

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E VIAS DE SINALIZAÇÃO
MAPK E PI3K EM HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA E
CÂNCER DE PRÓSTATA**

FERNANDA EUGÊNIA RODRIGUES SEIBEL

Porto Alegre, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA

**RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E VIAS DE SINALIZAÇÃO
MAPK E PI3K EM HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA E
CÂNCER DE PRÓSTATA**

FERNANDA EUGÊNIA RODRIGUES SEIBEL

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutor em Fisiologia.

Porto Alegre

2014

Dedico este trabalho ao meu pai Cláudio José Seibel e a minha mãe Islândia Rodrigues Seibel com todo meu amor, carinho e admiração e para meu padrinho Dario da Rosa com saudades.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me carregar nos braços durante todos os momentos da minha vida, mostrando as escolhas certas.

À minha orientadora Ilma Simoni Brum da Silva por toda sua dedicação e por seu exemplo como pessoa, professora e pesquisadora.

Ao meu marido Alex Sander da Rosa Araújo pelo enorme incentivo, compreensão, paciência e pelo auxílio neste trabalho.

Aos amigos Vanderlei Biolchi e Gabriela dos Santos Sant Anna pela amizade para a vida toda e por toda a ajuda no desenvolvimento dos experimentos deste trabalho.

Aos amigos Gisele Branchini, Carmen Sarori e Joelson Tomedi pela amizade, dicas e ajuda nos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório Gustavo, Carol, Patrícia, e Amanda pela animação contagiante.

Aos meus pais, pelo exemplo, por todo amor, carinho, paciência e incentivo.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 01. Localização e anatomia da próstata..... | 16 |
| Figura 02. Mecanismos de ação dos estrogênios..... | 22 |
| Figura 03. Modelos de ativação dos receptores de estrogênio..... | 23 |
| Figura 04. Isoformas dos receptores de estrogênio ER α em A e ER β em B..... | 27 |
| Figura 05. Interação entre a sinalização rápida e a genômica mediada pelos estrogênios através dos receptores de estrogênio clássicos (ER) e do GPER..... | 30 |
| Figura 06. Proteínas MAPKs..... | 33 |
| Figura 07. Via PI3K..... | 34 |
| Figura 08. Expressão gênica do GPER em amostras de HPB e CaP..... | 58 |
| Figura 09. Níveis protéicos do GPER das amostras de HPB e CaP..... | 59 |
| Figura 10. GPER no estroma do tecido de HPB e CaP..... | 61 |
| Figura 11. GPER no epitélio do tecido de HPB e CaP..... | 62 |
| Figura 12. Ativação da ERK1/2 na HPB e CaP..... | 63 |
| Figura 13. Ativação da proteína p38 α na HPB e CaP..... | 64 |
| Figura 14. Ativação da proteína JNK1/2..... | 65 |
| Figura 15. Níveis protéicos da c-JUN..... | 66 |
| Figura 16. Dosagem de estrogênio tecidual no grupo HPB e CaP..... | 67 |
| Figura 17. Expressão gênica do ER α em amostras de HPB e CaP..... | 68 |
| Figura 18. Níveis protéicos do ER α | 69 |
| Figura 19. ER α no estroma do tecido de HPB e CaP..... | 71 |
| Figura 20. ER α no epitélio do tecido de HPB e CaP..... | 72 |
| Figura 21. Níveis protéicos da PI3K..... | 73 |
| Figura 22. Ativação da proteína AKT..... | 74 |
| Figura 23. Ativação da proteína GSK3 β | 75 |
| Figura 24. Níveis proteicos da mTOR..... | 76 |
| Figura 25. Expressão gênica do ER β total em amostras de HPB e CaP..... | 77 |
| Figura 26. Níveis protéicos do ER β total..... | 78 |
| Figura 27. Expressão gênica da isoforma ER β 1 e ER β 6..... | 79 |
| Figura 28. Expressão gênica da isoforma ER β 2 em amostras de HPB e CaP..... | 80 |
| Figura 29. Expressão gênica da isoforma ER β 5..... | 81 |
| Figura 30. Proposta de mecanismo de ação dos hormônios estrogênios no câncer de próstata em A e na hiperplasia prostática benigna em B..... | 97 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01. Sequência de nucleotídeos (5'-3') e condições de reação..... | 43 |
| Tabela 02. Anticorpos primários utilizados no Western Blot..... | 49 |
| Tabela 03. Caracterização dos pacientes..... | 57 |
| Tabela 04. Medidas de intensidade de fluorescência do GPER e sua colocalização em relação ao núcleo no estroma e no epitélio de HPB e CaP..... | 60 |
| Tabela 05. Medidas de intensidade de fluorescência do ER α no estroma e no epitélio de HPB e CaP e sua colocalização em relação ao núcleo..... | 70 |
| Tabela 06. Resultados do teste de correlação de Spearman..... | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT- proteína cinase B
AMPc- monofosfato de adenosina cíclico
AP1 – proteína ativadora 1
β2-m - β2-microglobulina
BSA - albumina sérica bovina
CaP - câncer de próstata
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CoRegs – proteínas correguladoras
CRE - elemento responsivo ao AMPc
CREB- proteínas ligadoras aos elementos responsivos ao AMPc
Ct - ciclo limiar (*Threshold Cycle*)
DBD - domínio de ligação ao DNA
DNA - ácido desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleotídeos
E2 - 17β-estradiol
EGF- fator de crescimento epidermal
EGFR- receptor de fator de crescimento epidermal
ER – receptor de estrogênio
ERα – receptor de estrogênio α
ERβ – receptor de estrogênio β
ERβ1 – receptor de estrogênio β1
ERβ2 – receptor de estrogênio β2
ERβ4 – receptor de estrogênio β4
ERβ5 – receptor de estrogênio β5
ERE - elemento responsivo ao estrogênio
ERK- cinase regulada por sinal extracelular
FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FIPE - Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos
GDP- difosfato de guanosina

GSK3- glicogênio sintase cinase 3
GTP- trifosfato de guanosina
GPCR- receptores acoplados à proteína G
GPER – receptor de estrogênio acoplado à proteína G
HB-EGF- fator de crescimento epidermal ligado à heparina
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE - hematoxilina-eosina
HPB - hiperplasia prostática benigna
ICA – análise de correlação de intensidade
ICQ- quociente de correlação de intensidade
IDT – *Integrated DNA Technologies*
IP3- fosfatidil inositol 3
JNK – c-JUN N-terminal cinase
kDa - Quilo-Dalton
LaBiMET - Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral
LBD - domínio de ligação do ligante
LRH-1- *Leishmania Heme Response-1*
LNCaP - *Lymph Node Carcinoma of the Prostate*
MAPK- proteínas cinases ativadas por mitógenos
MMP- metaloproteinases de matriz
mRNA - RNA Mensageiro
mTOR- mammalian target of rapamycin
NO – óxido nítrico
NR – receptores nucleares
PC3 - célula de câncer de próstata resistente aos androgênios
PCR – reação em cadeia da polimerase
PDM- produto das diferenças entre as médias
PI3K – fosfoinositol 3 cinase
PIP3- fosfoinositoltrifosfato
PLC- fosfolipase C
PSA - antígeno prostático específico
qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA - ácido ribonucleico
RTU - ressecção transuretral

SERM – modulador seletivo do receptor de estrogênio

SF-1 – *splicing factor 1*

SphK- esfingocinases

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

Src- Src proto-oncogene

SRF – fator responsivo sérico

SYBr - Corante Sybr Green I

Sumário

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS..... | 05 |
| LISTA DE TABELAS..... | 06 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 07 |
| RESUMO..... | 12 |
| ABSTRACT..... | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 HIPÓTESE..... | 35 |
| 3 OBJETIVOS..... | 35 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 35 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 36 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 37 |
| 4.1 Delineamento do estudo..... | 37 |
| 4.2 População em estudo..... | 37 |
| 4.3 Cálculo Amostral..... | 38 |
| 4.4 Coleta das amostras..... | 38 |
| 4.5 Expressão gênica..... | 39 |
| 4.5.1 Extração de RNA..... | 39 |
| 4.5.2 Quantificação do RNA..... | 40 |
| 4.5.3 Síntese de cDNA..... | 41 |
| 4.5.4 Desenho dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>)..... | 42 |
| 4.5.5 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)..... | 43 |
| 4.5.6 Curva Padrão..... | 44 |
| 4.5.7 Normalização..... | 45 |
| 4.5.8 Protocolo geral da qPCR..... | 45 |
| 4.6 Western blot..... | 47 |
| 4.6.1 Extração de Proteínas..... | 47 |
| 4.6.2 Dosagem de proteínas..... | 47 |
| 4.6.3 Análise de proteínas..... | 48 |
| 4.7 Dosagem de estrogênio no tecido prostático..... | 50 |
| 4.7.1 Extração de hormônios esteróides no tecido prostático..... | 50 |
| 4.7.2 Dosagem do hormônio estradiol..... | 51 |
| 4.8 Localização dos receptores por imunofluorescência..... | 52 |
| 4.9 Análise estatística..... | 54 |
| 4.10 Aspectos Éticos..... | 55 |
| 4.11 Fontes de financiamento..... | 55 |
| 4.12. Infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho..... | 56 |
| 4.13 Disposição final de resíduos e biossegurança..... | 56 |
| 5 RESULTADOS..... | 57 |
| 5.1 Características dos Pacientes..... | 57 |
| 5.2 Expressão gênica do GPER..... | 58 |
| 5.3 Expressão proteica do GPER..... | 59 |
| 5.4. Localização do GPER no tecido prostático..... | 60 |
| 5.5 Ativação da ERK1/2..... | 63 |
| 5.6 Ativação da proteína p38 α | 64 |
| 5.7 Ativação da proteína JNK1/2..... | 65 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5.8 | Expressão proteica da c-JUN..... | 66 |
| 5.9 | Dosagem do hormônio estradiol..... | 67 |
| 5.10 | Expressão gênica do ER α | 68 |
| 5.11 | Expressão proteica do ER α | 69 |
| 5.12 | Localização do ER α no tecido prostático | 70 |
| 5.13 | Expressão proteica da PI3K..... | 73 |
| 5.14 | Ativação da AKT | 74 |
| 5.15 | Ativação da GSK3 β | 75 |
| 5.16 | Expressão proteica da mTOR..... | 76 |
| 5.17 | Expressão gênica do ER β total..... | 77 |
| 5.18 | Expressão proteica do ER β total..... | 78 |
| 5.19 | Expressão gênica do ER β 1 e ER β 6 | 79 |
| 5.20 | Expressão gênica do ER β 2 | 80 |
| 5.21 | Expressão gênica das isoformas ER β 3 e ER β 4 | 81 |
| 5.22 | Expressão gênica da isoforma ER β 5 | 81 |
| 5.23 | Correlação no câncer de próstata..... | 82 |
| 6 | DISCUSSÃO | 85 |
| 7 | CONCLUSÕES | 102 |
| 8 | PERSPECTIVAS | 103 |
| 9 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 103 |
| | ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 114 |
| | ANEXO B - Alinhamento das isoformas e localização dos <i>primers</i> | 116 |
| | ANEXO C - Artigo nº 1 | 127 |
| | ANEXO D – Artigo nº 2..... | 147 |

RESUMO

Em homens, com o avanço da idade ocorre declínio dos níveis plasmáticos de androgênios, enquanto os níveis de estrogênio permanecem constantes ou aumentados. Isto leva à diminuição da razão androgênio/estrogênio, sugerindo que os estrogênios podem ter um papel no desenvolvimento do câncer de próstata. Os estrogênios estão relacionados à indução da proliferação celular através da sua ligação aos receptores clássicos (ERs) e ao receptor não clássico GPER. Ambos receptores podem ativar as vias de sinalização PI3K e MAPK relacionadas à sobrevivência celular e ter importância no desenvolvimento do câncer de próstata (CaP) e da hiperplasia prostática benigna (HPB).

Objetivo: Avaliar a relação dos receptores de estrogênio GPER, ER α , ER β e suas isoformas com as vias PI3K e MAPK pela análise da expressão gênica e proteica dos receptores de estrogênio ER α , ER β e GPER, pela análise da expressão de proteínas da via MAPK e PI3K e do estrogênio tecidual nos grupos HPB e CaP.

Métodos: Tecidos prostáticos provenientes de CaP e de HPB foram submetidos à extração de RNA, o RNA foi reversamente transcrito para cDNA e avaliado usando q-PCR para a expressão dos receptores de estrogênio GPER, ER α , ER β e suas isoformas. A expressão proteica de GPER, ER α , ER β , mTOR, PI3K e c-JUN e a ativação da p38 α , ERK1/2, JNK, AKT e GSK3 β foram analisadas por Western blot. A técnica de imunofluorescência foi utilizada para verificação da colocalização dos receptores GPER e ER α em estroma e epitélio de HPB e CaP. **Resultados:** Comparações entre os tecidos hiperplásico e de carcinoma indicaram uma maior expressão gênica e proteica de ER α e GPER em amostras de CaP comparadas à HPB. Além disso, a ativação da AKT, GSK3 β e JNK e a expressão proteica da PI3K e c-JUN foram significativamente aumentadas nos tecidos de CaP enquanto que a expressão proteica de mTOR e a ativação de p38 α e ERK estão diminuídas neste grupo. A expressão gênica do ER β está aumentada no CaP porém não há diferença na expressão proteica entre os grupos. A análise da expressão gênica das isoformas do ER β mostrou diminuição de ER β 1 e ER β 6 e aumento das isoformas ER β 2 e ER β 5 no CaP. Não foram detectadas as expressões das isoformas ER β 3 e ER β 4 em ambos os grupos. Nossos resultados também mostraram que os receptores GPER e ER α estão colocalizados no núcleo de células estromais de HPB e CaP. Além disso, o GPER está expresso com maior intensidade no epitélio de ambos os grupos enquanto o ER α está expresso com maior intensidade no estroma

do CaP. A medida do estrogênio tecidual mostrou aumento deste no tecido de CaP em relação ao de HPB.

Conclusões: O presente estudo mostrou aumento do estrogênio e de seus receptores ER α e GPER no CaP em relação ao HPB indicando que há modulação estrogênica na próstata. Além disso, proteínas das vias MAPK e PI3K que podem ser moduladas pela ação estrogênica estão expressas de maneiras diferentes em ambos os grupos. O estudo da ação estrogênica parece ser importante para o entendimento da progressão das doenças prostáticas.

Palavras-chave: receptores de estrogênio, vias de sinalização, MAPK, PI3K, próstata.

ABSTRACT

In men with advancing age decline in plasma levels of androgens occurs while estrogen levels remain constant or increased. This leads to the decrease of the androgen / estrogen, suggesting that estrogens may play a role in the development of prostate cancer. Estrogens are related to the induction of cell proliferation by binding to classical receptors (ERs) and non-classical receptor GPER. Both receptors can activate signaling pathways PI3K and MAPK related to cell survival and have importance in the development of prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH).

Objective: To evaluate the relationship of estrogen receptors GPER, ER α , ER β with the PI3K and MAPK pathways was performed analysis of gene and protein expression of ER α , ER β and GPER, analysis of protein expression to MAPK and PI3K pathways and tissue estrogen in PCa and BPH groups.

Methods: Prostatic tissues from PCa and BPH underwent RNA extraction, RNA was reverse transcribed to cDNA and evaluated using q-PCR for the expression of estrogen receptors GPER, ER α , ER β and their isoforms. Protein expression of GPER, ER α , ER β , mTOR, PI3K and c-JUN and activation of p38 α , ERK1/2, JNK, AKT and GSK3 β were analyzed by Western blot. The immunofluorescence technique was used to verify the colocalization of GPER and ER α receptors in epithelium and stroma of BPH and PCa.

Results: Comparisons between the hyperplastic tissue and carcinoma showed a higher gene and protein expression of ER α and GPER in samples of CaP compared to BPH. Furthermore, activation of AKT and GSK3 β and JNK protein expression of PI3K and c-JUN were significantly increased in CaP tissues while mTOR protein expression and ERK activation p38 α and are decreased in this group. ER β gene expression is increased in PCa but there is no difference in protein expression between the groups. The analysis of gene expression of ER β isoforms showed decreased ER β 1 and ER β 6 and increased isoforms ER β 2 and ER β 5 in CaP. Expressions were not detected isoforms and ER β 3 ER β 4 in both groups. Our results also showed that the GPER and ER α receptors are positively colocalized in nucleus of stromal cells of BPH and PCa. In addition, the GPER is expressed more intensely in the epithelium of both groups while ER α is expressed with greater intensity in the stroma of PCa. The extent of this tissue revealed increased estrogen in PCa tissue compared to BPH.

Conclusions: The present study showed an increase of estrogen and its receptors ER α and GPER in CaP compared to BPH indicating that there is involvement modulation of estrogen

in the prostate. Moreover, proteins of MAPK and PI3K pathways can be modulated by estrogenic activity are expressed differently in both groups. The study of estrogen action appears to be important for understanding the progression of prostatic diseases.

Keywords: estrogen receptors, signaling pathways, MAPK, PI3K, prostate.

1 INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino. Ela circunda a uretra logo abaixo da bexiga urinária e é envolvida por uma cápsula espessa de tecido conjuntivo. A função da próstata é produzir o líquido prostático que é útil para a movimentação, nutrição e preservação dos espermatozoides (Marieb & Hoehn, 2009).

A próstata pode ser delimitada por três zonas distintas (Figura 1): a zona central que ocupa 25% do volume da glândula, a zona periférica que ocupa 70% da glândula e é o local principal onde se desenvolve o câncer prostático e a zona de transição, onde se originam a maioria das hiperplasias prostáticas benignas (Guess, 2001).

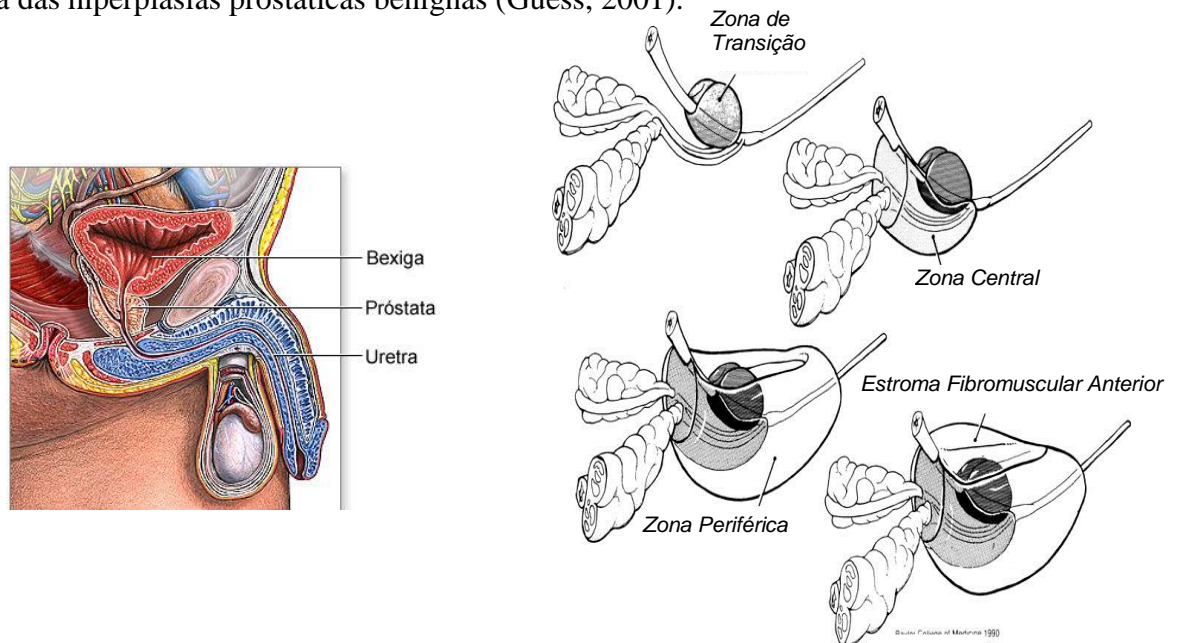


Figura 01. Localização e anatomia da próstata. (Adaptado de Baylor College Medicine, 1990).

A próstata é uma glândula túbulo alveolar composta de tecido epitelial e estromal. A proliferação epitelial estimulada por hormônios esteróides é regulada via seus receptores presentes nas células estromais. Esta regulação ocorre por interações parácrinas. Já tanto a

diferenciação quanto a função epitelial requer ações hormonais diretas mediadas por receptores presentes no epitélio (Cunha *et al.*, 2002). As interações parácrinas que ocorrem entre o estroma e o epitélio prostático têm sido relacionadas com o desenvolvimento da glândula prostática, com a hiperplasia prostática benigna e com o câncer de próstata (Li *et al.*, 2007; Niu & Xia, 2009).

A hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste no crescimento excessivo do tecido epitelial e fibromuscular da zona de transição da área periuretral da glândula prostática. A hiperplasia do estroma prostático e das células epiteliais resulta na formação de nódulos grandes e relativamente nítidos nesta região (Foster, 2000).

A HPB é uma alteração comum, principalmente, em homens com mais de 50 anos de idade. Evidências histológicas de hiperplasia prostática benigna podem ser observadas em aproximadamente 20% dos homens de 40 anos de idade e esse número aumenta para 70% aos 60 anos e para 90% aos 70 anos (Roehrborn, 2005).

Dados da Associação Européia de Urologia mostram que a hiperplasia prostática benigna possui prevalência semelhante à hipertensão e à diabetes na população com a mesma faixa etária (Curkendall *et al.*, 2000). Além disso, a Associação Americana de Urologia relata que aproximadamente, 50% dos homens entre 51 e 60 anos e 90% dos acima de 80 anos, desenvolvem hiperplasia prostática benigna (Urology Health, 2014).

Os sintomas da HPB, quando presentes, são decorrentes da compressão da uretra (dificultando a micção e ocasionando a retenção de urina na bexiga), distensão e hipertrofia da bexiga, infecção urinária, desenvolvimento de cistite e infecções renais (Lepor, 2004).

Estudos sugerem que a HPB pode ocorrer devido a um desequilíbrio entre os fatores associados com o crescimento e a morte celular (Iacopino *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Este desequilíbrio também está relacionado com outra doença prostática, o câncer de próstata.

O câncer de próstata (CaP), ou adenocarcinoma de próstata, é a segunda forma mais comum de câncer e a segunda maior causa de morte por câncer nos Estados Unidos no sexo masculino (American Cancer Society, 2014). A incidência do câncer de próstata está aumentando, possivelmente, devido à maior expectativa de vida dos homens (Grönberg, 2003) e pelo aperfeiçoamento nas técnicas diagnósticas, especialmente, com a análise do antígeno prostático específico (PSA) (Hankey *et al.*, 1999).

Em valores absolutos, o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres masculinos (Carruba, 2006).

No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum nos homens. O número de casos novos estimados no Brasil, para 2014, é de 68.800. Esses valores correspondem a uma incidência estimada de 70,42 casos novos de câncer de próstata a cada 100 mil homens (INCA, 2014). O Quadro 1 mostra a estimativa da incidência para 2014 de novos casos de câncer de próstata e de outros tipos de câncer no Rio Grande do Sul.

Pacientes com doença clinicamente localizada, geralmente não apresentam sintomas urinários e a lesão é descoberta pelo achado de um nódulo suspeito ao exame de toque retal ou por um nível elevado de PSA. A maioria dos cânceres de próstata se localiza periféricamente, distante da uretra, o que leva aos sintomas urinários ocorrerem tardiamente (Cotran *et al.*, 2005).

Quadro 01. Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo a localização primária no Rio Grande do Sul (Adaptado de INCA, 2014).

| Localização Primária da Neoplasia Maligna | Homens | | | |
|---|---------------|---------------|--------------|---------------|
| | Estado | | Capital | |
| | Casos | Taxa Bruta | Casos | Taxa Bruta |
| Próstata | 5.740 | 105,70 | 910 | 133,04 |
| Mama Feminina | - | - | - | - |
| Colo do Útero | - | - | - | - |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 2.520 | 46,43 | 340 | 49,53 |
| Cólon e Reto | 1.390 | 25,61 | 390 | 57,16 |
| Estômago | 780 | 14,30 | 110 | 15,12 |
| Cavidade Oral | 840 | 15,49 | 90 | 13,21 |
| Laringe | 560 | 10,27 | 70 | 10,07 |
| Bexiga | 560 | 10,38 | 130 | 18,57 |
| Esôfago | 1.030 | 18,90 | 80 | 11,31 |
| Ovário | - | - | - | - |
| Linfoma de Hodgkin | 120 | 2,13 | 20 | 2,70 |
| Linfoma não Hodgkin | 480 | 8,88 | 130 | 18,56 |
| Glândula Tireoide | 220 | 4,07 | 30 | 3,86 |
| Sistema Nervoso Central | 530 | 9,69 | 60 | 8,56 |
| Leucemias | 510 | 9,33 | 80 | 11,63 |
| Corpo do Útero | - | - | - | - |
| Pele Melanoma | 410 | 7,42 | 70 | 10,30 |
| Outras Localizações | 4.660 | 85,76 | 710 | 103,98 |
| Subtotal | 20.350 | 374,41 | 3.220 | 471,66 |
| Pele não Melanoma | 8.670 | 159,59 | 350 | 50,65 |
| Todas as Neoplasias | 29.020 | 533,92 | 3.570 | 522,92 |

Pouco se sabe sobre as causas do câncer de próstata. Todavia, vários fatores de risco estão envolvidos, tais como: etnia, idade, história familiar, influências ambientais e níveis hormonais (Yip *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2003; Grönberg, 2003; Nelson *et al.*, 2003).

