

# ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (ERs e GPR30) EM TECIDO PROSTÁTICO HUMANO DE HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA E CÂNCER DE PRÓSTATA

Maria Eduarda Azambuja Amaral<sup>1,2</sup>; Fernanda E.R. Seibel<sup>1,2</sup>; Ilma Simoni Brum, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia - UFRGS, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisa Experimental Hospital de Clínicas Porto Alegre, Brasil

## Introdução

O câncer de próstata (CaP) e a hiperplasia prostática benigna (HPB) são as duas neoplasias mais comuns da próstata e acometem um número significativo de homens. Os estrogênios têm sido citados como estimuladores da proliferação de células de câncer de próstata, em cultura, através de efeitos mediados por seus receptores (ER). Os dois principais tipos de receptores, receptor de estrogênio alfa (ER $\alpha$ ) e receptor de estrogênio beta (ER $\beta$ ), são expressos na próstata humana normal e na patológica. Como esses receptores são diferentes em diversos aspectos fisiológicos, é provável que um desequilíbrio em suas expressões possa ser essencial para determinar o efeito final do estrogênio nas células prostáticas. No CaP, a ativação de ER $\beta$  parece limitar a proliferação celular diretamente e a perda deste receptor tem sido associada com a progressão tumoral. Além disso, estudos indicam a existência de um receptor de estrogênio não clássico, o GPR30. Esse receptor, juntamente com os ERs, ativaría as vias das MAPKs e PI3Ks diretamente ou indiretamente - através do EGFR - regulando eventos de transcrição envolvidos no crescimento celular. Esse receptor está presente na próstata e pouco se sabe sobre sua função neste tecido. Ambos receptores podem estar relacionadas à sobrevivência celular e ter importância no desenvolvimento do câncer de próstata (CaP) e da hiperplasia prostática benigna (HPB).

## Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar a expressão gênica e proteica dos receptores de estrogênio (ERs e GPR30) em tecido prostático de hiperplasia prostática benigna e de câncer de próstata.

## Materiais e Métodos

### Pacientes e Amostras

- As amostras de tecido de CaP e HPB foram coletadas de pacientes provenientes do Serviço de Urologia do HCPA;
- Todos os pacientes assinaram o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido aceitando participar do estudo.

### Grupos

- Foram utilizados 35 pacientes para análise da expressão gênica e 10 pacientes para análise da expressão proteica de cada grupo. Os grupos foram divididos em CaP (Câncer de Próstata) e HPB (Hiperplasia Prostática Benigna).

### Extração de RNA e Purificação

Extração do RNA  $\rightarrow$  TRIzol® (Invitrogen Life Technologies) Purificação RNA: Rneasy Mini kit (Qiagen®)

**Quantificação do RNA** : espectrofotômetro para ácidos nucleicos GeneQuant® (Pharmacia Biotech). Pureza satisfatória 260nm/280nm > 1,6

**Síntese de cDNA** : foi realizada a partir de 2  $\mu$ g do RNA total utilizando um primer complementar à cauda poli-A. 2 a 3% mRNA  $\rightarrow$  40ng cDNA

**qPCR**: a técnica quantitativa utilizada para a análise da expressão gênica foi o PCR em Tempo Real, utilizando o corante fluorescente SYBER Green I. O gene  $\beta$ -microglobulina foi utilizado como normalizador.

**Extração Proteica**  $\rightarrow$  0,2g tecido homogeneizado  $\rightarrow$  RIPA (BioBasic Inc.)

**Quantificação de proteínas**: 10  $\mu$ L de amostra foram utilizados para dosagem de proteínas pelo Método Colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). A quantidade de proteína das amostras foi analisada por leitura de espectrometria com comprimento de onda de 595 nm.

**Análise proteica**: realizada a partir da técnica de Western Blot (50  $\mu$ g de proteína por poço).

**Análises Estatísticas**: o teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise dos dados não paramétricos e o teste *T* para análise dos resultados paramétricos. O software utilizado foi o SPSS 16.0.

## Resultados

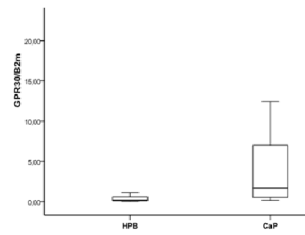


Figura 01: Expressão gênica do GPR30 em amostras de HPB (0,16 (0,11 - 0,59)) e CaP (2,09 (0,50 - 9,60))  $p = 0,000$ .

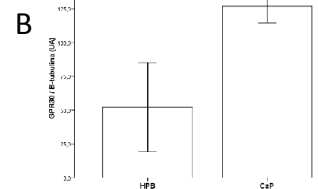
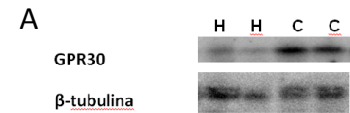


Figura 02: Análise dos níveis proteicos do receptor GPR30 das amostras de HPB comparadas com as amostras de CaP. (A) Representação das bandas do GPR30 onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas e é expresso como a relação GPR30/ $\beta$ -tubulina, demonstrando diferença significativa entre os grupos.  $P=0,001$ . HPB (52,16  $\pm$  16,49) CaP (126,89  $\pm$  6,24)

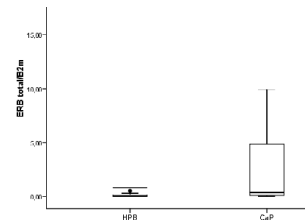


Figura 03: Expressão gênica do ER $\beta$  total em amostras de HPB (0,029 (0,0066 - 0,346)) e CaP (0,383 (0,083 - 6,64))  $p = 0,000$ .

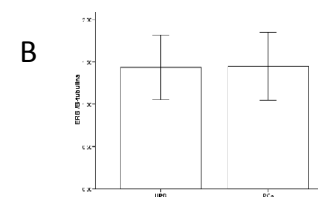
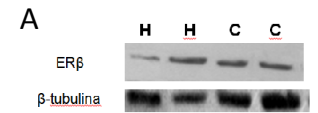


Figura 04: Análise dos níveis proteicos do ER $\beta$ . (A) Representação das bandas de ER $\beta$  e  $\beta$ -tubulina onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico é expresso como a relação ER $\beta$  /  $\beta$ -tubulina, não demonstra diferença significativa entre os grupos.  $P=0,002$ . HPB (1,43  $\pm$  0,119) CaP (1,44  $\pm$  0,2)

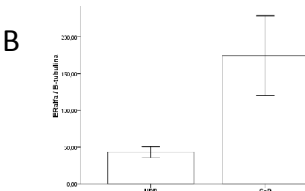
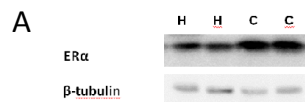


Figura 05: Análise dos níveis proteicos do ER $\alpha$ . (A) Representação das bandas de ER $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico é expresso como a relação ER $\alpha$  /  $\beta$ -tubulina, demonstrando diferença significativa entre os grupos.  $P=0,002$ . HPB (46,56  $\pm$  4,08) CaP (174,41  $\pm$  27,15)

## Conclusão

De acordo com os resultados analisados, os receptores de estrogênio ER $\alpha$ , ER $\beta$  e GPR30 são expressos tanto no tecido de hiperplasia prostática benigna quanto no tecido de câncer de próstata. As diferenças nas expressões destes receptores analisados em cada grupo indica um possível papel no desenvolvimento destas doenças.