." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 25(2): 355-367.
- Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." J Exp Clin Cancer Res 30: 87.
- Zhao, H., M. A. Coram, et al. (2012). "Transcript levels of androgen receptor variant AR-V1 or AR-V7 do not predict recurrence in patients with prostate cancer at indeterminate risk for progression." J Urol 188(6): 2158-2164.
- Zinkel, S., A. Gross, et al. (2006). "BCL2 family in DNA damage and cell cycle control." Cell Death Differ 13(8): 1351-1359.

ANEXOS

Anexo I

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-holder 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.

Anexo II**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 84070066) 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.

Local e data _____

Paciente ou responsável (nome legível): _____

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**

Anexo III**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

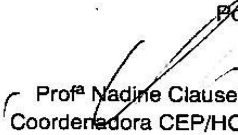
ANA CAROLINE HILLEBRAND

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