O crescimento da próstata é classicamente associado à ação de androgênios via receptores de androgênio (Leav *et al.*, 2001; Djavan *et al.*, 2002; Bauman *et al.*, 2006). A ação androgênica pode ser inibida ou potencializada pelos estrogênios, porém o mecanismo desse efeito aparentemente oposto, não está completamente elucidado (Zhu *et al.*; 2005; Bauman *et al.*, 2006). Os hormônios androgênios e os estrogênios parecem estar relacionados

com a estimulação da proliferação de células em culturas de câncer de próstata, através de efeitos mediados por receptores (Bonkhoff *et al.*, 1999).

O câncer de próstata é reconhecido como um tumor dependente de androgênios e relacionado com a idade. Entretanto, existem evidências de que a testosterona sérica declina significativamente com a idade, levando a uma associação inversa entre a testosterona circulante e o risco de desenvolvimento do câncer de próstata. A homeostase dos níveis sistêmicos de androgênios e estrogênios é alterada significativamente com a idade nos homens. Ocorre declínio dos níveis plasmáticos de androgênios, enquanto os níveis de estrogênio permanecem relativamente constantes ou aumentados. Isto leva à diminuição da razão androgênio/estrogênio com a idade, sugerindo que os estrogênios podem também ter um papel no desenvolvimento do câncer de próstata (Carruba, 2006).

Os estrogênios fazem parte de um grupo de compostos esteróides que são os principais hormônios sexuais femininos. Pequenas quantidades de estrogênios são sintetizadas em indivíduos do sexo masculino (cerca de um quinto da quantidade sintetizada por mulheres não-grávidas). O 17β -estradiol (E2) é produzido nos tecidos periféricos e levado via plasma até o sistema reprodutor masculino. Ele também é sintetizado nas células de Leydig e nas células de Sertori pela enzima aromatase que transforma irreversivelmente androgênios em estrogênios (Hess, 2003; Carreau *et al.*, 2003). Regiões do SNC, tecido adiposo, tecido ósseo e próstata também são ricos em aromatase e produzem estradiol (Aires, 2012). O papel dos estrogênios no desenvolvimento e fisiologia do sistema reprodutor masculino continua em discussão, porém sabe-se que sua ação depende da distribuição de seus receptores nos tecidos (Carreau *et al.*, 2003).

A atividade estrogênica é mediada pela interação entre os receptores de estrogênio (ERs) e o hormônio, com a subsequente ativação dos receptores. Além disso, o 17β -estradiol representa outro importante ligante natural para os receptores de androgênio (AR) e pode ter

um papel essencial na função do AR e no desenvolvimento do sistema reprodutivo masculino (Yeh *et al.*, 1998). Já foi demonstrado o efeito direto do estrogênio, por mediação através dos seus receptores, em alvos moleculares específicos em cultura de células humanas de câncer de próstata (Takahashi *et al.*, 2007).

Os estrogênios têm influência sobre processos patológicos de cânceres considerados dependentes de hormônio como o de mama, endométrio, próstata, ovário e tireóide (Carruba, 2006). Alterações patológicas da próstata também estão sendo relacionadas com os estrogênios. Tem sido demonstrado, em diferentes espécies, que os estrogênios em sinergismo com os androgênios, induzem a hiperplasia glandular, a displasia e o câncer de próstata (Nilsson & Gustafsson, 2000).

Os estrogênios provavelmente possuem uma função dupla no desenvolvimento do câncer de próstata. Sua eficiência terapêutica está amplamente relacionada ao seu efeito supressivo da liberação de gonadotrofinas pela hipófise, reduzindo, desta forma, a produção dos androgênios testiculares. Por outro lado, é sugerida a participação dos estrogênios no crescimento neoplásico prostático através de um processo mediado por receptores (Bonkhoff *et al.*, 1999).

Os estrogênios induzem mudanças celulares através de diferentes mecanismos. No mecanismo “clássico” de ação do estrogênio, este se difunde para dentro da célula e se liga ao ER localizado no núcleo. Este complexo nuclear estrogênio-ER liga-se aos elementos responsivos ao estrogênio, direta ou indiretamente, através de interações proteína-proteína com a proteína ativadora 1 (AP1) ou em locais SP1 nas regiões promotoras de genes responsivos ao estrogênio. Esse processo resulta no recrutamento de proteínas correguladoras (co-ativadoras ou correpressoras) da transcrição gênica para promover a resposta fisiológica (através do aumento ou diminuição dos níveis de mRNA associados à produção de proteínas). Esse mecanismo ocorre dentro de algumas horas (Deroo & Korach, 2006).

Outro mecanismo de ação dos estrogênios, em que os mesmos podem agir mais rapidamente (dentro de segundos ou minutos), é o chamado mecanismo “não-clássico”. A ação ocorre através do ER localizado na membrana plasmática ou no citoplasma resultando em respostas celulares a partir da ativação de vias intracelulares tais como o aumento dos níveis de Ca^{2+} ou de óxido nítrico (NO) e a ativação de cinases (Deroo & Korach, 2006).

Os mecanismos de ação dos hormônios estrogênicos estão esquematizados na Figura 02.

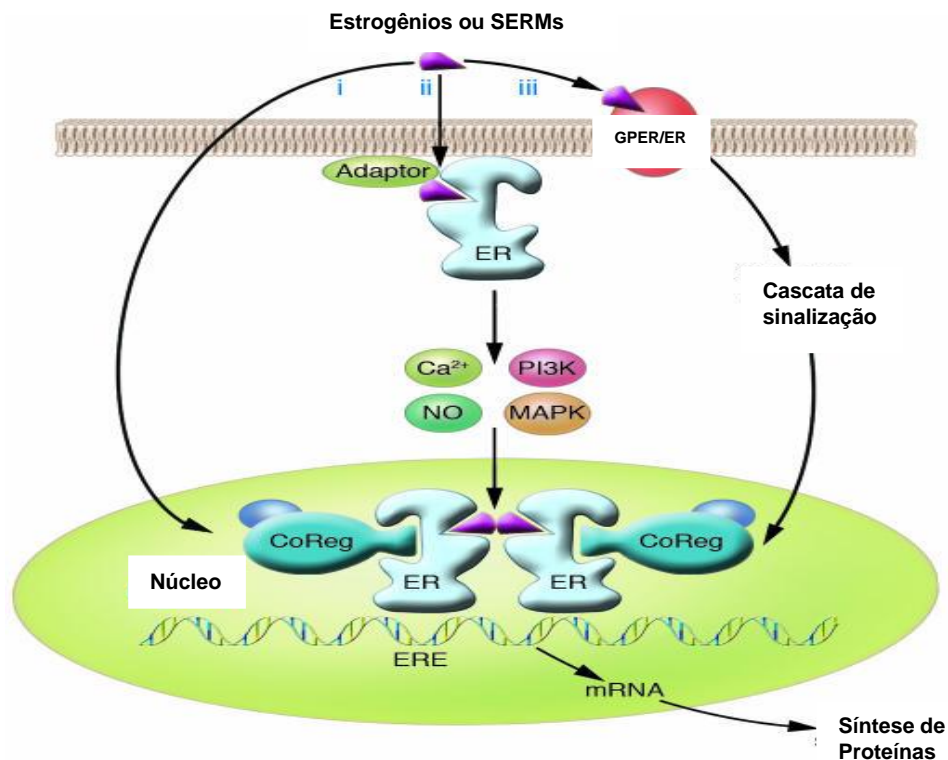


Figura 02. Mecanismos de ação dos estrogênios (Adaptada de Deroo & Korach, 2006).

ER – receptor de estrogênio; CoReg – corregulador; ERE – elemento responsivo ao estrogênio.

A Figura 3 apresenta mecanismos distintos utilizados na ativação de receptores de estrogênio (ERs). Na via de ativação direta, os ERs dimerizam após a ligação ao ligante e se ligam ao ERE no promotor de genes-alvo, induzindo a sua ativação. No modo de ativação indireta, dímeros de ER ligados ao ligante podem ativar a transcrição de genes promotores não-ERE, ligando-se a outros fatores de transcrição (por exemplo, SP1). No modo de ativação

genômico, ERs ligados ao ligante podem interagir diretamente com proteínas e alterar a função destas proteínas, algumas das quais funcionam como segundos mensageiros. Nessas interações, o ER não age como fator de transcrição. ERs também podem ser ativados por fosforilação na ausência de ligantes de ER (ativação independente de ligante). Nesta via, a transcrição mediada por ER é induzida pela ativação de cinases de vias de sinalização de fatores de crescimento (Morani *et al.*, 2008).

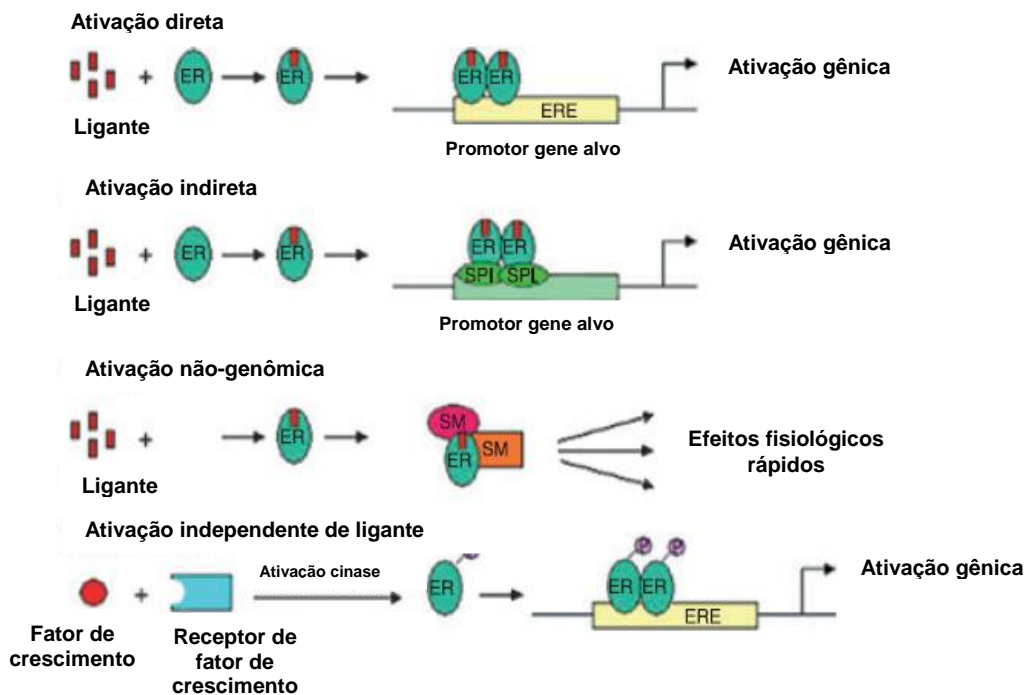


Figura 03. Modelos de ativação dos receptores de estrogênio (Adaptado de Morani *et al.*, 2008). ER -receptor de estrogênio; ERE –elemento responsivo ao estrogênio; SM -2º mensageiro.

Foram descritos dois receptores de estrogênio clássicos, o receptor de estrogênio α (ER α) e o receptor de estrogênio β (ER β). Embora ambos os receptores tenham igual afinidade de ligação com o 17 β -estradiol, outras substâncias, como fitoestrogênios e

moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), podem se ligar ao ER α e ao ER β seletivamente (Signoretti & Loda, 2001).

O ER α e o ER β são codificados por genes separados, *Esr1* e *Esr2*, respectivamente, que são encontrados em diferentes cromossomos. O gene para o ER α está localizado no locus cromossomal 6q25.1 e para o ER β está na posição 14q22-24 (Koehler *et al.*, 2005).

O ER α e o ER β são classificados como receptores nucleares do tipo I. Essa classificação deve-se ao fato de que ambos são encontrados no citosol e fazem translocação nuclear depois da ligação com o ligante formando homodímeros ou heterodímeros e ligam-se a elementos responsivos de mesma origem. Quando inativos, os ERs existem como monômeros ligados a proteínas de choque térmico (Leung *et al.*, 2006). A sinalização é dependente da ligação ao estrogênio e começa com a ligação deste ao receptor. No entanto, a resposta transcricional celular específica ao estrogênio depende de múltiplos fatores. O fator mais imediato é a composição de proteínas correguladoras em uma determinada célula e as características de promotores de genes responsivos ao estrogênio. Mesmo que os hormônios sejam moduladores da transcrição, o padrão de modulação de genes depende também de outras vias sinalizadoras que estejam ativas na célula no momento da exposição ao hormônio (Heldring *et al.*, 2007).

A definição clássica de que os ERs estão presentes somente no citoplasma mudou já que foi demonstrado que os receptores ER α e ER β também podem estar localizados na membrana plasmática através de três mecanismos: associação com a caveolina-1, interação com receptores de membrana (IGF-1R) e modificação pós-translacional do receptor com ácido palmítico (Acconcia & Marino, 2011).

O ER β parece agir como regulador da sinalização estrogênica e quando co-expressado com o ER α (formando um heterodímero), o ER β causa uma redução dependente da concentração na ativação transcricional mediada pelo ER α . Vários grupos têm demonstrado

que ER α e ER β formam heterodímeros funcionais *in vitro* e *in vivo* e que se ambas as isoformas são expressas, os heterodímeros predominam. O papel dos heterodímeros na sinalização estrogênica, especialmente na mediação do efeito antagônico do ER β sobre a atividade transcricional do ER α é ainda pouco estudado (Matthews & Gustafsson, 2003).

Na próstata, Bonkhoff e Fixemer (2005) observaram que o compartimento de diferenciação do epitélio prostático (células luminais secretoras) expressa altos níveis de ER β , enquanto o ER α é restrito ao compartimento de proliferação (células basais). Em altos graus de neoplasia intraepitelial prostática, a expressão do gene ER α se estende às células luminais e isso pode mediar os efeitos carcinogênicos dos estrogênios no epitélio displásico. Independentemente do grau e do estágio, o câncer de próstata mantém altos níveis de ER β . Porém, o ER β é parcialmente perdido nos estágios da doença insensíveis aos androgênios. As funções propostas para o ER β incluem ação anti-proliferativa, regulação da apoptose celular, controle genético da expressão antioxidante, modulação da resposta imune e do risco de insuficiência cardíaca (Imamov *et al.*, 2005).

O efeito do estradiol em linhagens celulares de próstata parece ser dependente do tipo de receptor de estrogênio expresso (Koehler *et al.*, 2005). Em linhagens celulares de próstata, o 17 β -estradiol na presença do ER α estimula a proliferação, mas na presença do ER β inibe a proliferação, causando dois efeitos opostos. O ER β parece ter um papel protetor contra a proliferação descontrolada de células e é perdido durante a progressão do câncer de próstata, sugerindo o seu envolvimento direto com a proliferação do tumor (Pravenotti *et al.*, 2007). O mecanismo molecular em que se baseia esse efeito não está bem esclarecido. Entretanto, a re-expressão do ER β ocorreu em todos os casos de cânceres de próstata com metástases, estudados por Ho e colaboradores (2006), sugerindo que as células de CaP que continuam expressando o ER β podem ter um potencial maior para se estabelecer em locais distantes da próstata.

Vários dados da literatura indicam que as isoformas do ER β podem modular de forma diferente a sinalização estrogênica e, como consequência, influenciar os alvos de regulação do gene (Matthews & Gustafsson, 2003; Leung *et al.*, 2006). Os receptores de estrogênio existem como processamentos alternativos de pré-mRNA (*splicing*), os quais originam as isoformas desses receptores. Os processamentos alternativos podem ser gerados por duplicação do éxon, inserção de material genético adicional ou mutações somáticas que levam a códons finalizadores alterados e/ou inclusão de material intrônico. Comparados com o receptor original, os diferentes produtos de processamento alternativo diferem nas ações que eles participam como consequência da ausência ou configuração diferente dos vários domínios do receptor, conforme esquematizado na Figura 04 (Taylor *et al.*, 2010).

Já foi demonstrado que ER β -1 é a única isoforma inteiramente funcional, enquanto que ER β -2, ER β -4 e ER β -5, na forma de seus homodímeros, não possuem nenhuma atividade inata própria. Entretanto, as isoformas podem heterodimerizar com ER β -1 e aumentar sua transativação de um modo dependente do ligante. O ER β -1 tende a heterodimerizar, particularmente com ER β -4 e ER β -5. Para um complexo dimérico funcional, o ER β 1 é um componente obrigatório enquanto ER β 2, ER β 4 ou ER β 5 servem como componentes variáveis potenciadores. Este modelo difere do paradigma original em que os dois componentes do dímero de receptores nucleares possuem papel idêntico na ligação ao ligante e no recrutamento de coativadores, sugerindo que o heterodímero ER β pode recrutar apenas um coativador durante a ativação transcricional (Leung *et al.*, 2006).

Foi observado que cada tecido ou linhagem celular tem um único padrão e/ou razão de expressão entre ER β -1 e as outras isoformas. Esses achados sugerem que há formação de diferentes grupos de heterodímeros em um tecido específico ou tipo celular, levando a uma ampla variedade de efeitos biológicos (Leung *et al.*, 2006).

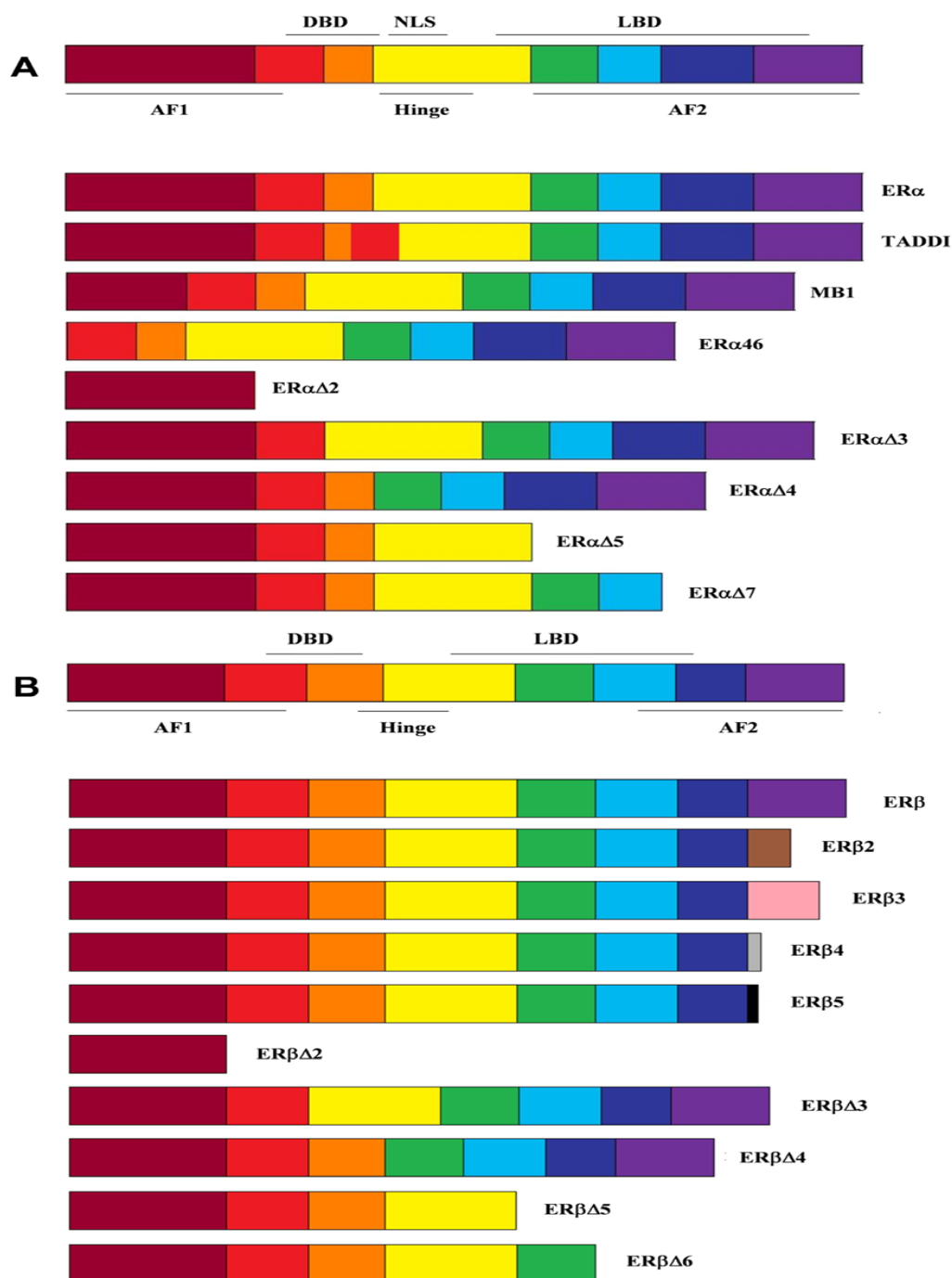


Figura 04. Isoformas dos receptores de estrogênio ER α em A e ER β em B (Adaptada de Taylor *et al.*, 2010).

Na próstata normal e em células de cultura da linhagem PC3 (células de câncer de próstata resistente aos androgênios) foi detectada a expressão gênica das isoformas ER β 1, ER β 2 e ER β 5 enquanto que em células de cultura da linhagem LNCaP (células de câncer de

próstata responsivas aos androgênios) foi detectada predominantemente a expressão da isoforma ER β 5 (Moore *et al.*, 1998).

As diferentes atividades biológicas do ER α e do ER β podem ser atribuídas a vários fatores que precisam ser cuidadosamente estudados no carcinoma de próstata. Esses fatores incluem o recrutamento de diferentes coativadores e correpressores que modificam a transcrição, a homodimerização e a heterodimerização desses receptores. Devido ao fato que a heterodimerização pode ocorrer apenas em células que co-expressem esses receptores, a avaliação da expressão dos ERs tornou-se muito importante. Pouco se sabe sobre a expressão gênica das isoformas do receptor de estrogênio ER β (ER β 1, ER β 2, ER β 3, ER β 4, ER β 5 e ER β 6) no tecido prostático e em suas alterações, sendo o estudo dessas isoformas necessário.

Além da sua ação como fatores de transcrição, os receptores ER α e ER β , quando presentes na membrana plasmática, podem estimular a transdução de sinal rápida não-clássica através da ativação de cinases ou indução do influxo de cálcio. Os estrogênios também podem exercer esta ação através do GPER (Ho *et al.*, 2011).

O GPER (receptor de estrogênio acoplado à proteína G), anteriormente descrito como GPR30, é um membro da família dos receptores das proteínas transmembrana (7TM) acoplados à proteína G (GPCR) considerado capaz de mediar tanto os efeitos rápidos quanto os transcricionais em resposta aos estrogênios (Couse & Korach, 1999). O GPER foi identificado na membrana celular e no retículo endoplasmático de diferentes linhagens celulares e tecidos sensíveis ao estrogênio (Ho *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado acúmulo de GPER no espaço perinuclear em tecido de câncer de mama (Cheng *et al.*, 2011).

A proteína G é formada por um nucleotídeo de guanina ligado a uma subunidade α e a um dímero de subunidade $\beta\gamma$. No estado inativo, a subunidade α liga a uma molécula de GDP. O receptor ligando com um agonista induz uma mudança conformacional na subunidade α da proteína G, levando a uma troca de GDP por GTP e à dissociação da subunidade α do dímero

$\beta\gamma$. As proteínas G envolvidas na sinalização mediada pelo GPER são a $G\beta\gamma$ e a *Gas*. A primeira estaria relacionada à ativação de tirosina cinases relacionadas à Src que estão envolvidas na ativação da via de transdução MAPK e a segunda seria responsável pela estimulação da adenilato ciclase e o subsequente aumento no AMPc (Maggiolini & Picard, 2010).

Filardo e colaboradores (2000) demonstraram que o GPER está envolvido na ativação mediada pelos estrogênios da ERK1/2 (uma MAPK), em células com ausência de ERs clássicos nucleares. A ativação celular pelo GPER ocorreria através de um mecanismo envolvendo a transativação dos receptores de fatores de crescimento epidermal (EGFRs) por uma via dependente da proteína G.

Poucos estudos existem sobre a ação do GPER na próstata. A expressão da proteína GPER tem sido observada em várias linhagens celulares de câncer, como por exemplo, de mama, endométrio, ovário e tireóide (Filardo *et al.*, 2000; Revankar *et al.*, 2005; Albanito *et al.*, 2007; Vivacqua *et al.*, 2006). Alguns estudos demonstraram que a proliferação celular mediada pelos estrogênios pode ser dependente do GPER, levantando a questão do papel deste receptor na carcinogênese (Vivacqua *et al.*, 2006a; Vivacqua *et al.*, 2006b). Além disso, o aumento da expressão do GPER pode estar associado com a agressividade do câncer de mama pela ativação das vias de sinalização Src e EGFR (Filardo *et al.*, 2006).

A interação entre as vias do ER e GPER, após o estímulo pelo estrogênio, é esquematizada na Figura 05.

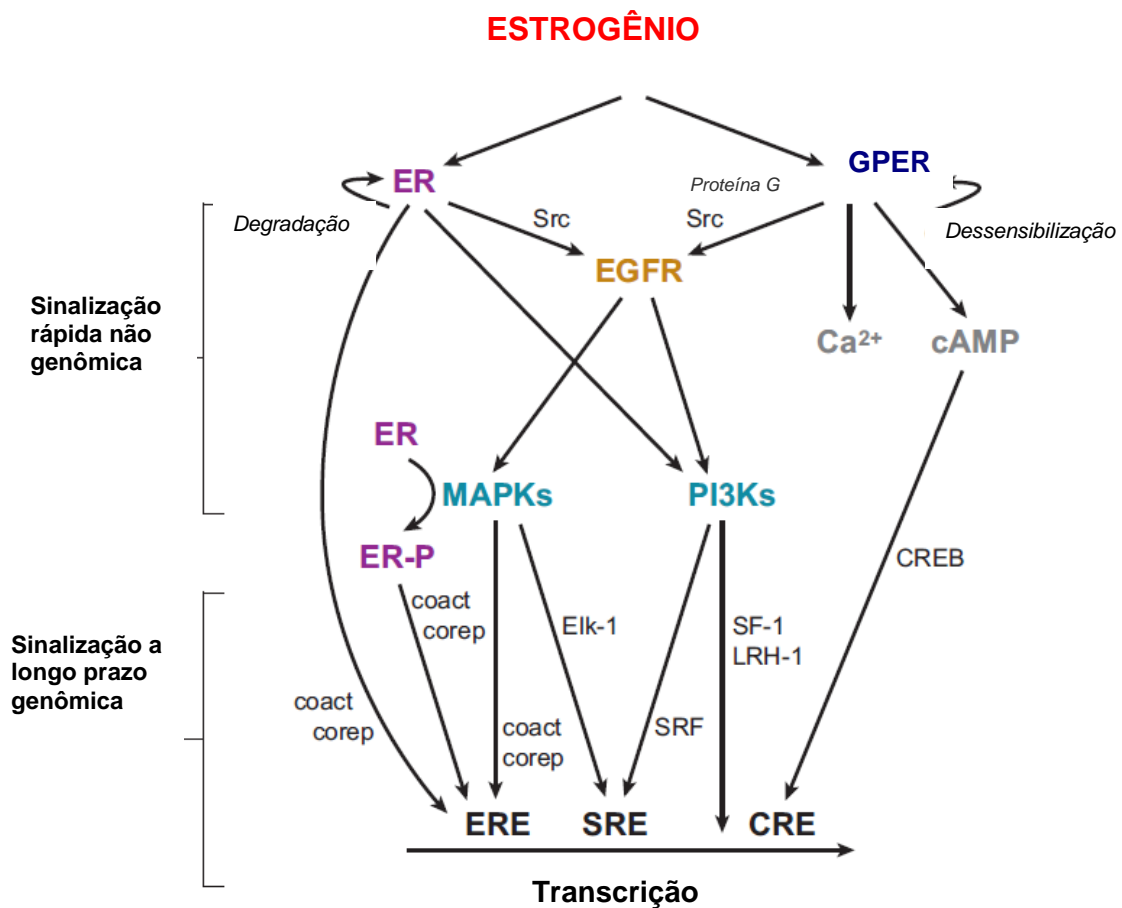


Figura 05. Interação entre a sinalização rápida e a genômica mediadas pelos estrogênios através dos receptores de estrogênio clássicos (ER) e do GPER (Adaptado de Prossnitz *et al.*, 2008). ER – receptor de estrogênio; coact –co-ativadores; corep –corepressores; SF-1 – *splicing factor 1*; SRF– fator responsivo sérico; Src – Src proto-oncogene; LHR-1 – Leishmania heme response-1; ERE – elemento responsivo ao estrogênio; SRE – elemento responsivo sérico; CRE – elemento responsivo ao AMPc; CREB – proteínas ligadoras aos elementos responsivos ao AMPc.

A célula é livremente permeável ao estrogênio o que facilita o acesso deste aos receptores de estrogênio intracelulares (ER e GPER). Nas células que podem expressar na superfície celular GPER ou ER, o estrogênio não precisa atravessar a membrana plasmática. A ligação do estrogênio ao receptor de estrogênio clássico (ER) leva diretamente à ativação da transcrição e a eventos de transdução de sinal. A ligação do estrogênio com o GPER ativa proteínas G heterotriméricas que podem ativar múltiplos efetores, incluindo a adenil ciclase (resultando na produção do AMPc), Src e esfingocinases (SphK). A duas últimas vias

parecem estar envolvidas na ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs), que clivam o pro-HB-EGF, liberando HB-EGF livre que pode então transativar os receptores de fatores de crescimento epidermais (EGFRs). A ativação do EGFR leva a múltiplos eventos em cascata, incluindo a ativação da fosfolipase C (PLC), proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fosfatidilinositol 3-cinases (PI3Ks). Tanto os ERs quanto o GPER podem ativar proteínas cinases celulares que podem levar à fosforilação dos ERs diretamente, sem a ação dos estrogênios. A ativação das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e/ou fosfatidilinositol-3-cinases (PI3Ks) também resultam na fosforilação e ativação de fatores de transcrição que atuam no elemento responsivo sérico (SER). A produção de PIP3 pela PI3Ks pode também levar à ativação de outros membros da família de receptores nucleares (SF-1 e LHR-1). Além disso, o GPER pode aumentar a produção de AMPc ativando a proteína ligadora ao elemento responsivo do AMP cíclico (CREB). Assim, a estimulação pelo estrogênio pode levar à transcrição de genes-alvo cujos promotores não contenham elementos responsivos aos esteróides. O efeito combinado da sinalização citosólica e dos eventos de transcrição nuclear frequentemente resultam na proliferação celular. Além disso, tanto os ERs quanto o GPER são sujeitos a processos regulatórios. A ligação do ER ao ligante inicia a consequente degradação do receptor, enquanto que muitos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são sujeitos a mecanismos de dessensibilização (ligação dos resíduos fosforilados do receptor à proteína arrestina que promove a endocitose do receptor). Todas as vias (MAPK e PI3K) mostram um potencial de interação com os receptores de estrogênio, tanto positivamente quanto negativamente, e complexidade (Prossnitz *et al.*, 2008).

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são serina/treonina cinases que participam da sinalização intracelular estando associadas com várias atividades celulares tais como proliferação, diferenciação, sobrevivência, morte e transformação celulares. Os três principais membros da família MAPK são a JNK (c-Jun NH₂-terminal cinase), a p38 ou

SAPK2 (proteína cinase 2 ativada por estresse) e a ERK1/2 (cinase regulada por sinal extracelular). A ERK1/2 é geralmente associada com a mitogênese e inversamente relacionada com a apoptose enquanto a JNK e a p38 apresentam efeitos contraditórios na morte celular. O papel das MAPKs na morte/sobrevivência/proliferação celular depende do tipo celular, do estágio e do estímulo celular (Maroni *et al.*, 2004).

Alguns estudos realizados na próstata mostraram que a ativação das MAPKs pelos receptores de estrogênio depende do tipo celular. O efeito proliferativo dos estrogênios em células estromais de próstata (linhagem celular e cultura primária de HPB) foi relacionado com ativação da via da ERK através do receptor ER α e não pelo GPER (Zhang *et al.*, 2008). Entretanto, no estudo de linhagens celulares de CaP e HPB, Chan e colaboradores (2010) mostraram que a ativação do GPER inibe o crescimento das células de CaP através da ativação sustentada da ERK1/2 e da regulação da via c-jun/c-fos dependente do p21, resultando na interrupção do ciclo celular em G2. Este resultado sugere que a ativação do GPER pode inibir o crescimento celular na próstata, em contraste com outros estudos que mostraram a ação do GPER na estimulação do crescimento de linhagens celulares de mama e ovário. Os estudos citados acima são contraditórios quanto à presença do GPER na HPB. A Figura 06 representa esquematicamente as proteínas MAPKs estudadas neste trabalho.

Enquanto a via MAPK é relacionada à proliferação e diferenciação celular a via PI3K (PI3K/AKT/mTOR) é bem caracterizada pelo seu papel na sobrevivência celular. Na Figura 07, está representada a via da PI3K. As PI3Ks são enzimas envolvidas na fosforilação do lípido de membrana inositol, mediando a transdução celular de sinal. A ativação da PI3K por receptores tirosina cinase (RTKs) ou não-RTKs, gera um segundo mensageiro o PIP3 (fosfatidilinositol 3,5 trifosfato) a partir do PIP2 (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato). O PIP3 recruta a AKT/PKB (proteína cinase B) e a PDK1; a AKT é fosforilada e ativada pela PDK1 na Treonina 308 e pela PDK2(mTORC2) na serina 473. A AKT fosforila e ativa o mTORC1,

uma proteína cinase chave na regulação da síntese e translação de proteínas, angiogênese e progressão do ciclo celular (Sarker *et al.*, 2009).

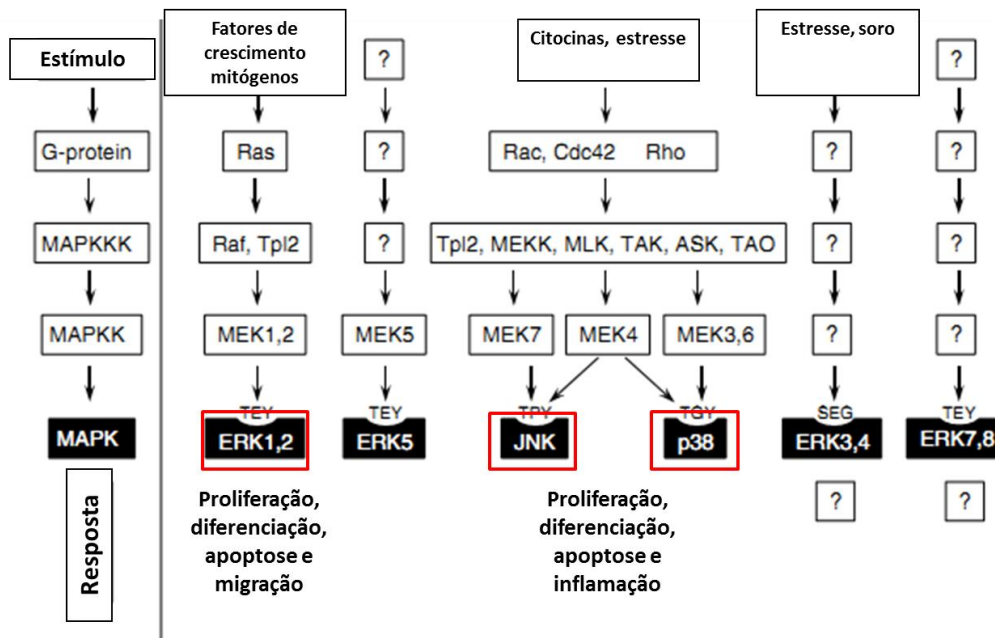


Figura 06. Proteínas MAPKs (Adaptado de Dhillon *et al.*, 2007).

A mTOR é um componente de dois distintos complexos chamados mTORC1 e mTORC2. Os complexos são distinguidos através da ligação da mTOR com proteínas acessórias, a proteína Raptor encontrada na mTORC1 e a proteína Rictor encontrada na mTORC2. A mTORC1 é regulada através da ação da AKT sobre proteínas inibidoras do complexo mTORC1 (PRAS40 e TSC) e seus substratos são as S6 quinases S6K1 e S6K2 e as proteínas 4E-BP1 e 4E-BP2 que regulam vários aspectos da translocação do mRNA. A regulação da mTORC2 é mediada através da sinalização de fatores de crescimento e seus efetores incluem a AKT, a PKC e a SGK. Para a ativação total da AKT é necessária a fosforilação da Ser473 pela mTORC2 e a fosforilação da Thr308 pela PDK1. A mTORC2 também está relacionada com a inativação indireta da GSK3β através da ativação da AKT (fosforila a GSK3β inativando-a). Há um mecanismo de retroalimentação para manter o

balanço entre a atividade da mTORC1 e mTORC2 e indiretamente regular a atividade da AKT. A via AKT/mTOR é conhecida por facilitar a sobrevivência e proteger contra a apoptose. O papel da AKT regulando a sinalização na apoptose e o papel da mTOR na autofagia são decisivos para a sobrevivência e morte celular (Altomare & Khaled, 2012).

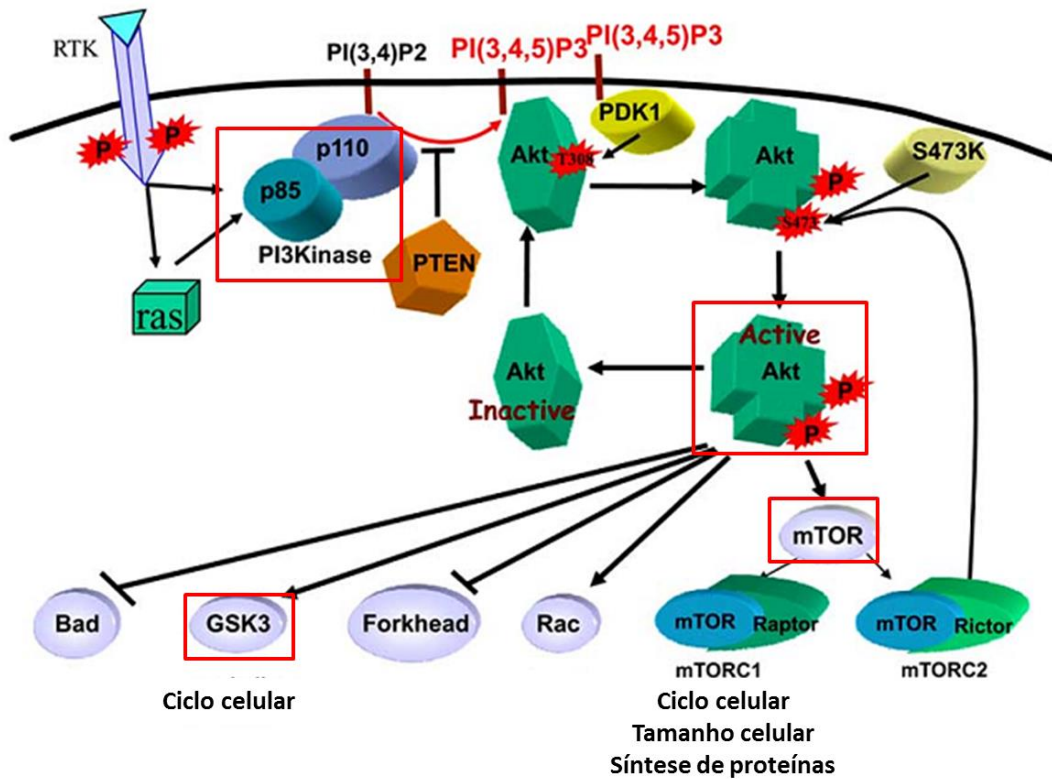


Figura 07. Via da PI3K (Adaptado de Carnero, 2010).

Considerando que:

- (1) as vias MAPK e PI3K estão relacionadas com o crescimento e/ou morte celular;
- (2) estas vias podem ser moduladas pelos estrogênios e seus receptores;
- (3) a relação testosterona/estrogênio encontra-se diminuída na faixa etária em que aumenta a incidência de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Faz-se necessário verificar se há diferença na ativação dessas vias de sinalização intracelular e a participação dos receptores de estrogênio no desenvolvimento da hiperplasia e do câncer de próstata.

2 HIPÓTESE

H0 = a concentração de estrogênio e a expressão dos seus receptores (ER α , ER β e GPER) **não** são diferentes entre os grupos HPB e CaP, não atuando na modulação das vias MAPK e PI3K .

H1 = a concentração de estrogênio e a expressão dos seus receptores (ER α , ER β e GPER) são diferentes entre os grupos HPB e CaP, atuando na modulação das vias MAPK e PI3K.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se a concentração de estrogênios e a expressão dos seus receptores (ER α , ER β e GPER) estão relacionadas com a expressão de proteínas das vias de sinalização MAPK e PI3Ks em tecido prostático de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar os estrogênios em amostras de tecido humano de hiperplasia prostática benigna (HPB) e de câncer de próstata (CaP).
- Analisar a expressão gênica e proteica dos receptores ER α e ER β em HPB e CaP.
- Analisar a expressão gênica e proteica do receptor GPER em tecido prostático humano hiperplásico e de carcinoma.
- Avaliar a ativação da via MAPKs através da medida da ativação das proteínas ERK1/2, JNK e p38 α em HPB e CaP.
- Avaliar a via da PI3K através da medida da ativação das proteínas AKT e GSK3 e através da medida da expressão das proteínas PI3K e mTOR em HPB e CaP
- Analisar a expressão gênica das isoformas do receptor de estrogênio β (ER β 1, ER β 2, ER β 3, ER β 4, ER β 5 e ER β 6) em tecido prostático humano hiperplásico e de carcinoma.
- Identificar a localização e quantificar os receptores ER α e GPER no estroma e no epitélio de tecido de HPB e CaP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Estudo transversal.

4.2 População em estudo

Foram selecionados para este estudo pacientes entre 45 e 90 anos, com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), indicados para cirurgia por seu médico responsável, que não tivessem recebido tratamento com hormonioterapia ou quimioterapia, não possuíam diagnóstico de outra neoplasia concomitante e com volume prostático medido por ecografia abdominal acima de 30g.

Grupo HPB - Toque retal sem suspeita de neoplasia maligna. Os pacientes com diagnóstico de HPB que participaram deste estudo foram submetidos à cirurgia (prostatectomia aberta ou ressecção transuretral) tendo o diagnóstico confirmado pelo exame anatomopatológico.

Grupo CaP - Os pacientes com diagnóstico de câncer de próstata que participaram deste estudo foram submetidos à cirurgia de prostatectomia radical tendo o diagnóstico confirmado pelo exame anatomopatológico.

4.3 Cálculo amostral

O tamanho da amostra para a análise da expressão gênica e proteica no tecido prostático foi calculado com o programa PEPI 3, utilizando-se dados de estudos prévios realizados no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (Seibel, 2010). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05 com poder estatístico de 90% e diferença entre as médias de 0,1 unidades arbitrárias, chegando-se a um N de 18 pacientes por grupo para a metodologia de PCR Real Time e de 10 pacientes por grupo para o Western Blot. Para a medida de estrogênio no tecido prostático foi estabelecido um N de 15 amostras por grupo.

4.4 Coleta das amostras

As amostras de tecido prostático foram coletadas durante a remoção cirúrgica conforme diagnóstico médico.

Os fragmentos do tecido prostático destinados à análise da expressão gênica, proteica e hormonal foram coletados, devidamente identificados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e transferidos para um freezer a -80°C para posterior extração de RNA total e de proteínas.

4.5 Expressão gênica

4.5.1 Extração de RNA

O RNA total dos fragmentos das amostras de câncer de próstata e de hiperplasia prostática benigna foi extraído de acordo com o Método de Trizol (protocolo do fabricante Life Technologies).

O fragmento de tecido, após congelamento, foi colocado em um tubo *ependorf* com 0,5 mL de Trizol e homogeneizado (Omnimix[®]) a 4°C por aproximadamente 1 minuto. Foi acrescido mais 0,5 mL de Trizol e deixado 5 minutos em temperatura ambiente. Passados os 5 minutos, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio a esse material, que foi agitado no vortéx por 15 segundos.

O material foi deixado em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugado por 15 minutos a 11.600 x g (Centrifuge 5402[®] Eppendorf) a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro *ependorf*, onde foi adicionado 1 mL de propanol, agitado suavemente

por inversão e colocado a -20°C *overnight*. Passado o período *overnight*, o material foi centrifugado por 15 minutos a $11.600 \times g$ a 4°C , descartando-se o sobrenadante.

O RNA precipitou formando um precipitado, onde foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado e centrifugado por 10 minutos a $5.000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o tubo com o precipitado foi aberto para secagem em temperatura ambiente.

De acordo com o volume do precipitado, foi adicionado de 10 a 30 μL de água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). As amostras foram então incubadas a 60°C por 10 minutos e colocadas, em seguida, por 1 minuto no gelo.

As amostras foram purificadas utilizando RNeasy Mini kit (Qiagen[®]), segundo o protocolo do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação do RNA total e as amostras foram estocadas a -80°C para posterior síntese de cDNA.

4.5.2 Quantificação do RNA

Para a quantificação, alíquotas de 1 μL da solução de RNA das amostras foram diluídas em 499 μL de água com DEPC e lidas em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (GeneQuant[®], Pharmacia Biotech), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm foi superior a 1,6. Considerando que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 μg de RNA por mL de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/mL}$$

Onde: A= absorvância e D= diluição da alíquota usada para a quantificação.

Por exemplo, para 1 μL da solução de RNA em 500 μL de água.

D = 1: 499 = 500 vezes

4.5.3 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA (DNA complementar) foi feita a partir de 2 μg de RNA total, utilizando oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do mRNA, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração do mRNA corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, estimou-se que 2 μg de RNA total deu origem a 40 ng de cDNA.

O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 minutos juntamente com o OligodT e os dNTPs. Em seguida, se adicionou uma mistura contendo tampão Tris-HCl 200 mM pH 8,4 (PCR Buffer 10X) com KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM e DTT 0,1M, sendo incubado por 2 min a 42°C. Em seguida, foi incubado com a enzima transcriptase reversa a 42°C por 50 min. Após nova desnaturação a 70°C por 15 min, a mistura foi incubada com a enzima Rnase H de *E. coli* por 20 minutos a 37°C para destruir o RNA não transcrito.

A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 25 μL que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

4.5.4 Desenho dos oligonucleotídeos (*primers*)

O *primer* para avaliação da expressão gênica do ER α amplifica todas as isoformas deste receptor: variante 4 (*GenBank* NM_001122742), variante 3 (*GenBank* NM_001122741), variante 2 (*GenBank* NM_001122740), variante 1 (*GenBank* NM_000125) e o *primer* para avaliação da expressão gênica do GPER amplifica todas as isoformas do GPER: variante 4 (*GenBank* NM_001098201), variante 3 (*GenBank* NM_001039966) e variante 2 (*GenBank* NM_001505).

Foram realizadas análises de bioinformática com ferramentas disponíveis *on line* para o desenho dos *primers* que foram utilizados para amplificação das isoformas do Receptor de Estrogênio Beta (ER β): ER β 1, ER β 2, ER β 3, ER β 4, ER β 5 e ER β 6 por qPCR. O gene de referência utilizado foi o da beta-2-microglobulina (β 2m), (*GenBank* M17986).

Para o desenho dos oligonucleotídeos específicos para as isoformas do ER β , foram utilizadas as sequências de mRNA disponíveis no *GenBank* sob as identificações NM_001437 para o ER β 1, NM_001040275 para o ER β 2, NM_001214902 para o ER β 3, NM_001214903 para o ER β 4, NM_001271876 para o ER β 5 e NM_001271877 para o ER β 6. Estas sequências foram alinhadas com a ferramenta *ClustalW* a fim de identificar as regiões mais específicas de cada isoforma para o desenho dos *primers* (Anexo 2). O *primer* para o receptor de estrogênio β total (ER β total) amplifica todas as isoformas em estudo.

Estudos prévios têm apresentado dados ditos específicos para as isoformas do ER β , entretanto os conjuntos de oligonucleotídeos usados, para o ER β 1 e ER β 6, não possibilitam a amplificação de um fragmento específico de acordo com o alinhamento das sequências. Como se pode observar no alinhamento apresentado no Anexo 2, existe uma grande similaridade entre as sequências de cDNA das isoformas ER β 1 e ER β 6, o que impossibilita o desenho de

ensaios específicos para cada isoforma, ou seja, que as detectem de maneira isolada. Dessa forma, optou-se por uma abordagem que consiste na amplificação das isoformas em conjunto. Assim, foram desenhados ensaios para amplificação dos transcritos ER β 1 e ER β 6 em conjunto que foi chamado de primer ER β 1 e ER β 6. Para as demais isoformas foi possível desenhar um ensaio específico. As sequências, tamanho de fragmento e temperatura de anelamento estão listados na Tabela 1. Os *primers* de cada um dos ensaios foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*) e estão identificados no alinhamento das sequências no Anexo 2.

Tabela 01. Sequência de nucleotídeos (5'-3') e condições de reação:

| Gene | Primer Sense | Primer Antisense | Temperatura anelamento (X°C) | Fragmento (pb) |
|------------------|------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------|
| ER α | CAGGGGTGAAGTGGGGTCTGC | ATGCGGAACCGAGATGAT | 62 | 483 |
| ER β | GGCACCTTTCTCCTTTAGTG | GCTTCACACCAGGGACTCTTTTGAG | 60 | 79 |
| GPER | CTGGGGAGTTTCTGTCTGA | GCTTGGGAAGTCACATCCAT | 60 | 56 |
| ER β 1 e 6 | CACGTCAGGCATGCGAGTAACA | GCCCTCTTTGCTTTTACTGTC | 60 | 180 |
| ER β 2 | TCAGGCATGCGAGGGCAGAAA | AGTCTCCATCTTCATTCCAAATGAG | 60 | 65 |
| ER β 3 | TCCTCCCAGCAGCAATCCAT | GCTTTTCTCCCATCTCGCAT | 60 | 82 |
| ER β 4 | CATCTCCTCCCAGCAGCAATC | GCACATAATCCCATCCCAAGCC | 60 | 123 |
| ER β 5 | ACAAGTAAAATGCAGCT | GATTACAGAAAATC | 50 | 71 |
| B2m | CTATCCAGCGTACTCCAAAG | ACAAGTCTGAATGCTCCACT | 60 | 165 |

4.5.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de PCR por fluorescência (Bustin, 2000). Entre as

variações da técnica disponíveis, optamos pela utilização do corante fluorescente *SYBER Green I* (Morrison *et al.*, 1998).

Foi adicionado à mistura para reação de PCR o corante *Sybr Green I* que se liga à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1000 vezes na fluorescência. Como o corante liga-se a qualquer fita dupla de DNA foram realizadas as chamadas curvas de desnaturação (*melting-T_m*), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso se conseguiu verificar a especificidade do produto amplificado, uma vez que a *T_m* é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado apresentam picos de desnaturação mais baixos.

4.5.6 Curva padrão

Para cada gene em estudo foi realizada uma curva padrão, pela qual foram calculados os valores (em ng) das amostras. A curva padrão foi obtida através de reações de RT-PCR feitas de diluições seriadas de cDNA de tecido prostático (de 0,0004 ng a 4 ng). Cada diluição do cDNA foi feita em triplicata, juntamente com as amostras. As diluições foram escolhidas dentro de uma faixa que incluía o valor esperado para o mRNA das amostras. O ciclo limiar (CT) foi definido no momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência, que é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade de cDNA (ng) (Higuchi, Fockler *et al.* 1993). A curva de padronização foi gerada plotando-se os valores de CT, num intervalo de 95% de confiança, contra a intensidade da fluorescência do *SYBR Green I*, correspondendo ao logaritmo das ng de cDNA.

4.5.7 Normalização

A normalização por gene de referência é um método simples e necessário para controle interno de erros na PCR em tempo real. Para ser usado como referência, um gene deve apresentar estabilidade, expressão não-regulada no tipo de amostra analisado, não sofrer variações em diferentes condições de tratamento experimental e deve ter seu nível de expressão semelhante aos níveis de transcritos dos genes em estudo (Bustin, 2002).

Neste estudo foi utilizada a proteína β 2-microglobulina como normalizador para todos os genes de interesse.

O gene de referência foi amplificado da mesma forma que o gene de interesse (curva padrão de 0,0004 a 4 ng de cDNA) e cada diluição foi feita em duplicata. Em cada reação realizada para a amplificação do gene de interesse foi feita a amplificação do gene normalizador escolhido, sendo os resultados expressos como a relação gene de interesse/gene normalizador, em unidades arbitrárias.

4.5.8 Protocolo geral da qPCR

As condições da reação de PCR para cada gene foram padronizadas, antes de proceder-se à quantificação das amostras. Foram testadas a concentração dos oligonucleotídeos e a diluição das amostras.

Os oligonucleotídeos iniciadores para avaliar a expressão gênica de ER α , ER β , GPER, as isoformas do receptor de estrogênio ER β : 01/06, 02, 03, 04 e 05 foram desenhados utilizando a ferramenta *PrimeTime qPCR Assay Entry* (IDT), disponível on-line (<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>), e sintetizados pela IDT.

As reações foram realizadas adicionando-se, para cada amostra, 12,5 μ L da mix, 0,40 μ L da solução de uso de cada oligonucleotídeo, 0,40 μ L do corante referência ROX, 1 μ L da amostra e 10,3 μ L de água, totalizando um volume final de 25,0 μ L. As condições das reações foram: 94°C (2 minutos), 94°C (40 segundos), X°C (40 segundos), 72°C (40 segundos), 45 ciclos com extensão final de 2 minutos a 72°C e curva de melting de 56°C a 96°C (0,5°C a cada 10 segundos). As sequências dos oligonucleotídeos e as respectivas temperaturas de anelamento estão listadas na Tabela 1.

As amostras foram amplificadas no equipamento 7500 Fast (Applied Biosystems, EUA). As leituras de fluorescência emitidas por cada amostra nas reações foram feitas ao final de cada ciclo. As reações foram realizadas com 45 ciclos, mas a quantificação das amostras foi realizada durante o início do aumento exponencial da fluorescência (CT limiar), conforme descrito anteriormente.

4.6 Western blot

4.6.1 Extração de proteínas

Aproximadamente 0,2 g de tecido foram homogeneizados individualmente em um homogeneizador (Omnimix[®]) por 30 segundos em velocidade máxima na temperatura de 4°C na presença de 500 µL de uma solução tampão de lise RIPA (BioBasic Inc).

O material foi solubilizado por no mínimo 16 horas a 4°C, após foi centrifugado durante 30 minutos a 4°C em velocidade de 11600 x g. O sobrenadante foi coletado e guardado em microtubos a -20°C para dosagem de proteínas e realização do Western blot.

4.6.2 Dosagem de proteínas

Cerca de 10 µL 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. Todas as amostras foram testadas em duplicata, com 5 µL de amostra diluída em 95 µL de água e 1000 µL de solução de Bradford, e comparadas com curva padrão de albumina. Para a realização da eletroforese das proteínas foram utilizadas 50 µg de proteína por poço.

4.6.3 Análise de proteínas

Para separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE com uma concentração de poliacrilamida de 10%. Foram utilizadas 10 amostras por grupo. Aproximadamente 50 µg de proteínas das amostras foram incubadas com solução de Laemmli (30% glicerol, 10% SDS; 62,5 mM Tris, 750 mg DTT e 0,001% azul de bromofenol) a 95°C por 5 minutos (Laemmli, 1970), e colocadas em cada poço do gel.

A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo 192 mM glicina; 25 mM Tris e 0,1% SDS, pH 8,3. As proteínas migraram no gel por aproximadamente 2 h e 30 min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular. Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e realizada a etapa de transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose por sistema semi-seco. A transferência foi efetuada por 1 hora, com voltagem de 25 v.

As membranas de nitrocelulose foram incubadas durante 1 h em solução bloqueadora (TBS), contendo 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05% Tween 20, pH 7,4, acrescido de 2% BSA. Esta solução satura sítios de ligação inespecíficos da membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por, no mínimo, 16 h a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos de interesse específicos que constam na Tabela 02.

Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS (3 lavagens de 10 minutos cada) e então incubadas com o segundo anticorpo por 2 horas. Os anticorpos secundários utilizados foram: mouse anti-goat (Santa Cruz; código sc-2354), rabbit anti-mouse (Invitrogen; código 81-0672) e goat anti-rabbit (Invitrogen; código G-21234). Após a incubação com o segundo anticorpo, as membranas foram lavadas novamente com TBS (3

lavagens de 10 minutos cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimio-luminescência por 1 min e colocadas em contato com o filme fotográfico (GE Healthcare[®]) durante 30 a 120 segundos. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1 min; lavado com ácido acético e colocado por mais 1 min na solução fixadora. Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura. A densidade óptica das bandas foi quantificada por um sistema de processamento de imagem (Image J). A densitometria obtida para as bandas das proteínas PI3K, mTOR, GPER, ER α e ER β foi corrigida pela banda da β -tubulina, sendo os resultados obtidos expressos em unidades arbitrárias. Para as proteínas em que foram avaliadas a sua forma fosforilada e a total, a densitometria obtida para as bandas da proteína fosforilada foi corrigida pela banda da proteína total, sendo os resultados obtidos expressos em unidades arbitrárias.

Tabela 02. Anticorpos primários utilizados no Western Blot:

| Proteína | Peso Molecular | Fabricante | Código |
|---|-----------------------|--------------------------|---------------|
| Mouse anti-ERα | 66 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-8002 |
| Rabbit anti-ERβ | 56 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-8974 |
| Rabbit anti-GPR30 | 38 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-48525-R |
| Rabbit anti-PI3-kinase p110 | 110 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-7189 |
| Rabbit anti-AKT 1/2/3 | 60 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-8312 |
| Rabbit anti-p-AKT 1/2/3 (Ser 473) | 60 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-7985-R |
| Rabbit anti-GSK3β | 47 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-9166 |
| Goat anti-p- GSK3β (Ser 9) | 47 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-11757 |
| Rabbit anti-FRAP | 220 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-1550-R |
| Mouse anti-ERK 1/2 | 44 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-135900 |
| Rabbit anti-p-ERK 1/2 (Thr 202) | 44 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-101760 |
| Rabbit anti-p38α | 38 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-728 |
| Rabbit anti-p-p38α (Thr 180/Tyr 182) | 38 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-17852-R |
| Mouse anti-JNK 1/2 | 46 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-137020 |
| Mouse anti-p-JNK | 46 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-6254 |
| Rabbit anti-c-JUN | 39 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-45 |
| Mouse anti-β-tubulina | 55 kDa | Santa Cruz Biotechnology | sc-5274 |

4.7 Dosagem de estrogênio no tecido prostático

4.7.1 Extração de hormônios esteroides no tecido prostático

Aproximadamente 50 mg de cada amostra de tecido prostático (15 amostras por grupo) foram homogeneizados individualmente em um homogeneizador (Omnimix[®]) por 30 segundos em velocidade máxima a 4°C na presença de 250 µL de solução de PBS (tampão fosfato-salino). Em seguida, as amostras foram sonicadas por 20 segundos utilizando ciclo 0,5 e amplitude de 75.

Para separação das fases, 153 µL do homogenato formado foi separado em outro eppendorf, adicionado 670 µL de éter e agitado 02 vezes em vórtex por 20 segundos, centrifugado por 05 minutos a 1300 x g e o tubo de eppendorf foi colocado em nitrogênio líquido até o congelamento da fração inferior que não continha éter. O sobrenadante foi pipetado para outro eppendorf.

Após o descongelamento da fração inferior foi adicionado novamente 670 µL de éter e as amostras foram agitadas em vórtex 02 vezes por 20 segundos. Após foram centrifugadas por 05 minutos a 1300 x g e colocadas em nitrogênio líquido. O sobrenadante foi pipetado e colocado junto com a fração anterior e o precipitado foi descartado. Os tubos com o sobrenadante foram deixados abertos à temperatura ambiente para que ocorresse evaporação do volume até 67 µL. A este extrato foi adicionado 100 µl de éter e os tubos agitados em vortex por 10 segundos. Em seguida, os tubos foram colocados em banho com ultrassom na temperatura de 30°C por 10 minutos. Os tubos com o sobrenadante foram deixados abertos à

temperatura ambiente para que ocorresse evaporação do volume até 13 µL. Após, adicionou-se 50 µL de solução PBS, as amostras foram agitadas em vortex por 10 segundos e, em seguida, centrifugadas por 3 minutos a 1300 x g. Finalmente, os tubos foram mantidos abertos até que o resto do éter evaporasse e armazenados a – 20°C para posterior medida hormonal.

Essa técnica foi baseada no estudo de Zanardi e colaboradores (Zanardi *et al.*, 2011). Para verificar a precisão da extração foram realizadas 04 extrações utilizando fragmentos provenientes do mesmo tecido prostático com pesos semelhantes variando em ± 13 mg. Os resultados obtidos da dosagem hormonal foram normalizados pelo peso de tecido e o resultado da dosagem do hormônio nas amostras apresentou coeficiente de variação de 13,35%. De acordo com Brito e colaboradores quanto menor a concentração do analito maior é o coeficiente de variação, sendo aceitável um coeficiente de variação de até 45% para concentrações menores que 10^{-9} (Brito *et al.*, 2003).

4.7.2 Dosagem do hormônio estradiol

O método utilizado para a dosagem do hormônio estradiol nas amostras de tecido prostático com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata foi o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit Estradiol sensitive ELISA (DRG diagnostics, Germany, Ref EIA-4399). Foram seguidas as orientações do fabricante quanto à realização da técnica utilizada.

As amostras previamente extraídas foram sonicadas durante 12 minutos em banho de ultrassom. Os reativos e a placa foram deixados à temperatura ambiente antes do uso.

Foram colocados 50 µL das amostras em cada poço (15 amostras do grupo HPB e 15 amostras do grupo CaP) e dos padrões 0, 03, 10, 50 e 200 pg/mL. Adicionou-se 100 µL do

conjugado enzimático em cada poço, misturou-se por 10 segundos e a placa foi deixada em temperatura ambiente por 4 horas. Em seguida, o conteúdo dos poços foi agitado energicamente e realizada 03 vezes à lavagem dos poços com 400 µL de solução de lavagem. A placa foi virada contra papel absorvente para a eliminação de gotas residuais.

Foram adicionados 100 µL de solução substrato em cada poço e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a reação enzimática foi finalizada com a adição de 50 µL de solução de parada em cada poço. A reação foi lida em 450 nm dentro de 10 minutos após a adição da solução de parada, no equipamento Anthos Zenyth, Biochrom®.

Para o cálculo dos resultados foi utilizada a curva de regressão 4PL utilizando o programa MyAssay, e os resultados foram expressos em pg/g de tecido.

4.8 Localização dos receptores por imunofluorescência

As reações de imunofluorescência foram realizadas nos cortes de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Os cortes obtidos após microtomia mecânica foram de 3 µm de espessura. Os cortes foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor a 90°C utilizando-se tampão citrato 10 mM pH 6.0 por 20 minutos. A permeabilização do tecido foi realizada pela exposição por 10 minutos a temperatura ambiente com solução de PBS contendo 0,1% de albumina, 0,25% de Triton-X e 0,1% de Tween, seguida de 3 lavagens com solução PBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de PBS com 1% de albumina e 0,1% de Tween por 30 minutos. Os anticorpos primários foram preparados na diluição 1:300 em solução PBS com 0,1% de albumina e Tween 0,05%. Foram utilizados os anticorpos mouse

anti-ER α (Santa Cruz Biotechnology, sc-8002), rabbit anti-GPR30 (Santa Cruz Biotechnology, sc-48525), mouse anti-citoqueratina-8 (Dako Cytomation, código M0631) e rabbit anti-vimentina conjugada com Alexa Fluor[®] 660 (Cell Signaling, código D21H3). A incubação foi realizada sob refrigeração *overnight*. O anticorpo anti-vimentina foi utilizado como marcador de estroma e o anticorpo anti-citoqueratina foi utilizado como marcador de epitélio.

Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas 05 vezes com solução PBS e incubadas durante 2 horas com os respectivos anticorpos secundários, preparados na diluição 1:300 em solução PBS. Os anticorpos secundários utilizados foram o Alexa Fluor[®] 488 *anti-rabbit* (Life Technologies, A 21441) para o GPR30, Alexa Fluor[®] 488 *anti-mouse* (Life Technologies, A 21200) para o ER α e Alexa Fluor[®] 660 anti-mouse para a citoqueratina-8 (Life Technologies, A 21054). Após o período de incubação com o anticorpo secundário, as lâminas foram lavadas 05 vezes com solução PBS e colocado o marcador de DNA, corante Hoechst (Invitrogen) por 15 minutos. Para finalizar, as lâminas foram lavadas 05 vezes e montadas para posterior análise no microscópio Confocal Olympus FV1000 através do programa Olympus Fluoview FV1000. Foram analisadas a intensidade de fluorescência e a colocalização dos receptores GPER e ER α pelo programa MBF ImageJ.

A intensidade de fluorescência total (CTCF) foi calculada através da fórmula: densidade integrada (ID) – (área selecionada X média da fluorescência).

Para determinar a colocalização das proteínas foi realizado o teste chamado de Análise de correlação de intensidade (ICA), que foi previamente descrito por Li e colaboradores (2004). Esta análise usa os valores de PDM (produto das diferenças entre as médias) pela intensidade do pixel. O PDM é calculado pela formula $(A_i - a)(B_i - b)$, onde A_i e B_i representam a intensidade da coloração do par de pixels para os dois canais e a e b são as médias das intensidades de pixels de toda a imagem. Se dois fluorocromos estão

colocalizados (coloração-dependente) suas intensidades em um pixel irão variar em sincronia e o valor do PDM tenderá para a direita ($PDM > 0$). Distribuição simétrica sobre o eixo zero representa coloração aleatória ($PDM \approx 0$), enquanto valores para a esquerda indicam contralocalização (coloração-independente; $PDM < 0$). A colocalização também pode ser estimada de uma maneira quantitativa através do quociente de correlação de intensidade (ICQ). O ICQ é calculado a partir da proporção de pixels com $PDM > 0$ reduzido de 0,5 para variar de +0,5 a -0,5 (completa colocalização e contralocalização, respectivamente). Além disso, para a análise de colocalização foram analisados os coeficientes de Pearson e o coeficiente de Manders. O coeficiente de Pearson varia de +1 a -1, sendo +1 para uma correlação completamente positiva e -1 para uma correlação negativa. O coeficiente de Manders varia de 0 a 1, sendo o resultado mais próximo de 1 considerada uma correlação positiva (Bolte & Cordelieres, 2006; Manders *et al.*, 1993).

4.9 Análise estatística

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliação da distribuição dos resultados em todas as medidas realizadas. Quando o resultado apresentou distribuição paramétrica utilizamos o Teste T para amostras independentes, apresentando os resultados como média e erro padrão. Quando o resultado do teste de normalidade apresentou distribuição não paramétrica foi utilizado o teste de Mann-Whitney e os resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil. Foi considerado nível de significância

quando $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o processador de dados SPSS versão 17.0 (Statistical Packages for the Social Sciences).

4.10 Aspectos éticos

O tecido prostático utilizado foi proveniente de material de descarte de pacientes submetidos à ressecção transuretral de próstata e prostatectomia radical. Os pacientes foram consultados e autorizaram a utilização do material para este estudo. Os objetivos da pesquisa foram explicados aos pacientes e todos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

Uma vez que se trata de informações genéticas específicas, foi garantido aos pacientes o sigilo em relação às informações obtidas e uso absolutamente restrito para fins de pesquisa científica. Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS) e aprovado sob o número 110518.

4.11 Fontes de financiamento

Este trabalho foi financiado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

4.12. Infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho

Os experimentos para análise de expressão gênica e proteica deste trabalho foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, instalado no Departamento de Fisiologia, UFRGS. A microscopia confocal foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

4.13 Disposição final de resíduos e biossegurança

Após os experimentos, restos de tecidos foram acondicionados em sacos brancos, lacrados e identificados com o rótulo de lixo biológico. Resíduos químicos foram descartados como Lixo Químico, que foi coletado pelo serviço de coleta sediado no Instituto de Química da UFRGS.

5 RESULTADOS

5.1 Características dos pacientes

A média de idade dos pacientes dos grupos hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP) estão descritos na Tabela 03. A análise da idade dos pacientes não apresentou diferença entre os grupos ($P=0,074$). Pacientes com câncer de próstata apresentaram níveis de PSA 4 vezes maiores do que os níveis de PSA dos pacientes com hiperplasia prostática benigna. O exame anatomopatológico das amostras dos pacientes do grupo câncer de próstata mostrou que 78% apresentavam escore de Gleason ≥ 7 .

Tabela 03. Caracterização dos pacientes.

| | HPB | CaP | |
|-----------|-----------------|------------------|--------------|
| Idade | 61 \pm 3,17 | 64,6 \pm 1,05 | $P= 0,074$ |
| PSA | 3,92 \pm 0,67 | 14,86 \pm 5,25 | $P= 0,007^*$ |
| Gleason 6 | | 22% | |
| Gleason 7 | | 67% | |
| Gleason 9 | | 11% | |

5.2 Expressão gênica do GPER

A expressão gênica do GPER foi comparada entre as amostras de câncer de próstata e as amostras de hiperplasia prostática benigna. O mRNA foi avaliado por q-PCR e normalizado pela β 2-microglobulina, conforme ilustrado de forma representativa na Figura 08.

O receptor GPER foi expresso tanto no tecido de HPB quanto no tecido de CaP. O resultado mostra uma maior expressão do gene GPER nas amostras de câncer de próstata com mediana 2,09 (0,50 - 9,60) quando comparado com o tecido hiperplásico benigno de próstata com mediana 0,16 (0,11 - 0,59).

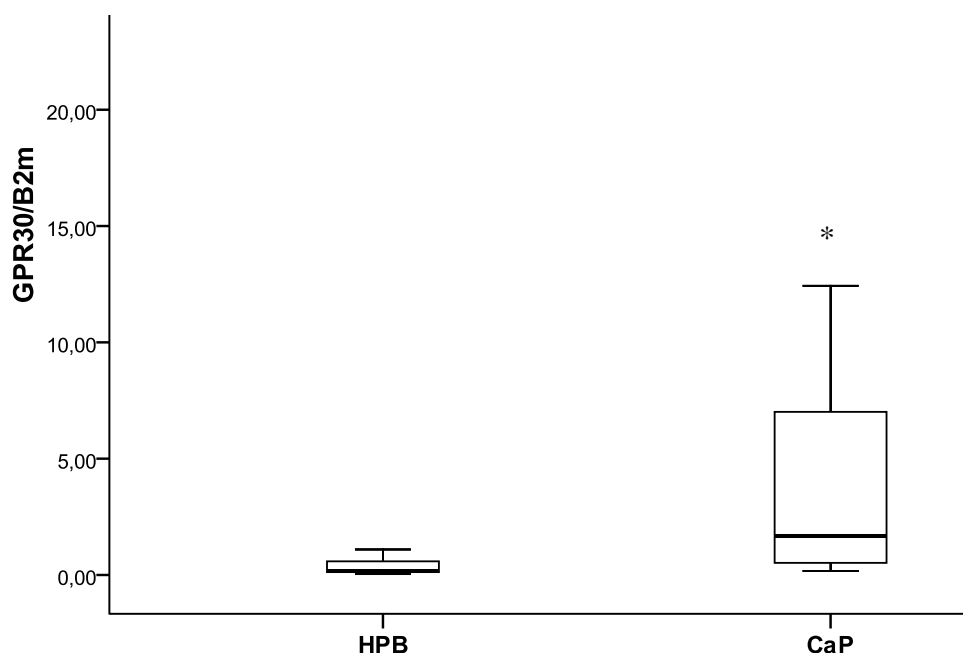


Figura 08. Expressão gênica do GPER em amostras de HPB e CaP. Dados apresentados graficamente como mediana e intervalo interquartil (25-75) dos níveis de GPER corrigidos pelos níveis de β ₂m; teste de Mann-Whitney; $P = 0,001$. (n=18).

5.3 Expressão proteica do GPER

A expressão proteica do GPER está representada na Figura 09. A imagem da autorradiografia mostra uma maior expressão da proteína GPER nas amostras de câncer de próstata com média $126,89 \pm 6,24$ quando comparadas com o tecido de hiperplasia prostática benigna com média $52,16 \pm 16,49$.

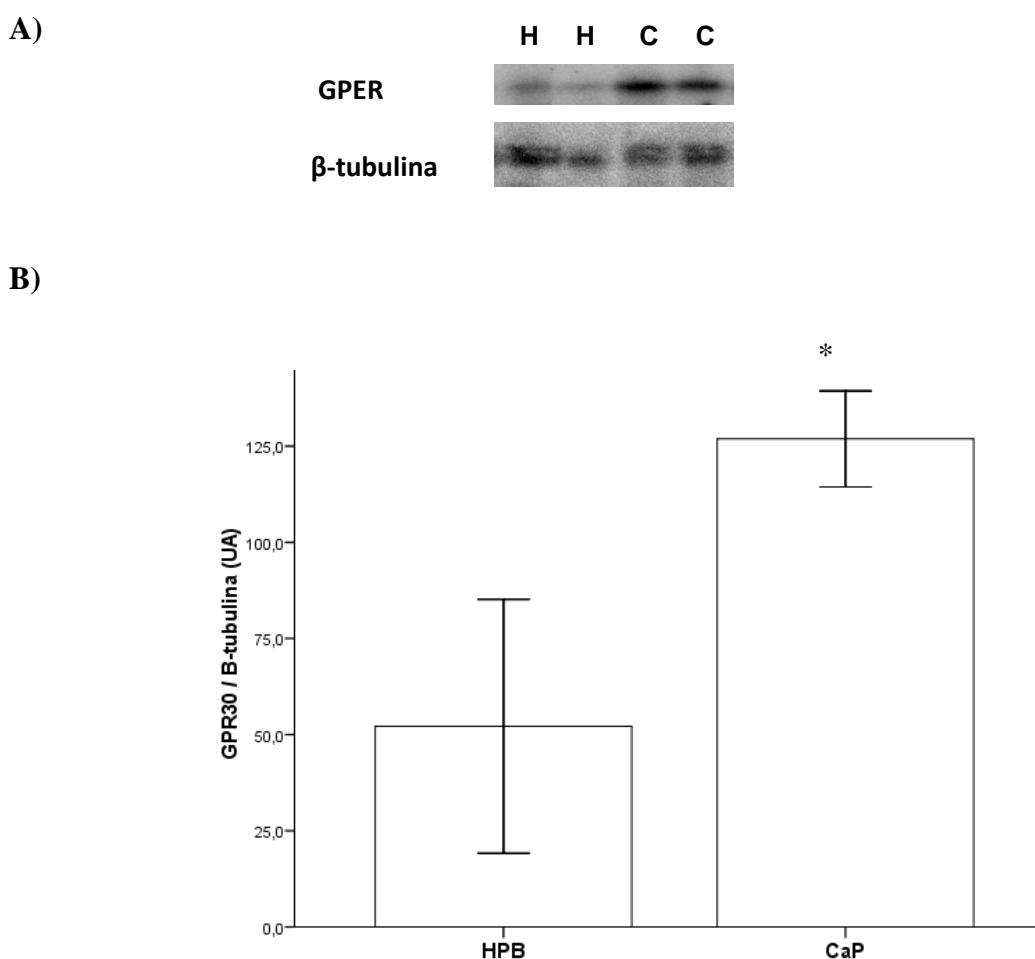


Figura 09. Níveis protéicos do GPER das amostras de HPB e CaP. (A) Representação das bandas do GPER onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas e é expresso como média e erro padrão dos níveis protéicos de GPER corrigidos pela β -tubulina; teste T; $P=0,001$, $n = 10$.

5.4. Localização do GPER no tecido prostático

A localização do GPER e sua intensidade foram avaliadas no tecido prostático de HPB e de CaP pela técnica de imunofluorescência. Os resultados da medida da intensidade do GPER e sua colocalização em relação ao núcleo são apresentados na Tabela 3.

As Figuras 10 (GPER no tecido estromal) e 11 (GPER no tecido epitelial) mostram: em 1) imagem da coloração para núcleo em azul; em 2) imagem da coloração para estroma (vimentina) ou epitélio (citoqueratina) em vermelho; em 3) imagem da coloração para o GPER em verde; em 4) imagem composta com todas as colorações – merge e em 5) imagem da colocalização do GPER em relação ao núcleo.

Em ambos os grupos a intensidade do GPER foi maior no epitélio do que no estroma. Além disso, a intensidade do GPER no tecido epitelial é maior no câncer de próstata quando comparado ao grupo hiperplasia. As medidas de colocalização do GPER em relação ao núcleo mostram que este receptor está positivamente colocalizado no núcleo tanto no tecido de HPB quanto de CaP, estando completamente colocalizado no núcleo no tecido de câncer de próstata (ICQ = 0,5).

Tabela 04. Medidas de intensidade de fluorescência do GPER e sua colocalização em relação ao núcleo no estroma e no epitélio de HPB e CaP.

| | HPB estroma | HPB epitélio | CaP estroma | CaP epitélio |
|---|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Intensidade | 172.785 | 693.798 | 640.470 | 923.758 |
| Coefficiente de Pearson (Rr) núcleo* | 0,421 | 0,433 | 0,631 | 0,686 |
| Coefficiente de Manders (r) núcleo** | 0,715 | 0,705 | 0,776 | 0,772 |
| ICQ núcleo *** | 0,441 | 0,214 | 0,5 | 0,5 |

Varição *Rr = +1 a -1; **r = 0 a 1; ***ICQ= +0,5 a -0,5.

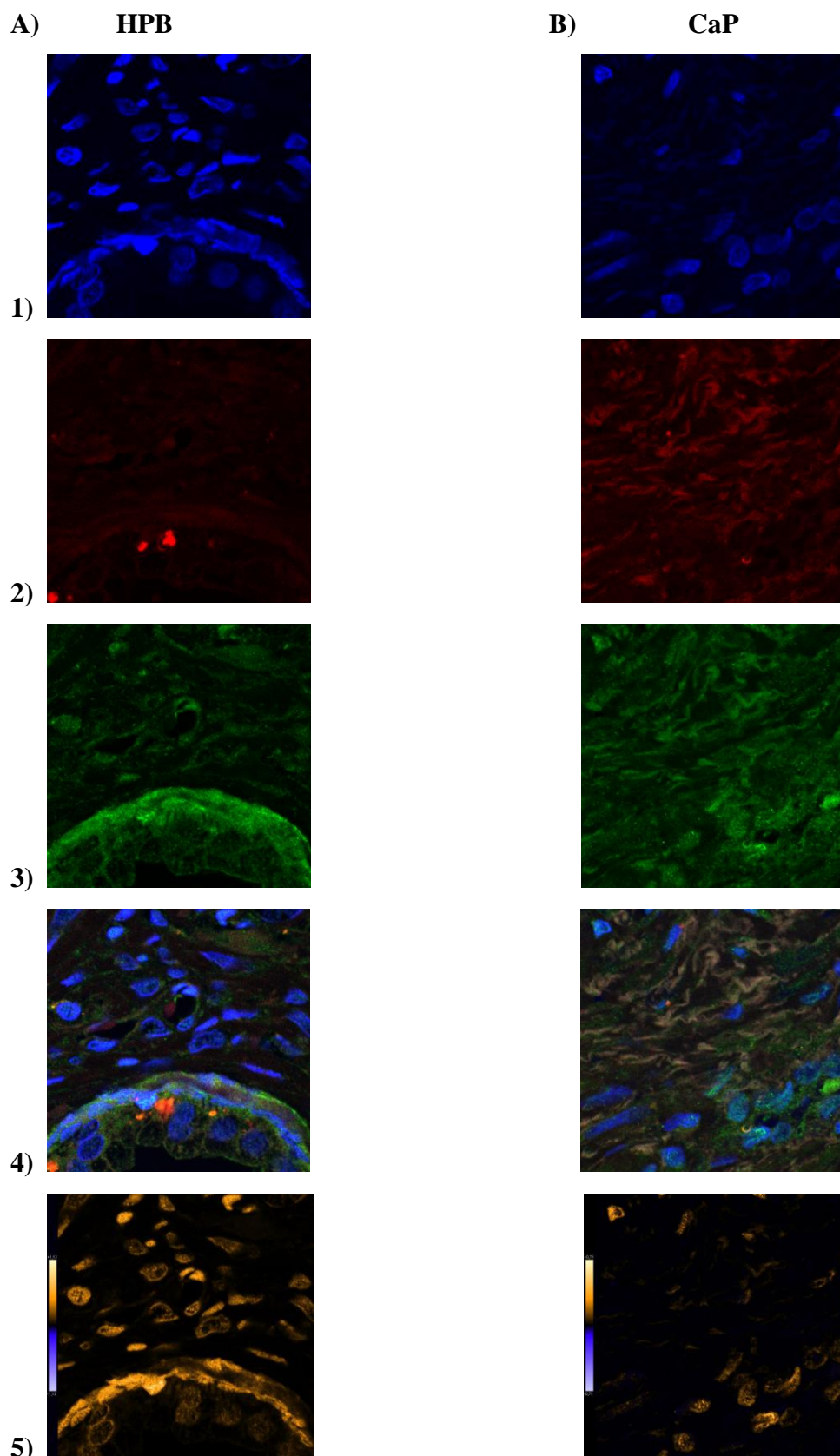


Figura 10. GPER no estroma do tecido de HPB e CaP. Em A) HPB e em B) CaP. Em 1) coloração azul para núcleo, 2) coloração vermelha para vimentina, 3) coloração verde para GPER, 4) merge e em 5) colocalização do GPER em relação ao núcleo. Tamanho da imagem 70.312 μm x 70.312 μm .

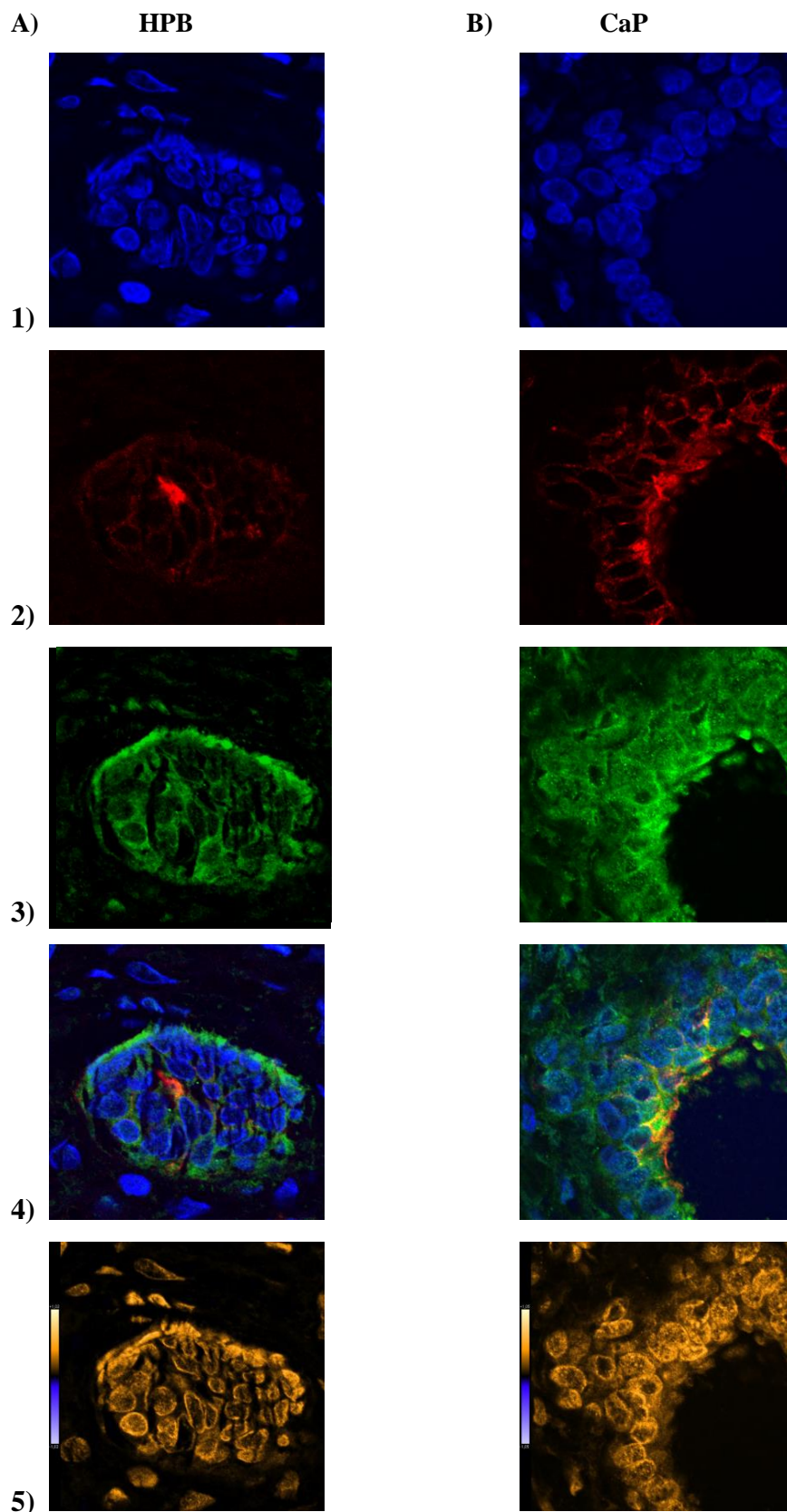
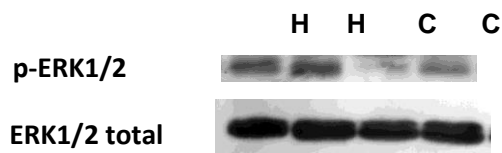


Figura 11. GPER no epitélio do tecido de HPB e CaP. Em A) HPB e em B) CaP. Em 1) coloração azul para núcleo, 2) coloração vermelha para citoqueratina, 3) coloração verde para GPER, 4) merge e em 5) colocalização do GPER em relação ao núcleo. Tamanho da imagem 70.312 μm x 70.312 μm .

5.5 Ativação da ERK1/2

A Figura 12 ilustra a ativação da proteína ERK1/2 avaliada pela técnica de Western Blot. A ativação da ERK1/2 está diminuída no grupo câncer de próstata com mediana 59,42 (41,40 – 71,62) quando comparado com o grupo hiperplasia prostática benigna com mediana 96,81 (83,59 – 134,63). Os resultados estão representados graficamente como: mediana e intervalo interquartil (25% -75%) dos níveis proteicos de p-ERK1/2 corrigidos pela ERK1/2 total.

A)



B)

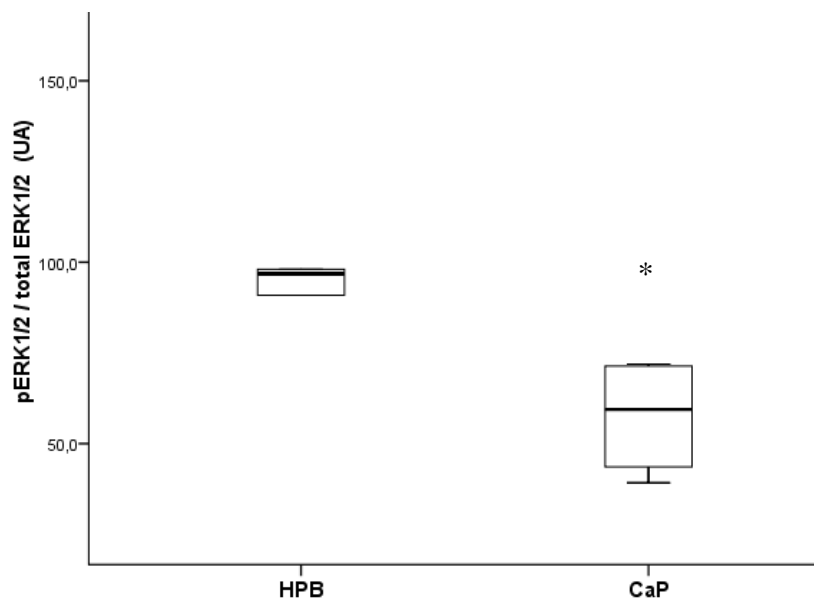


Figura 12. Ativação da ERK1/2 em HPB e CaP. (A) Imagem representativa de ERK1/2 fosforilada e ERK1/2 total onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico expressa a relação pERK1/2 / ERK1/2 total. Diferença significativa entre os grupos, $P=0,014$; $n=10$.

5.6 Ativação da proteína P38 α

A fosforilação da proteína p38, ilustrada na Figura 13, está diminuída no grupo CaP com mediana 36,73 (12,31 – 49,86) quando comparado com o grupo HPB com mediana 168,92 (136,05 – 179,72). Os dados estão representados graficamente como mediana e intervalo interquartil 25%-75% dos níveis protéicos de p-p38 α corrigidos pela p38 α total.

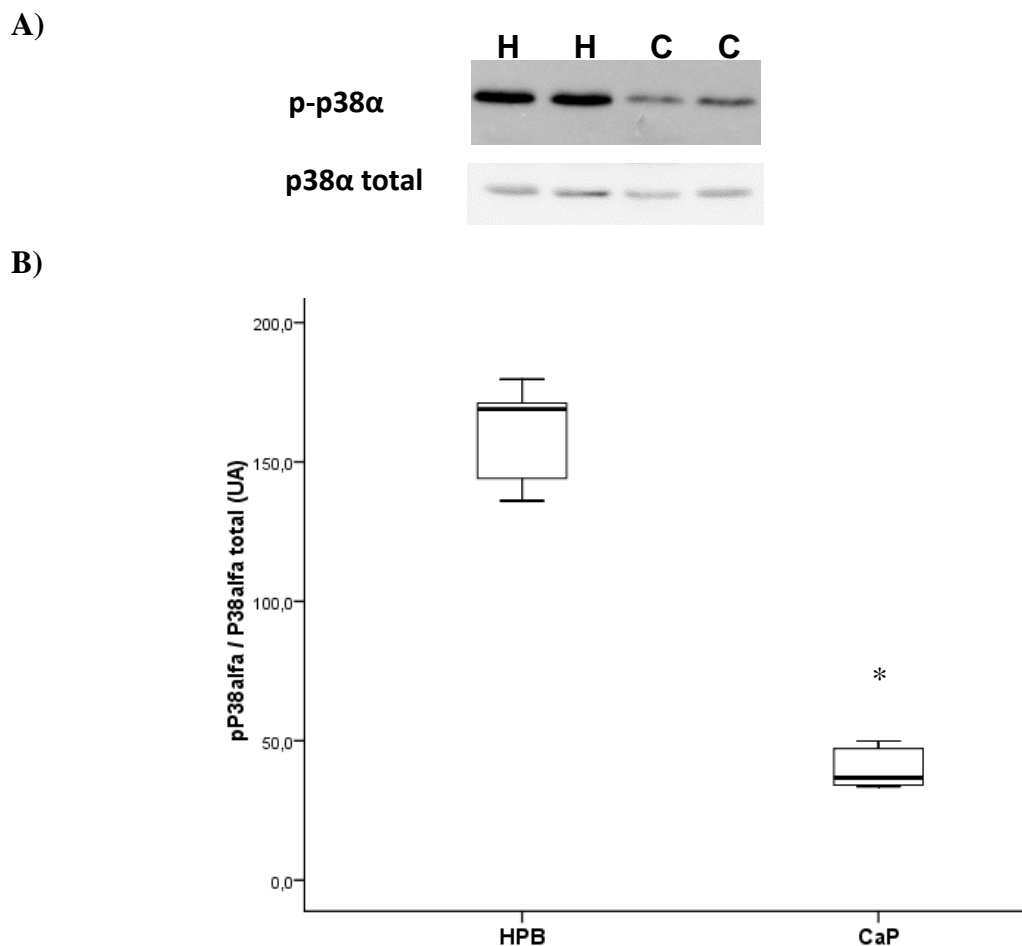


Figura 13. Ativação da proteína p38 α em HPB e CaP. (A) Imagem representativa de p38 α fosforilada e p38 α total onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico expressa a relação p-p38 α / p38 α total, diferença significativa entre os grupos, $P=0,004$; $n=10$.

5.7 Ativação da proteína JNK1/2

A fosforilação da proteína JNK1/2, ilustrada na Figura 14, está aumentada no grupo CaP com mediana 1,593 (1,188 – 2,421) quando comparado com o grupo HPB com mediana 0,368 (0,188 -0,538). Os dados estão representados graficamente como mediana e intervalo interquartil 25-75% dos níveis proteicos de p-JNK1/2 corrigidos pela JNK1/2 total.

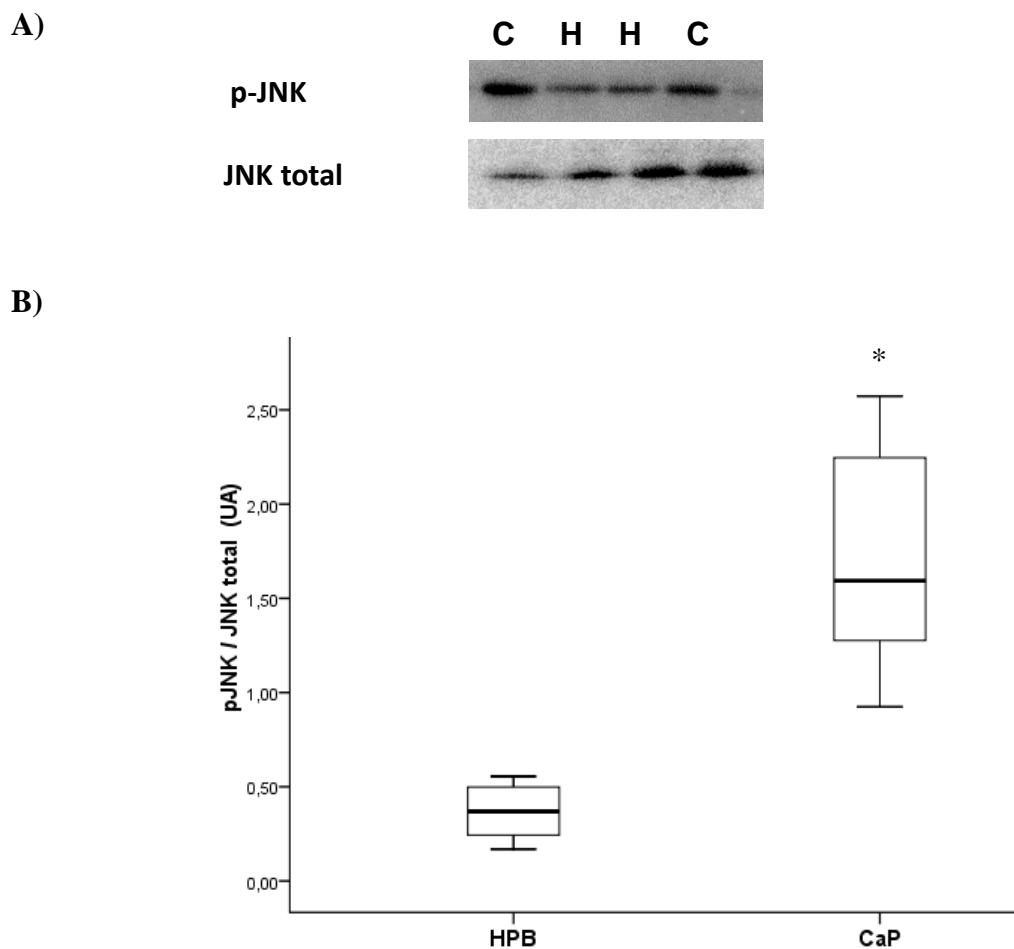
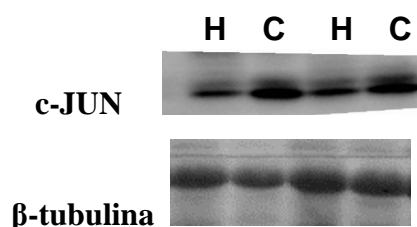


Figura 14. Ativação da proteína JNK1/2. (A) Imagem representativa da JNK fosforilada e JNK total onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico expressa a relação p-JNK / JNK total, diferença significativa entre os grupos, $P=0,0001$; $n=10$.

5.8 Expressão proteica da c-JUN

Os níveis proteicos da c-JUN estão ilustrados na Figura 15. A expressão da c-JUN está aumentada no grupo CaP com mediana 104,12 (91,35 – 136,74) quando comparado com o grupo HPB com mediana 34,20 (30,61 – 59,53). Os dados estão representados graficamente como mediana e intervalo interquartil dos níveis proteicos de c-JUN corrigidos pela β -tubulina.

A)



B)

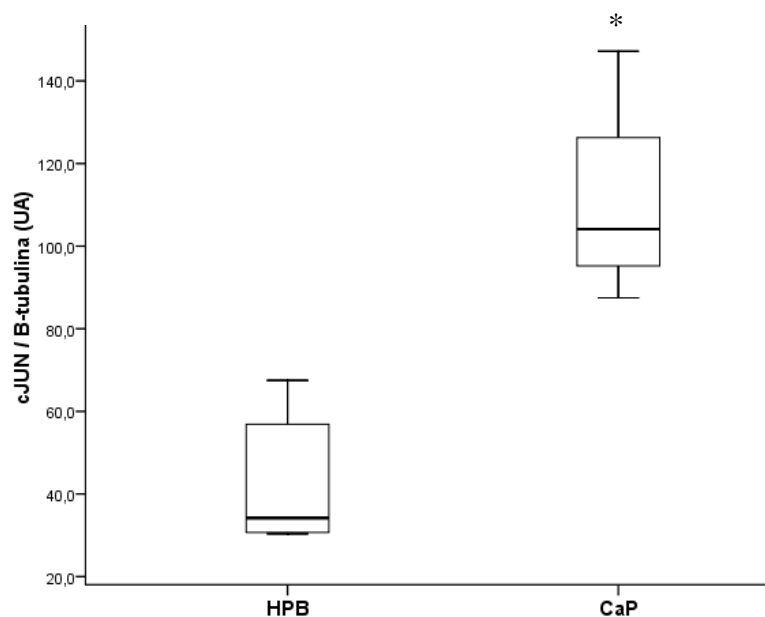


Figura 15. Níveis proteicos da c-JUN. (A) Imagem representativa de c-JUN e β -tubulina onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico expressa a relação c-JUN / β -tubulina, diferença significativa entre os grupos, $P=0,011$; $n=10$.

5.9 Dosagem do hormônio estradiol

Foram analisadas 15 amostras de cada grupo para a quantificação do hormônio estradiol no tecido prostático pela técnica de ELISA após extração. Os resultados estão ilustrados na Figura 16 e mostram diferença na concentração de estradiol no grupo HPB ($0,2480 \pm 0,0298$) quando comparado ao grupo CaP ($0,3090 \pm 0,0745$). Foi observada uma maior concentração de estradiol no grupo câncer de próstata em relação ao grupo hiperplasia prostática benigna.

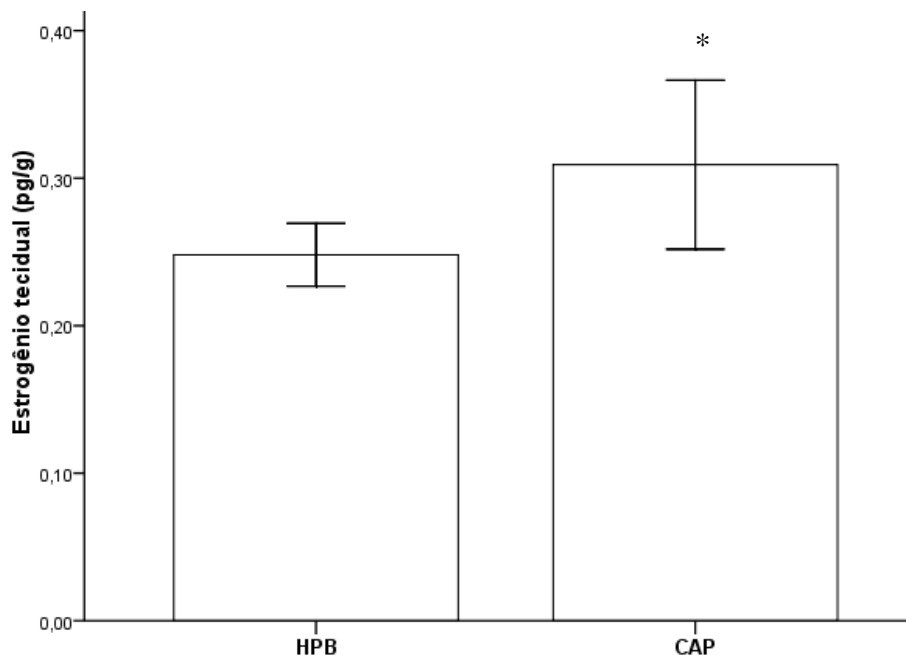


Figura 16. Dosagem de estrogênio tecidual no grupo HPB e CaP. O gráfico representa a média da concentração de estradiol quantificada por ELISA e é expresso em pg/g de tecido prostático. $P=0,029$; $n=15$.

5.10 Expressão gênica do ER α

A expressão gênica do ER α foi comparada entre as amostras de câncer de próstata e as amostras de hiperplasia prostática benigna. O mRNA foi avaliado por q-PCR e normalizado pela β 2-microglobulina, conforme ilustrado na Figura 17.

O receptor ER α foi expresso tanto no tecido de HPB quanto no tecido de CaP. O resultado mostra uma maior expressão do gene ER α nas amostras de câncer de próstata com mediana 1,02 (0,89 - 1,16) quando comparado com o tecido hiperplásico benigno de próstata com mediana 0,67 (0,56 - 0,86).

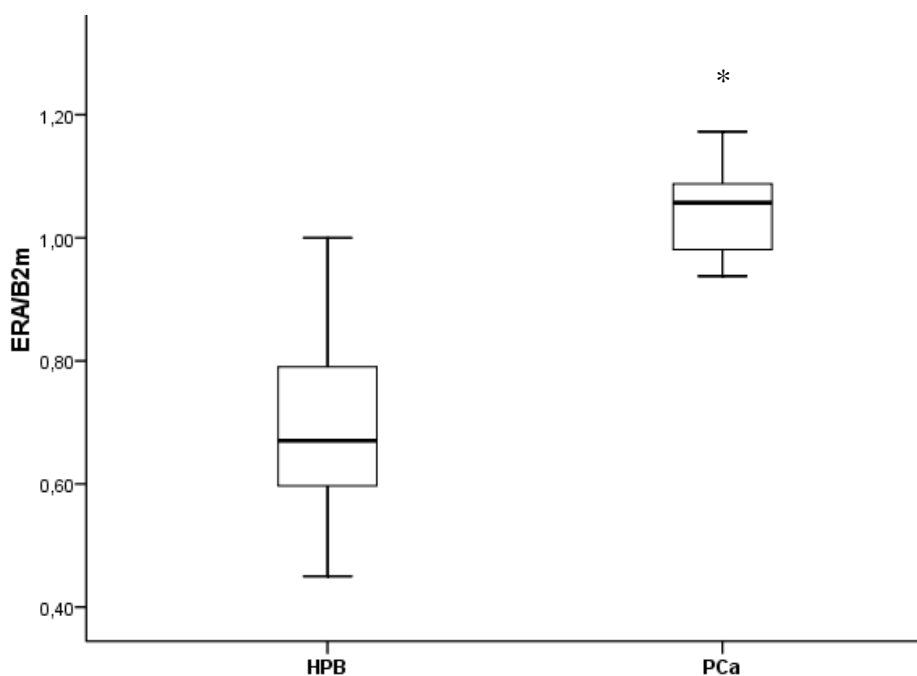
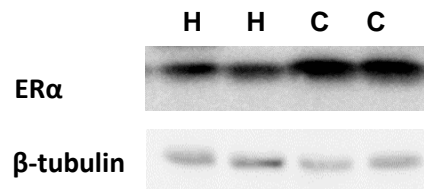


Figura 17. Expressão gênica do ER α em amostras de HPB e CaP. Dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil dos níveis de ER α corrigidos pelos níveis de β 2m. O método estatístico utilizado foi o teste de Mann-Whitney e o resultado encontrado foi diferente significativamente. $P = 0,003$. $n=18$.

5.11 Expressão proteica do ER α

Os níveis proteicos da ER α estão ilustrados na Figura 18. A expressão proteica do receptor ER α está aumentada no grupo CaP com média $174,41 \pm 27,15$ quando comparado com o grupo HPB com média $46,56 \pm 4,08$. Os dados estão representados graficamente como média e erro padrão dos níveis proteicos de ER α corrigidos pela β -tubulina.

A)



B)

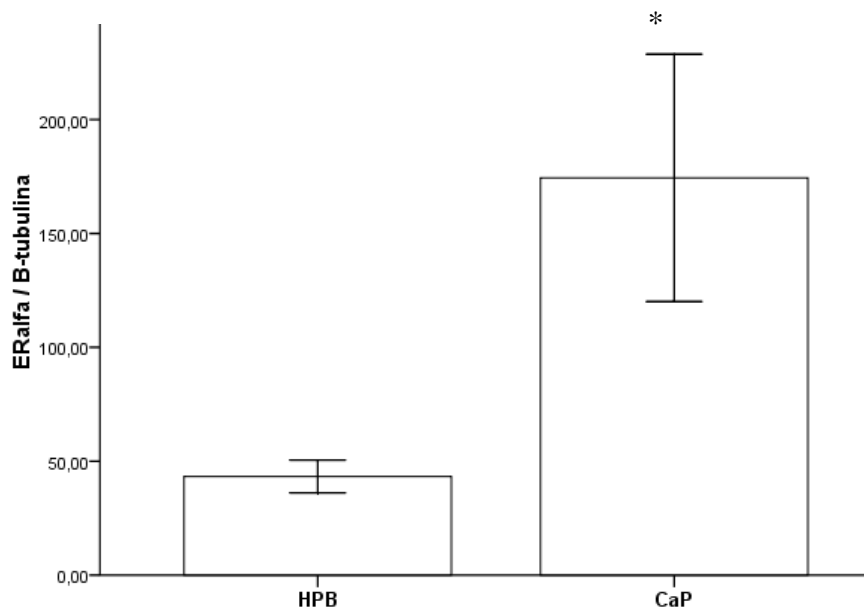


Figura 18. Níveis proteicos do ER α . (A) Imagem representativa de ER α e β -tubulina onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico expressa a relação ER α / β -tubulina; diferença significativa entre os grupos, $P=0,002$; $n=10$.

5.12 Localização do ER α no tecido prostático

A localização do ER α e sua intensidade foram avaliadas no tecido de HPB e de CaP pela técnica de imunofluorescência. Os resultados estão representados na Tabela 4.

Não há diferença na intensidade de fluorescência do ER α entre o estroma e o epitélio no tecido de HPB. No entanto, no tecido de CaP a intensidade do ER α é maior no tecido estromal do que no epitelial. As medidas de colocalização do ER α em relação ao núcleo mostram que este receptor está positivamente colocalizado no núcleo tanto no tecido de HPB quanto de CaP, sendo esta colocalização maior no núcleo no câncer de próstata, conforme evidenciado pelos coeficientes de correlação de Pearson, Manders e de intensidade (ICQ). A Figura 19 representa o ER α no tecido estromal e a Figura 20 representa o ER α no tecido epitelial. As Figuras mostram em 1) imagem da coloração para núcleo em azul; em 2) imagem da coloração para estroma (vimentina) ou epitélio (citoqueratina) em vermelho; em 3) imagem da coloração para o ER α em verde; em 4) imagem composta com todas as colorações – merge e em 5) imagem da colocalização do ER α em relação ao núcleo.

Tabela 05. Medidas de intensidade de fluorescência do ER α no estroma e epitélio de HPB e CaP e sua colocalização em relação ao núcleo.

| | HPB estroma | HPB epitélio | CaP estroma | CaP epitélio |
|---|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Intensidade | 202.393 | 229.797 | 547.552 | 116.871 |
| Coefficiente de Pearson (Rr) núcleo* | 0,201 | 0,275 | 0,314 | 0,464 |
| Coefficiente de Manders (r) núcleo** | 0,561 | 0,603 | 0,689 | 0,701 |
| ICQ núcleo*** | 0,148 | 0,147 | 0,196 | 0,244 |

Varição *Rr = 1 a -1; **r = 0 a 1; ***ICQ= 0,5 a -0,5.

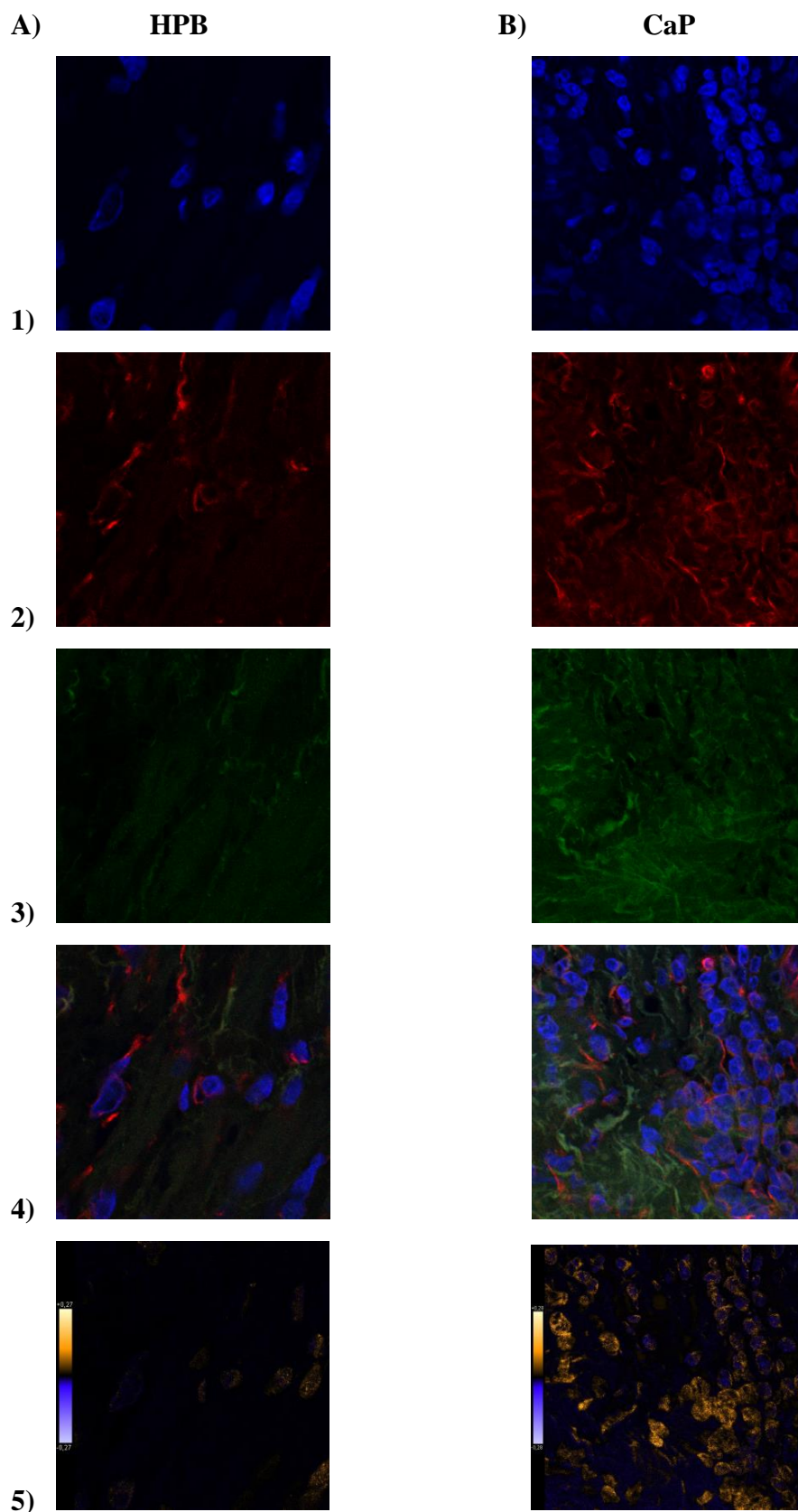


Figura 19. ER α no estroma do tecido de HPB e CaP. Em A) HPB e em B) CaP. Em 1) coloração azul para núcleo, 2) coloração vermelha para vimentina, 3) coloração verde para ER α , 4) merge e em 5) colocalização do ER α em relação ao núcleo. Tamanho da imagem 70.518 μm x 70.518 μm .

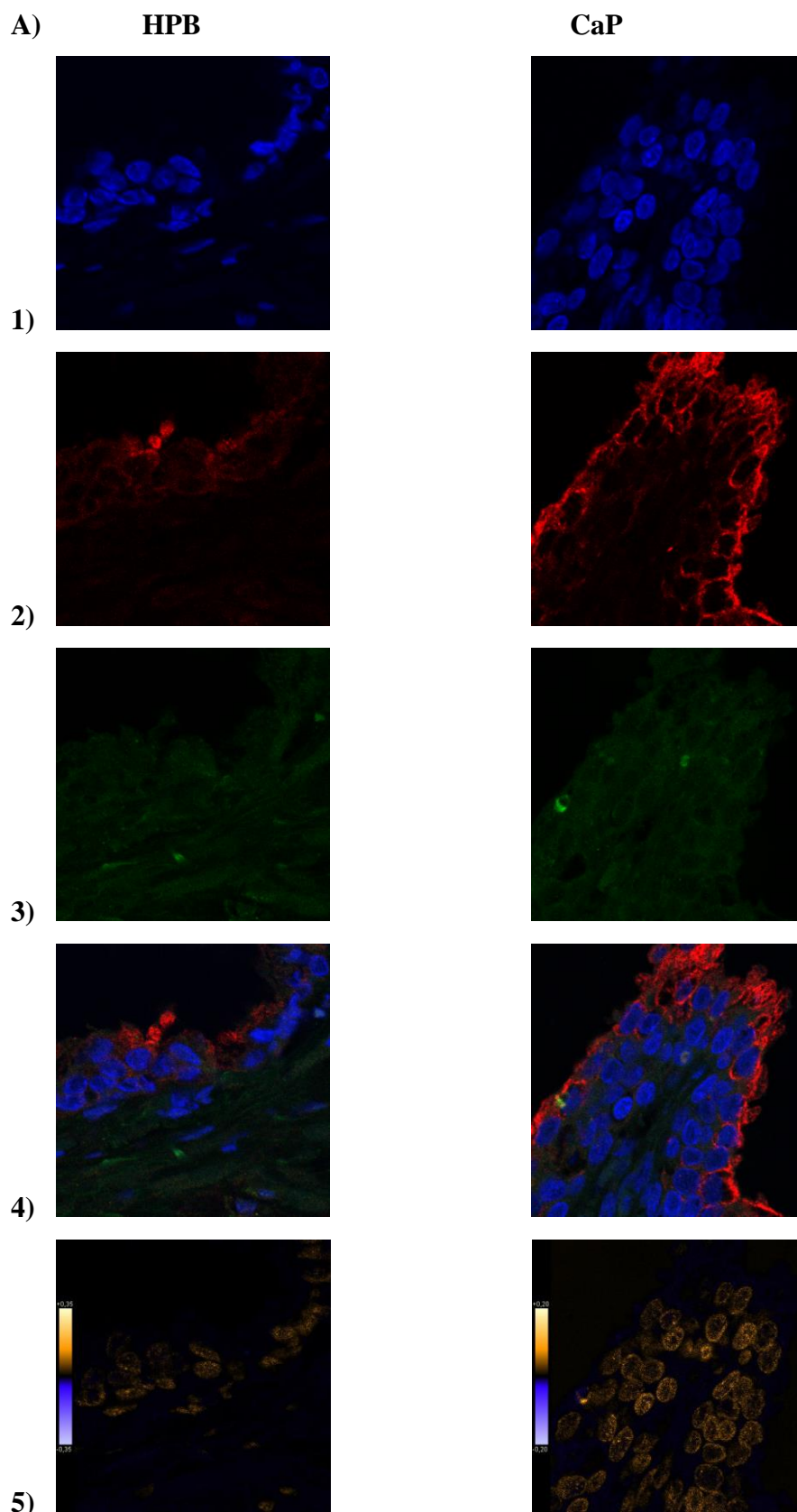


Figura 20. ER α no epitélio de tecido de HPB e CaP. Em A) HPB e em B) CaP. Em 1) coloração azul para núcleo, 2) coloração vermelha para citoqueratina, 3) coloração verde para ER α , 4) merge e em 5) colocalização do ER α em relação ao núcleo. Tamanho da imagem 70.518 μm x 70.518 μm .

5.13 Expressão proteica da PI3K

Os níveis proteicos da PI3K estão ilustrados na Figura 21. A expressão proteica da PI3K está aumentada no grupo CaP com média $215,54 \pm 63,70$ quando comparado com o grupo HPB com média $42,24 \pm 6,19$. Os dados estão representados graficamente como média e erro padrão dos níveis proteicos de PI3K corrigidos pela β -tubulina.

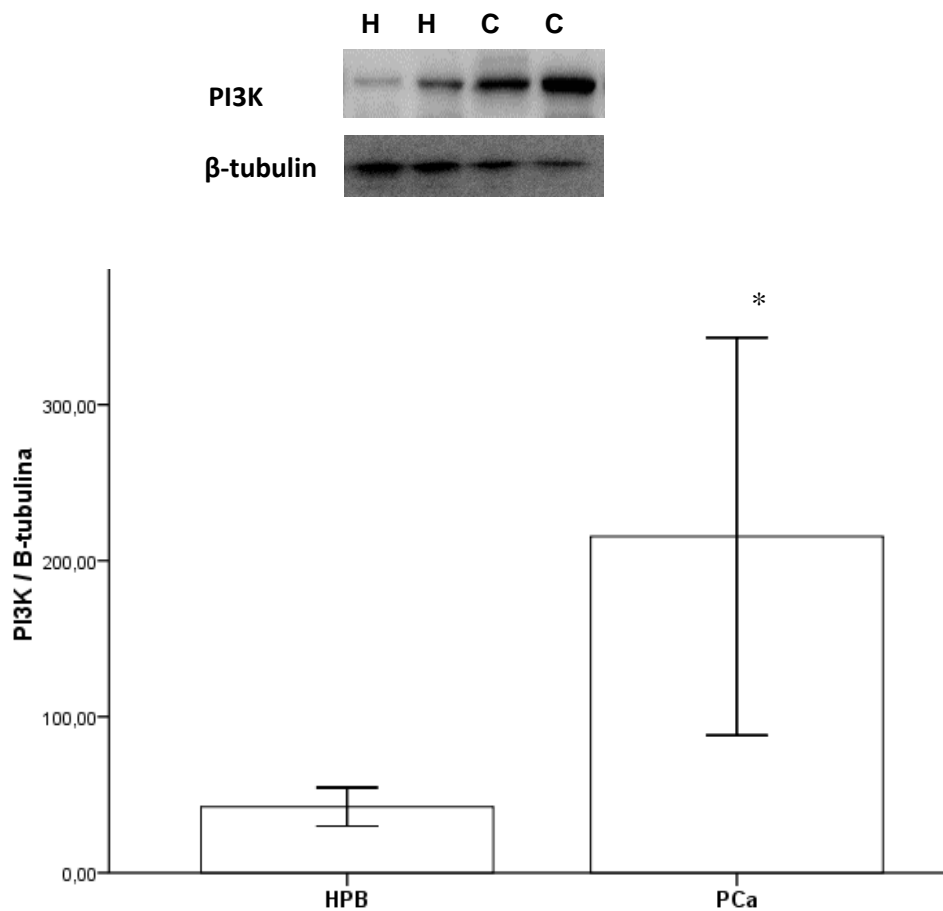
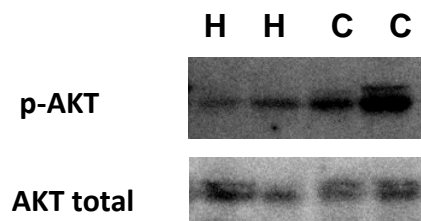


Figura 21. Níveis proteicos da PI3K. (A) Representação das bandas de PI3K e β -tubulina onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico expressa a relação PI3K / β -tubulina, diferença significativa entre os grupos, $P=0,002$; $n=10$.

5.14 Ativação da AKT

A ativação da proteína AKT está ilustrada na Figura 22. A fosforilação da AKT está aumentada no grupo CaP com mediana 0,350 (0,347 – 0,618) quando comparado com o grupo HPB com mediana 0,099 (0,074 – 0,141).

A)



B)

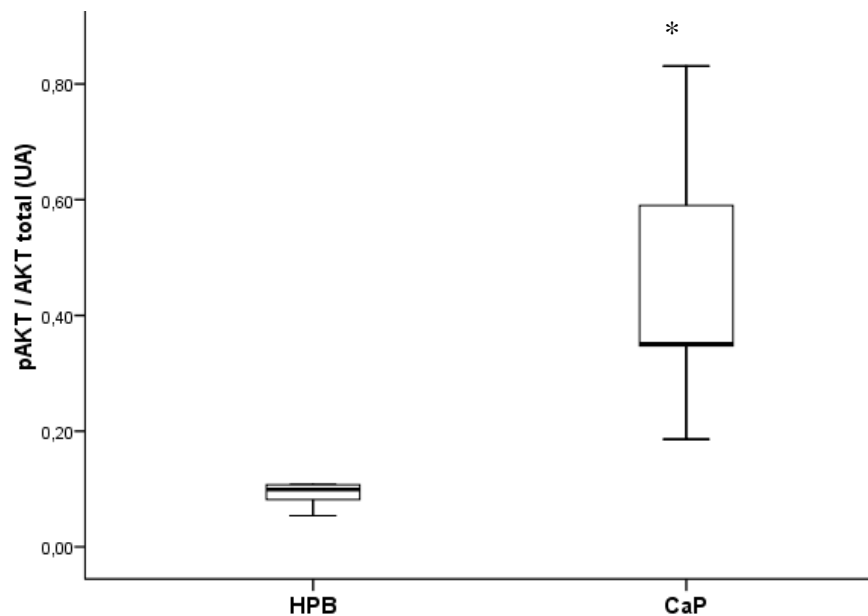


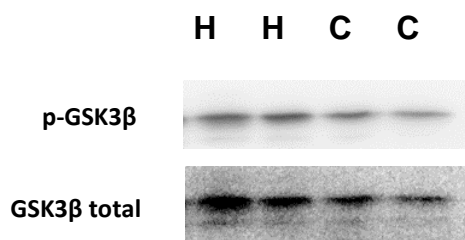
Figura 22. Ativação da proteína AKT. (A) Imagem representativa da AKT fosforilada e AKT total onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico representa a mediana e intervalo interquartil dos níveis proteicos de p-AKT corrigidos pela AKT total. $P=0,004$; $n=10$.

5.15 Ativação da GSK3 β

Os níveis proteicos de GSK3 β estão ilustrados na Figura 23. A fosforilação da GSK3 β está diminuída no grupo CaP com mediana 1,171 (0,885 – 1,260) quando comparado com o grupo HPB com mediana 1,587 (1,451 – 1,927).

A fosforilação aumentada da GSK3 β na HPB indica que esta proteína está menos ativada neste tecido já que esta proteína é ativa na sua forma não-fosforilada.

A)



B)

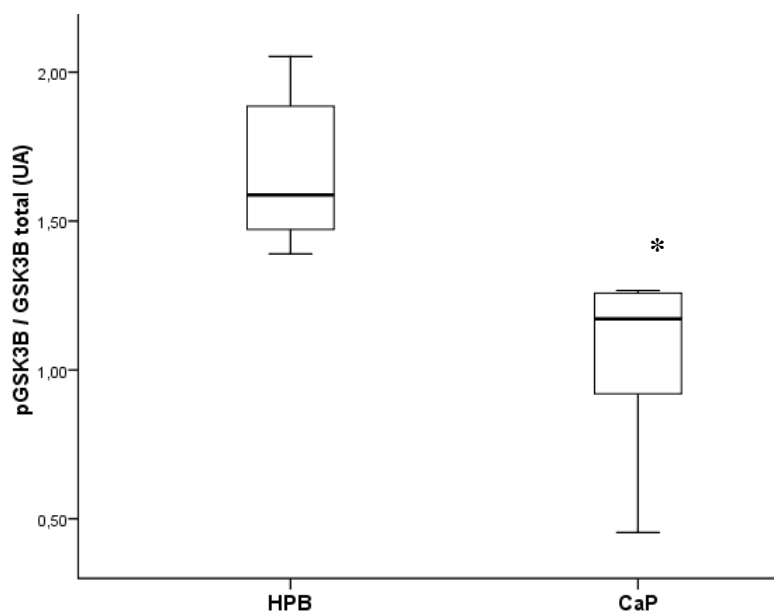
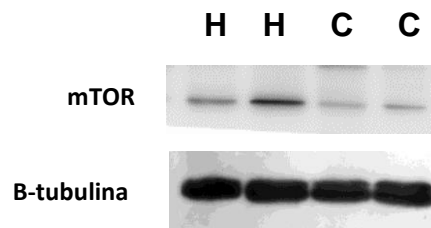


Figura 23. Ativação da proteína GSK3 β . (A) Imagem representativa de GSK3 β fosforilada e GSK3 β total onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico representa mediana e intervalo interquartil dos níveis proteicos de p-GSK3 β corrigidos pela GSK3 β total, diferença significativa entre os grupos, $P=0,002$; $n=10$.

5.16 Expressão proteica da mTOR

Os níveis proteicos da mTOR estão ilustrados na Figura 24. A expressão proteica da mTOR está diminuída no grupo CaP com média $50,47 \pm 8,43$ quando comparado com o grupo HPB com média $88,69 \pm 10,39$.

A)



B)

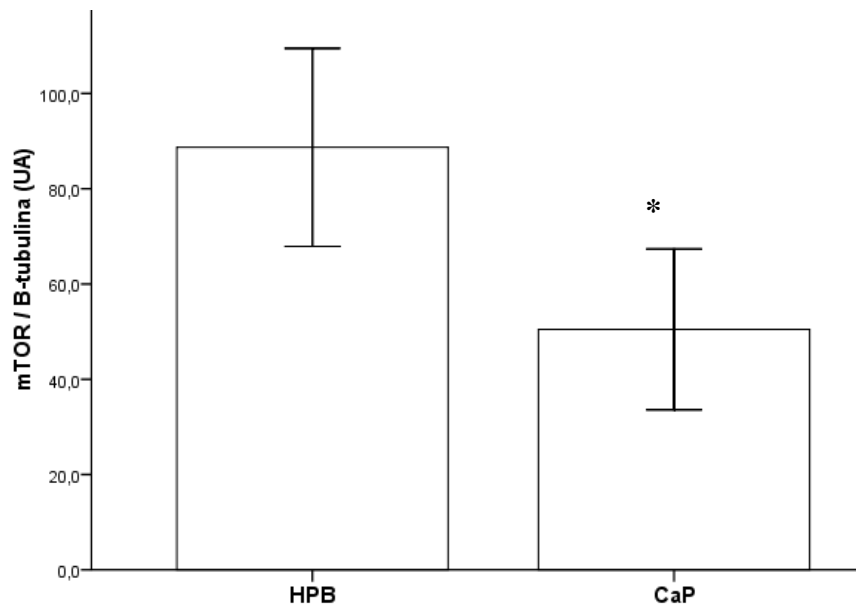


Figura 24. Níveis proteicos da mTOR. (A) Imagem representativa de mTOR e β -tubulina onde H = hiperplasia e C= câncer (B) O gráfico representa a média e erro padrão dos níveis proteicos de mTOR corrigidos pela β -tubulina, diferença significativa entre os grupos, $P=0,018$; $n=10$.

5.17 Expressão gênica do ER β total

A expressão gênica do ER β total foi comparada entre as amostras de câncer de próstata e as amostras de hiperplasia prostática benigna. O mRNA foi avaliado por q-PCR e normalizado pela β 2 microglobulina, conforme ilustrado de forma representativa na Figura 25.

O resultado mostra uma maior expressão do gene ER β total nas amostras de câncer de próstata com mediana 0,383 (0,083 - 6,64) quando comparado com o tecido hiperplásico benigno de próstata com mediana 0,029 (0,0066 - 0,346).

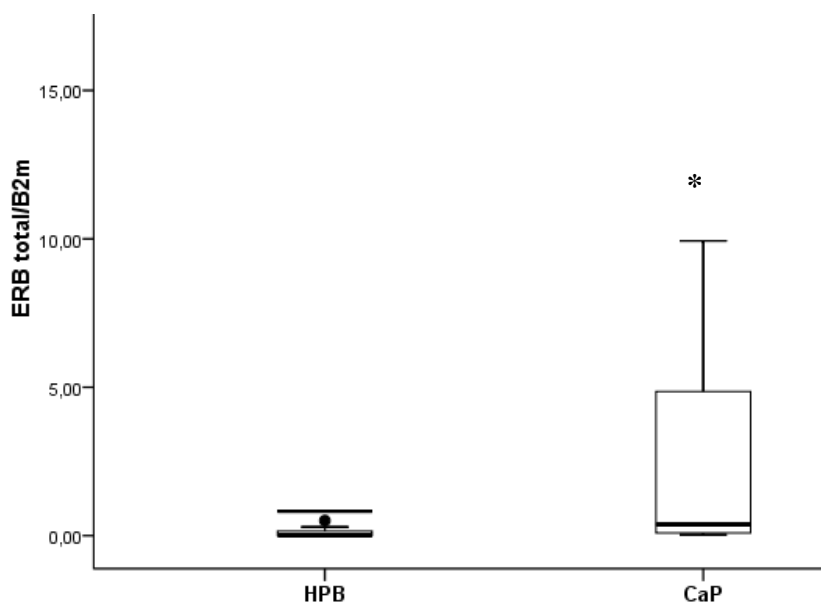
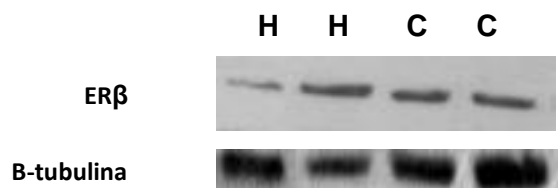


Figura 25. Expressão gênica do ER β total em amostras de HPB e CaP. Dados estão representados como mediana e intervalo interquartil (25 -75) dos níveis de ER β total corrigido pelos níveis de β ₂m. O método estatístico utilizado foi o teste de Mann-Whitney e o resultado encontrado foi diferente significativamente com $P = 0,013$; n=18.

5.18 Expressão proteica do ER β total

Os níveis proteicos do receptor ER β estão ilustrados na Figura 26. Não há diferença na expressão proteica do receptor ER β entre os grupos. O grupo HPB apresentou média $1,43 \pm 0,119$ e o grupo CaP apresentou média $1,44 \pm 0,2$.

A)



B)

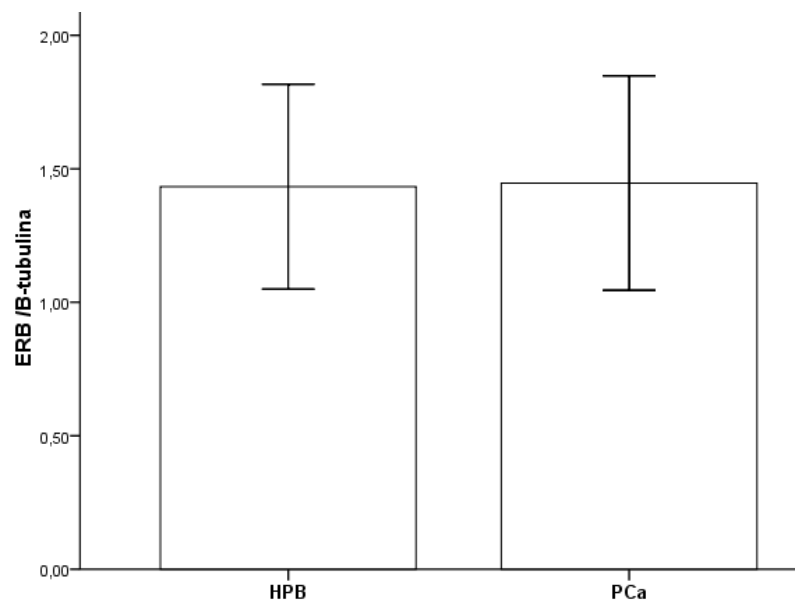


Figura 26. Níveis proteicos do ER β total. (A) Imagem representativa das bandas de ER β e β -tubulina onde H = hiperplasia e C= câncer (B) Os dados estão representados graficamente como média e erro padrão dos níveis proteicos de ER β corrigidos pela β -tubulina, não há diferença significativa entre os grupos, $P= 0,839$; $n=10$.

5.19 Expressão gênica do ER β 1 e ER β 6

Houve expressão da isoforma ER β 1 e ER β 6 tanto no tecido de hiperplasia prostática benigna quanto no tecido de câncer de próstata. A expressão gênica da isoforma ER β 1 e ER β 6 foi comparada entre as amostras de CaP e as amostras de HPB. O resultado representado na Figura 27 mostra uma menor expressão do gene ER β 1 e ER β 6 no tecido de câncer de próstata com mediana 0,027 (0,013 - 0,037) quando comparado com o tecido de hiperplasia prostática benigna com mediana 0,738 (0,066 - 4,55).

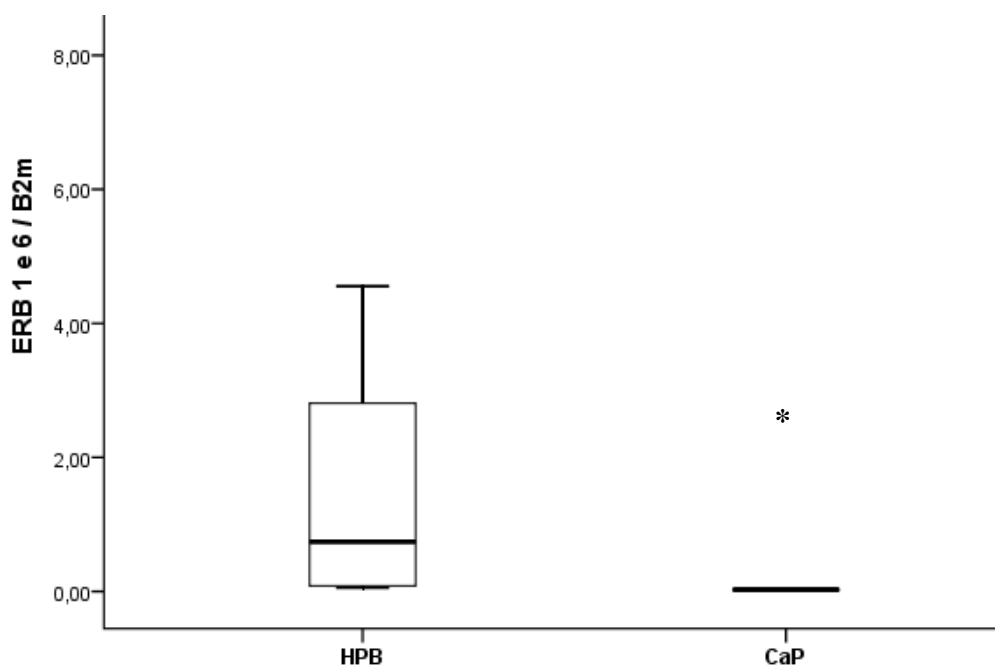


Figura 27. Expressão gênica da isoforma ER β 1 e ER β 6. A análise foi representada graficamente como mediana e intervalo interquartil (25 -75) dos níveis de ER β e ER β 6 total corrigido pelos níveis de β ₂m. O método estatístico utilizado foi o teste de Mann-Whitney e o resultado encontrado foi diferente significativamente com $P = 0,001$; $n=18$.

5.20 Expressão gênica do ERβ2

A Figura 28 ilustra o resultado da expressão gênica da isoforma ERβ2 medida pela técnica de PCR em tempo real. A expressão gênica da isoforma ERβ2 está aumentada no grupo CaP com média $0,173 \pm 0,038$ quando comparado com o grupo HPB com média $0,0711 \pm 0,016$.

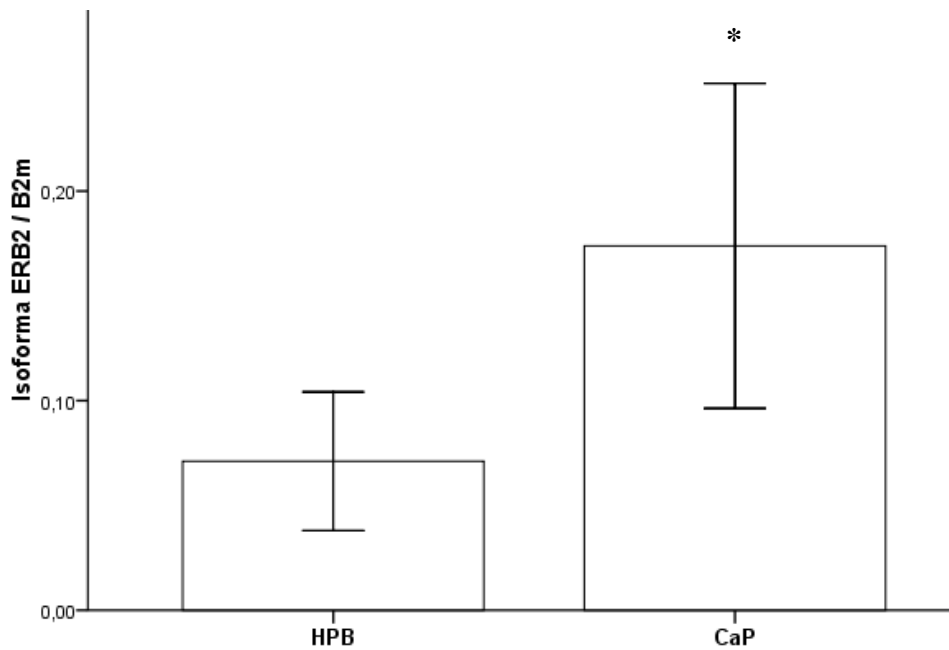


Figura 28. Expressão gênica da isoforma ERβ2 em amostras de HPB e CaP. Os dados estão representados graficamente como média e erro padrão da média dos níveis de mRNA da isoforma ERβ2 corrigidos pela β2-microglobulina. O teste estatístico utilizado foi o Teste T e o resultado foi significativo, $P = 0,003$. $n=18$.

5.21 Expressão gênica das isoformas ERβ3 e ERβ4

Não foi detectada a expressão da isoforma ERβ3 e da isoforma ERβ4 nas amostras de tecido de HPB e de CaP analisadas pela técnica de PCR Real Time.

5.22 Expressão gênica da isoforma ERβ5

A Figura 29 ilustra o resultado da expressão gênica da isoforma ERβ5. Esta isoforma foi expressa em ambos os grupos. A expressão gênica da isoforma ERβ5 está aumentada no grupo câncer de próstata com média $0,139 \pm 0,020$ quando comparado com o grupo hiperplasia prostática benigna com média $0,046 \pm 0,005$.

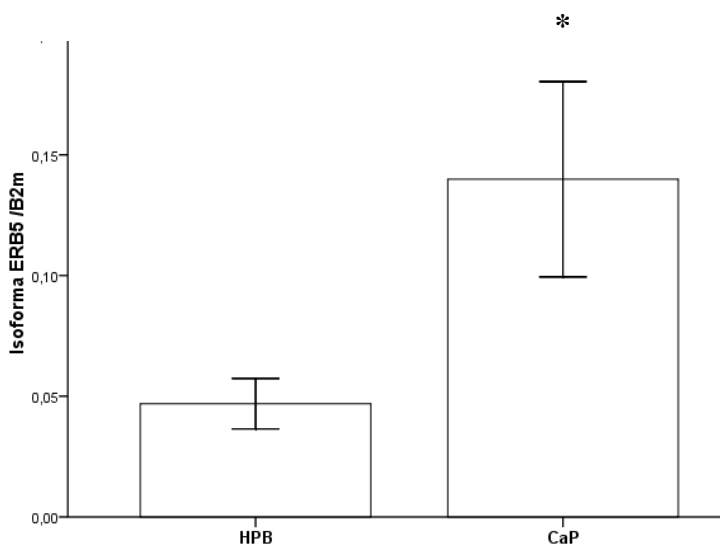


Figura 29. Expressão gênica da isoforma ERβ5. Os dados estão representados graficamente como média e erro padrão da média dos níveis de mRNA da isoforma ERβ5 corrigidos pela β2-microglobulina. Teste T e o resultado foi significativo, $P = 0,015$; $n=18$.

5.23 Correlação no câncer de próstata

A Tabela 05 mostra os resultados obtidos para o teste de correlação de Spearman realizado entre as proteínas avaliadas e o escore de Gleason nas amostras de CaP.

Tabela 06. Resultados do teste de correlação de Spearman.

| | p38 α | ERK1/2 | JNK | c-JUN | ER α | GPER | PI3K | AKT | mTOR | GSK3 β |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Gleason | -0,844 ¹ | -0,866 ¹ | +0,834 ¹ | +0,822 ¹ | +0,857 ¹ | +0,784 ¹ | +0,819 ¹ | +0,786 ¹ | -0,805 ¹ | -0,760 ¹ |
| | 0,001 ² | 0,003 ² | 0,001 ² | 0,007 ² | 0,001 ² | 0,007 ² | 0,001 ² | 0,002 ² | 0,002 ² | 0,003 ² |
| p38α | | +0,929 ¹ | -0,645 ¹ | -0,857 ¹ | -0,700 ¹ | -0,567 ¹ | -0,850 ¹ | -0,783 ¹ | +0,382 ¹ | +0,874 ¹ |
| | | 0,001 ² | 0,032 ² | 0,014 ² | 0,016 ² | NS (0,112) ² | 0,004 ² | 0,003 ² | NS (0,276) ² | 0,001 ² |
| ERK1/2 | | | -0,617 ¹ | -0,429 ¹ | -0,683 ¹ | -0,786 ¹ | -0,524 ¹ | -0,633 ¹ | +0,717 ¹ | +0,750 ¹ |
| | | | NS (0,077) ² | NS (0,397) ² | 0,042 ² | 0,021 ² | NS (0,183) ² | NS (0,067) ² | 0,030 ² | 0,020 ² |
| JNK | | | | +0,700 ¹ | +0,706 ¹ | +0,509 ¹ | +0,727 ¹ | +0,818 ¹ | -0,725 ¹ | -0,709 ¹ |
| | | | | 0,036 ² | 0,010 ² | NS (0,110) ² | 0,011 ² | 0,001 ² | 0,005 ² | 0,007 ² |
| c-JUN | | | | | +0,717 ¹ | +0,714 ¹ | +0,700 ¹ | +0,667 ¹ | -0,238 ¹ | +0,786 ¹ |
| | | | | | 0,030 ² | NS (0,071) ² | NS (0,036) ² | NS (0,071) ² | NS (0,570) ² | 0,021 ² |
| ERα | | | | | | +0,721 ¹ | +0,736 ¹ | +0,811 ¹ | -0,700 ¹ | -0,825 ¹ |
| | | | | | | 0,019 ² | 0,010 ² | 0,001 ² | 0,016 ² | 0,001 ² |
| GPER | | | | | | | +0,643 ¹ | +0,455 ¹ | -0,745 ¹ | -0,509 ¹ |
| | | | | | | | NS (0,086) ² | NS (0,187) ² | 0,013 ² | NS (0,110) ² |
| PI3K | | | | | | | | +0,806 ¹ | -0,297 ¹ | -0,855 ¹ |
| | | | | | | | | 0,005 ² | NS (0,405) ² | 0,002 ² |
| AKT | | | | | | | | | | -0,879 ¹ |
| | | | | | | | | | | 0,001 ² |

¹Coefficiente de correlação de Spearman. ² Valor de *P* teste de correlação de Spearman. NS, não significativo.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que há correlação positiva entre o escore de Gleason e os receptores de estrogênio ER α e GPER. Também as proteínas JNK, c-JUN, PI3K e AKT se correlacionam positivamente com o escore de Gleason no câncer de próstata. Além disso, há uma correlação negativa entre o escore de Gleason e as proteínas p38 α , ERK1/2, mTOR e GSK3 β .

O receptor de estrogênio ER α , além de se correlacionar positivamente com o escore de Gleason, também está correlacionado com o GPER e com as proteínas JNK, c-JUN, PI3K e AKT. Ainda, este receptor se correlaciona negativamente com as proteínas p38 α , ERK1/2, mTOR e GSK3 β . Já o GPER, além de se correlacionar positivamente com o escore de Gleason e com o ER α , correlaciona-se negativamente com a ERK1/2 e a mTOR no câncer de próstata.

A ERK1/2, além de se correlacionar negativamente com o escore de Gleason e ambos receptores de estrogênio (ER α e GPER), apresentou o mesmo comportamento em relação à p38 α . Além disso, a ERK1/2 se correlaciona positivamente com a mTOR e GSK3 β .

O resultado da correlação de Spearman para a JNK mostrou que esta se correlaciona positivamente com o escore de Gleason, ER α , PI3K, AKT e c-JUN e negativamente com a p38 α , ERK1/2, mTOR e GSK3 β . Já a c-JUN, se correlaciona negativamente com a p38 α e positivamente com o escore de Gleason, JNK1/2, GSK3 β e ER α .

A p38 α se correlaciona positivamente com a ERK1/2 e negativamente com o escore de Gleason, JNK1/2, c-JUN, ER α , PI3K e AKT.

As proteínas PI3K e AKT apresentam o mesmo padrão de correlação, além de se correlacionar positivamente entre si, ambas mostraram correlação positiva com o escore de Gleason, JNK1/2 e ER α . Além disso, ambas se correlacionam negativamente com a p38 α e GSK3 β .

A mTOR mostrou correlação positiva somente com a ERK1/2 e negativa com o escore de Gleason, GPER, JNK e ER α . Já a GSK3 β se correlaciona positivamente com a p38 α , ERK1/2 e c-JUN e negativamente com o escore de Gleason, ER α , PI3K, JNK e AKT.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram aumento na expressão gênica e proteica do receptor de estrogênio GPER, maior ativação da proteína JNK1/2 e maior expressão da proteína c-JUN no grupo câncer de próstata (CaP) em relação ao grupo hiperplasia prostática benigna (HPB). Entretanto, as proteínas ERK1/2 e p38 α estão menos ativas no CaP e mais ativas no grupo HPB. Além disso, os resultados mostraram maior concentração de estradiol, maior expressão gênica e proteica do receptor de estrogênio ER α e da PI3K, maior ativação da AKT e da GSK3 β no câncer de próstata enquanto que a proteína mTOR está mais expressa na hiperplasia prostática benigna. A expressão gênica do receptor ER β total está aumentada no CaP em relação à HPB porém este resultado não se reflete na expressão proteica que não apresentou diferença entre os grupos.

O GPER tem sido estudado em células de câncer que apresentam o receptor de estrogênio ER α , chamadas ER α positivas, tendo sido relacionado à resistência a terapia endócrina nesses tumores. No câncer de endométrio humano, a expressão gênica e a proteica do GPER estão aumentadas quando comparadas ao tecido normal (He *et al.*, 2009).

No câncer de mama, os resultados sobre o GPER são controversos, uma vez que o aumento da sua expressão foi associado com o tamanho do tumor (> 2 cm) e a presença de metástases distantes (Prossnitz *et al.*, 2008). Enquanto, outros estudos realizados em câncer de mama observaram a expressão gênica e a proteica do GPER diminuídas comparadas com o tecido normal (Kuo *et al.*, 2007; Filardo *et al.*, 2006).

Existem poucos estudos sobre o GPER no tecido prostático. Não é do nosso conhecimento outro estudo comparando a localização (estroma/epitélio), a expressão gênica e a proteica deste receptor em tecido prostático de hiperplasia prostática benigna (HPB) e de

câncer de próstata (CaP). Park e colaboradores (2009) avaliaram a expressão gênica e proteica do GPER em células estromais de próstata e de hiperplasia prostática benigna e encontraram uma menor expressão do GPER em células estromais prostáticas de HPB comparadas a células estromais prostáticas normais. Outro estudo avaliou a expressão gênica do GPER em amostras de tecido de câncer de próstata e em tecido normal adjacente ao tumor e mostrou redução do GPER nas amostras de câncer de próstata em relação ao tecido normal (Chan *et al.*, 2010). Os trabalhos citados anteriormente mostraram que, em relação ao tecido prostático normal, ocorre uma diminuição da expressão do GPER nas doenças prostáticas, porém nenhum deles comparou a expressão do GPER entre a HPB e o CaP. Os resultados do presente trabalho mostraram maior expressão do GPER no grupo câncer de próstata. Além disso, a expressão do GPER neste tecido se correlacionou positivamente com o escore de Gleason. Esses resultados sugerem que o GPER pode estar envolvido na sinalização celular que leva ao desenvolvimento do câncer de próstata e participar do mecanismo de formação tumoral uma vez que observamos correlação positiva entre a expressão deste receptor e a agressividade da doença.

A avaliação da intensidade de fluorescência do GPER nos grupos HPB e CaP mostrou maior expressão deste receptor no epitélio quando comparado ao estroma em ambos os grupos. Além disso, o epitélio do CaP, mostrou maior expressão deste receptor entre os grupos. A diferença no padrão de distribuição do GPER entre o compartimento estromal e o epitelial em ambos os grupos, sugere que este receptor exerce sua ação maior no epitélio, podendo participar diretamente na diferenciação do epitélio.

A análise de colocalização do GPER mostrou que este se encontra positivamente colocalizado no núcleo em ambos os grupos, porém esta colocalização é maior no câncer de próstata. Samartzis e colaboradores (2014) avaliaram a disposição do GPER em tecido de carcinoma de mama invasivo e observaram dois padrões de expressão, uma

predominantemente citoplasmática e uma predominantemente nuclear. A expressão citoplasmática foi associada com carcinomas moderadamente diferenciados enquanto que a expressão nuclear foi associada com carcinomas pouco diferenciados. Nossos resultados mostraram que há uma correlação positiva entre a expressão do GPER e o escore de Gleason sugerindo que, assim como na mama, na próstata nós tenhamos a presença de dois padrões de distribuição do GPER e que a localização subcelular distinta tenha um diferente significado biológico ainda não elucidado.

A estimulação do GPER pode ativar a proteína PI3K, o que conseqüentemente ativaria a via de proliferação e anti-apoptose da AKT (Revankar *et al*, 2005). Além disso, o GPER pode mediar a ativação de cinases dependentes de estrogênio, bem como respostas transcricionais. Vias de sinalização moduladas pelo GPER incluem aquelas das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que podem modular eventos nucleares transcricionais e a proliferação celular (Prossnitz *et al.*, 2008).

As proteínas da via de transdução de sinal da MAPK e sua relação com os estrogênios ainda não foram estudadas detalhadamente na próstata, principalmente no que se refere ao câncer de próstata e à hiperplasia prostática benigna. Algumas publicações descrevem os efeitos dos fatores de crescimento, modificadores químicos e androgênios em células prostáticas alterando esta via de sinalização (Huang *et al.*, 2005). No presente estudo, foram avaliadas a expressão e a ativação das proteínas da via MAPKs ERK1/2, p38 α e JNK em tecido prostático de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

Os resultados apresentados aqui mostram que a proteína ERK1/2 está menos ativa no câncer de próstata quando comparado ao tecido de hiperplasia prostática benigna. A ERK1/2 pode estar envolvida nos índices elevados de proliferação relatados na hiperplasia prostática benigna e no câncer de próstata (Royuela *et al.*, 2002). Uzgare e colaboradores (2003) observaram que a ERK1/2 está diferentemente expressa e ativada durante a progressão do

câncer de próstata. A ativação da ERK1/2 ocorre concomitantemente com a proliferação celular epitelial prostática e a iniciação do câncer de próstata enquanto que a inativação é coexistente com o aparecimento de metástases pouco diferenciadas e fenótipo independente de androgênio.

Park e colaboradores (2009) relataram que o GPER está envolvido na via de sinalização estrogênica ativando a ERK1/2 em células estromais de cultura primária de próstata. O mesmo não ocorre em células estromais de cultura primária derivadas de HPB, em que a ativação da ERK1/2 não mostrou ser dependente do GPER, sugerindo que ocorrem mudanças nas células estromais como a perda da expressão do GPER na HPB. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com este estudo porque mostram que há uma menor expressão do GPER no estroma do tecido de HPB em relação ao epitélio de HPB.

Entretanto, em células de linhagem de câncer de próstata PC3, a ativação do GPER pelo agonista G1 inibe o crescimento celular via ativação sustentada da ERK1/2, sugerindo que a ativação da ERK1/2 em células de câncer de próstata com mutação ou ausência de PTEN (inibidor da formação de PIP3) pode ser dependente da ativação do GPER (Chan *et al.*, 2010). Não foi encontrada na literatura referência que relate a relação entre GPER e ERK1/2 em tecido humano de CaP. O presente trabalho mostrou correlação negativa entre a expressão do GPER e da ERK1/2 no câncer de próstata o que sugere que assim como no tecido hiperplásico, avaliado por Park e colaboradores (2009), a ativação da ERK1/2 parece não ser dependente do GPER neste tecido, já que a maior expressão do GPER está relacionada à menor ativação da ERK1/2.

Além disso, a inativação da ERK tem sido relacionada com altos escores de Gleason (8-10) e câncer de próstata pouco diferenciado (Magi-Galluzzi *et al.*, 1997; Malik *et al.*, 2002). Setenta e oito por cento das amostras de câncer de próstata avaliadas no presente estudo apresentaram escore de Gleason ≥ 7 e isto pode estar relacionado à menor ativação da ERK

no grupo câncer de próstata encontrada neste trabalho, já que foi observada uma correlação negativa entre a expressão da ERK1/2 e o escore de Gleason.

Considerando estes dados pode-se sugerir que a ativação da ERK1/2 está relacionada com o índice de proliferação celular na HPB e no CaP e que a diminuição da ativação da ERK1/2 durante a progressão do câncer de próstata pode estar relacionada à perda da diferenciação nesta doença. O trabalho de Lee e colaboradores (2008) corrobora esta hipótese já que mostra que a inativação da ERK pela AKT em células de câncer de próstata leva à perda da diferenciação.

Foi postulado que a determinação da razão pERK/p-p38 pode ser capaz de prever in vivo a predisposição ao câncer, incluindo o de próstata, sugerindo que a diminuição da atividade da ERK nestas células ocorre devido a um *feedback* negativo da p38. Em tumores, a ativação constitutiva da ERK permite uma transição G0-G1-S e a divisão celular. Embora a ERK esteja envolvida principalmente na indução da proliferação e na diferenciação celular, acredita-se que um nível elevado de atividade de p38 seja um regulador negativo do crescimento que, dependendo do sinal de estimulação, pode suprimir a proliferação de células através da inibição de ERK, induzindo a parada em G0-G1 ou provocando a senescência ou apoptose (Aguirre-Ghiso *et al.*, 2003). Entretanto, Royuela e colaboradores (2002) mostraram alta atividade da proteína p38 em tecido prostático normal, podendo tornar-se mais ativo em situações de neoplasia e hiperplasia prostática benigna. Também, foi sugerido que há grande ativação da p38 em neoplasia intraepitelial e tumores bem diferenciados e que esta pode ser perdida em tumores pouco diferenciados (Uzgare *et al.*, 2003; Ricote *et al.*, 2006). De fato, p38 tem papel na diferenciação celular, crescimento, proliferação, sobrevivência, apoptose, regulação de muitos fatores de transcrição, do ciclo celular e mediadores da apoptose (Pearson *et al.*, 2001). Os estudos apresentados acima não relatam qual isoforma da p38 foi avaliada. A isoforma p38 α (analisada no presente estudo) tem sido relacionada com a

supressão da proliferação celular, aumento da morte celular e senescência durante as transformações induzidas por oncogenes (Hui *et al.*, 2007).

Os resultados do presente trabalho mostram menor ativação da p38 α no CaP em relação à HPB, correlação negativa da p38 α com o escore de Gleason e correlação positiva com a ERK1/2 no câncer de próstata. Também foi observado no presente trabalho, correlação negativa entre a expressão de p38 α com a JNK e a c-JUN. A proteína p38 α regula negativamente a proliferação celular por supressão da ativação da via JNK/c-JUN (Junttila *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem que, de fato, a menor expressão de p38 α no CaP pode estar relacionada ao aumento da JNK, da c-JUN e à correlação negativa com o escore de Gleason. O inverso ocorre na HPB onde temos maior expressão de p38 α e menor expressão de JNK e c-JUN em relação ao CaP, sugerindo que o papel pró-apoptótico da p38 α na próstata pode ser determinante no desenvolvimento destas doenças.

Os resultados do presente estudo mostram que a ativação da JNK e a expressão da c-JUN estão aumentadas no CaP comparado ao tecido de HPB. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a expressão destas proteínas e o escore de Gleason no câncer de próstata. A JNK tem sido relacionada ao desenvolvimento, morfogênese, diferenciação celular e morte celular programada (Liu & Lin, 2005). Dependendo da situação, a JNK pode ativar ou desativar proteínas sinalizadoras, resultando em uma resposta celular marcadamente diferente (Bode & Dong, 2007). Royuela e colaboradores (2002) mostraram expressão aumentada da JNK no epitélio prostático maligno em comparação com epitélio normal ou de HPB e que ação a mais provável da JNK no CaP seria a estimulação da proliferação celular. Além disso, a JNK pode estar envolvida nas metástases do câncer de próstata através da sua habilidade em regular a adesão celular, invasão e migração promovendo a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), responsáveis pela degradação da matriz extracelular durante a invasão no câncer de próstata (Chien *et al.*, 2010). Assim como a JNK, o GPER parece estar envolvido

na ativação das metaloproteinases de matriz (Prossnitz *et al.*, 2008). É possível que a ativação da JNK e a expressão aumentada do GPER no câncer de próstata possam atuar sinergicamente ativando as metaloproteinases, um fator que pode facilitar o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases.

A JNK é capaz de ativar várias funções nas células de câncer de próstata, que incluem tanto fatores de transcrição quanto proteínas funcionais. A c-JUN é um substrato importante do processo de fosforilação induzido pela JNK (Bode & Dong, 2007). No presente trabalho foi observada uma expressão proteica aumentada da c-JUN no tecido de câncer de próstata quando comparado ao de hiperplasia prostática benigna. A c-JUN é um importante componente do complexo fator de transcrição AP-1, sendo chave no desenvolvimento da carcinogênese. A ativação da AP-1 pode resultar na ligação ao DNA de vários genes envolvidos na inflamação, proliferação e apoptose (Angel & Karin, 1991). Ouyang e colaboradores (2008) consideram os altos níveis de c-JUN como marcador de câncer de próstata agressivo. Nossos resultados estão de acordo com este estudo, já que foi observada correlação positiva entre a expressão da c-JUN e o escore de Gleason no câncer de próstata, sugerindo que c-JUN promove a tumorigênese na próstata.

Considerados em conjunto, os resultados apresentados aqui sugerem que a expressão aumentada do GPER no câncer de próstata pode atuar sinergicamente com a JNK, ativando metaloproteinases o que pode facilitar o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases. Além disso, na hiperplasia prostática benigna a ativação aumentada da p38 α inibe a ativação da via JNK/c-JUN regulando a proliferação nesta doença. Além disso, o aumento da ativação da ERK1/2 na HPB pode ser responsável pela maior diferenciação celular que ocorre nesta doença quando comparada ao câncer de próstata.

O presente estudo mostrou maior concentração de estradiol no tecido de câncer de próstata (CaP) quando comparado ao tecido de hiperplasia prostática benigna (HPB). Há

evidências consistentes de que o nível de testosterona sérico masculino declina significativamente com a idade, levando a uma associação inversa entre a testosterona circulante e o risco de desenvolvimento de CaP. Além disso, a razão plasmática androgênios/estrogênios parece diminuir com a idade, sugerindo que os estrogênios possam ter participação no câncer de próstata (Carruba, 2007). Não foi encontrada na literatura referência que compare a quantificação de estrogênios (estradiol) em tecido prostático humano de HPB e CaP. Os estrogênios na próstata são provenientes da ação da enzima aromatase sobre a testosterona (Carreau *et al.*, 2008). Estudos prévios do nosso laboratório analisaram a expressão gênica e proteica da aromatase em tecido de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata e não mostraram diferença significativa entre os grupos. Porém, a atividade da enzima aromatase nestes grupos não foi avaliada (Seibel, 2010). Risbridger e colaboradores avaliaram a atividade da enzima aromatase em células de linhagem de hiperplasia prostática benigna (PrEC) e de câncer de próstata (LNCaP, Du145 e PC3) e encontraram maior atividade desta enzima nas células de câncer de próstata (Risbridger *et al.*, 2003). Além disso, a alta atividade da aromatase tem sido relacionada com a indução de adiposidade, síndrome metabólica e doenças prostáticas via sinalização anormal do ER α e do GPER (Williams, 2012). Sugerimos que um aumento da atividade da enzima aromatase diminui os níveis de testosterona e aumenta os níveis prostáticos de estradiol intracelular, o qual por sua vez se liga aos receptores de estrogênio ER α , ER β e GPER estimulando vias de sinalização que podem diretamente induzir a hiperplasia, proliferação celular e mudanças metaplásicas na próstata.

A expressão gênica e a proteica do receptor de estrogênio ER α neste estudo estão aumentadas no grupo CaP em relação ao grupo HPB. Além disso, a análise de imunofluorescência mostrou que o ER α está expresso com maior intensidade no estroma do tecido de câncer de próstata e no núcleo em ambos os grupos. O receptor ER α tem sido

associado às ações adversas do estrogênio na próstata tais como proliferação anormal, inflamação e malignidade. A indução da inflamação pelo ER α pode, também, promover o desenvolvimento da malignidade, bem como estimular a expressão da aromatase que está alterada na malignidade e pode ser induzida por citocinas inflamatórias (Ellem & Risbridger, 2009). Foi descrito que a indução da metaplasia escamosa no epitélio prostático é dependente do ER α e da sua presença tanto no epitélio quanto no estroma (Risbridger *et al.*, 2001). Além disso, foi descrita a presença do ER α tanto no estroma quanto no epitélio da próstata normal (Risbridger *et al.*, 2007). O fato de termos observado maior expressão do ER α no estroma do CaP pode estar diretamente associado à proliferação epitelial nesta doença já que a proliferação epitelial estimulada pelos esteróides na próstata é regulada via receptores presentes no estroma.

Alguns estudos demonstraram expressão gênica aumentada de ER α no câncer de próstata quando comparado à hiperplasia prostática benigna ou tecido prostático normal, porém, esses estudos não avaliaram a expressão proteica do ER α (Ito *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2007). Pasquali e colaboradores avaliaram a expressão gênica e proteica do ER α em amostras de cultura primária de células de câncer de próstata e encontraram uma menor expressão do ER α quando comparada à cultura primária de próstata normal (Pasquali *et al.*, 2001). Apesar de várias evidências relacionando esse receptor com proliferação celular e câncer em vários tecidos, o seu papel no câncer e na hiperplasia de próstata benigna ainda não está bem estabelecido. Conforme os dados da literatura citados acima, os resultados ainda são conflitantes. O presente trabalho mostrou correlação positiva entre a expressão proteica do ER α e o escore de Gleason, sugerindo que este receptor tem papel importante na fisiopatologia desta doença.

O receptor de estrogênio ER α pode ser ativado pelas proteínas PI3K e AKT na ausência de estrogênios. A PI3K aumenta a atividade do domínio dependente de estrogênio

(AF-1) e do domínio independente de estrogênio (AF-2) do receptor enquanto que a AKT aumenta a atividade apenas de AF-1. Além disso, a PI3K utiliza vias dependentes e independentes da proteína AKT para ativar o ER α (Campbell *et al.*, 2001). No presente trabalho foi observada maior expressão proteica de PI3K e maior atividade da AKT no tecido de câncer de próstata quando comparados ao tecido de hiperplasia prostática benigna. Considerando esses resultados podemos sugerir que são possíveis três maneiras distintas de ativação do receptor de estrogênio ER α no câncer de próstata: pela maior concentração de estrogênio, pela maior expressão proteica de PI3K e pela maior atividade da AKT.

O acelerado crescimento do tumor prostático e a progressão da doença têm sido atribuídos à atividade aumentada da AKT (Graff *et al.*, 2000). Além disso, o aumento de ativação da AKT tem sido associada à presença de formas avançadas de câncer de próstata, com alto grau de Gleason sendo acompanhada da diminuição da atividade da ERK (Kreisberg *et al.*, 2004; Ayala *et al.*, 2004). O presente trabalho corrobora estes estudos, pois mostrou correlação positiva entre a PI3K e a AKT com o escore de Gleason. A AKT pode diretamente fosforilar e inativar a Raf-1, inativando a ERK em células de câncer de próstata. Devido à inativação da ERK a célula perde sua habilidade para diferenciação enquanto que a alta atividade da AKT confere uma sobrevivência celular a mais para a célula prostática o que poderia ser um dos fatores para o desenvolvimento do câncer de próstata (Lee *et al.*, 2008). Além disso, a ativação da AKT inibe a proteína GSK3 β (Mulholland *et al.*, 2006).

A GSK3 β está envolvida em vários processos celulares, tais como metabolismo do glicogênio, sinalização da insulina, proliferação celular, função neuronal e oncogênese (Rayasam *et al.*, 2009). A GSK3 β é uma enzima cinase que é constitutivamente ativa e é inativada, por fosforilação, em resposta a sinais celulares (Doble & Woodgett, 2003). A GSK3 β está sujeita a múltiplos mecanismos de regulação e a fosforilação da Ser 9 é provavelmente o mais estudado. Várias cinases são capazes de mediar essa modificação, entre

elas a AKT, a p38 e a ERK (Luo, 2009). Um dos mais bem conhecidos substratos da GSK3 β é a β -catenina e a GSK3 β é um importante regulador da via de sinalização da Wnt/ β -catenina (Lustig & Behrens, 2003).

O presente estudo mostrou que a GSK3 β está mais fosforilada na hiperplasia prostática benigna, estando, portanto, mais ativa no câncer de próstata. Neste trabalho foram analisadas três proteínas cinases que regulam a GSK3 β (AKT, p38 α e JNK) e foi observado que duas delas (p38 α e ERK) estão mais ativas na hiperplasia prostática benigna, o que poderia explicar a maior fosforilação da GSK3 β neste tecido.

O papel da GSK3 β na tumorigênese e na progressão do câncer é controverso. Uma vez que a GSK3 β regula negativamente muitas proteínas proto-oncogênicas e reguladoras do ciclo celular, ela tem sido considerada como supressora de tumor. O câncer de pele e o câncer de mama têm sido relacionados com a inativação da GSK3 β que é acompanhada pelo aumento excessivo da ciclina D1 e da β -catenina, sugerindo sua relação com a desregulação da via Wnt/ β -catenina (Ma *et al.*, 2007; Farago *et al.*, 2005).

Em contraste com seu papel de supressora de tumor, alguns estudos sugerem que a GSK3 β pode na realidade promover a tumorigênese e o desenvolvimento do câncer. Altos níveis de GSK3 β foram observados em carcinomas de ovário, colo e pâncreas (Ougolkov & Billadeau, 2006). Zhu e colaboradores (2011) observaram que a GSK3 β reduz o crescimento tumoral em linhagens de CaP. O presente trabalho mostrou correlação negativa entre a ativação da GSK3 β e o escore de Gleason, corroborando este estudo.

No presente trabalho foi observada uma maior expressão proteica da mTOR no tecido de HPB quando comparado ao tecido de CaP e correlação negativa com o escore de Gleason. Ko e colaboradores (2014) analisaram a mTOR por imunistoquímica em tecido prostático normal, câncer de próstata e neoplasia intraepitelial prostática de alto grau e encontraram maior expressão da mTOR total (mTOR t) e da mTOR fosforilada (p-mTOR) no tecido de

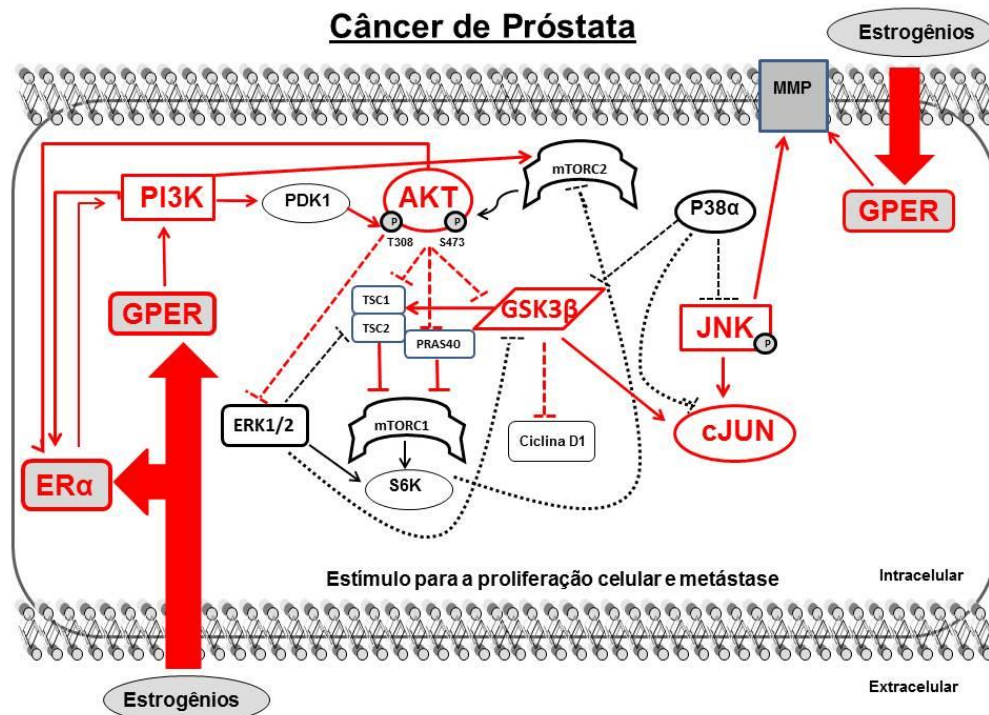
neoplasia intraepitelial prostática de alto grau, porém não houve diferença na razão p-mTOR/mTORt entre os grupos.

Altos níveis de atividade da mTOR resulta na desregulação do tamanho celular, do tamanho do órgão e do controle do crescimento celular. A desregulação do maquinário de síntese de proteínas através da mTOR pode gerar sinais de progressão do ciclo celular que contribuem para o câncer (Majumder & Sellers, 2005) mas também são fatores presentes na hiperplasia e coincidem com o aumento da atividade da mTOR, conforme demonstrado neste estudo.

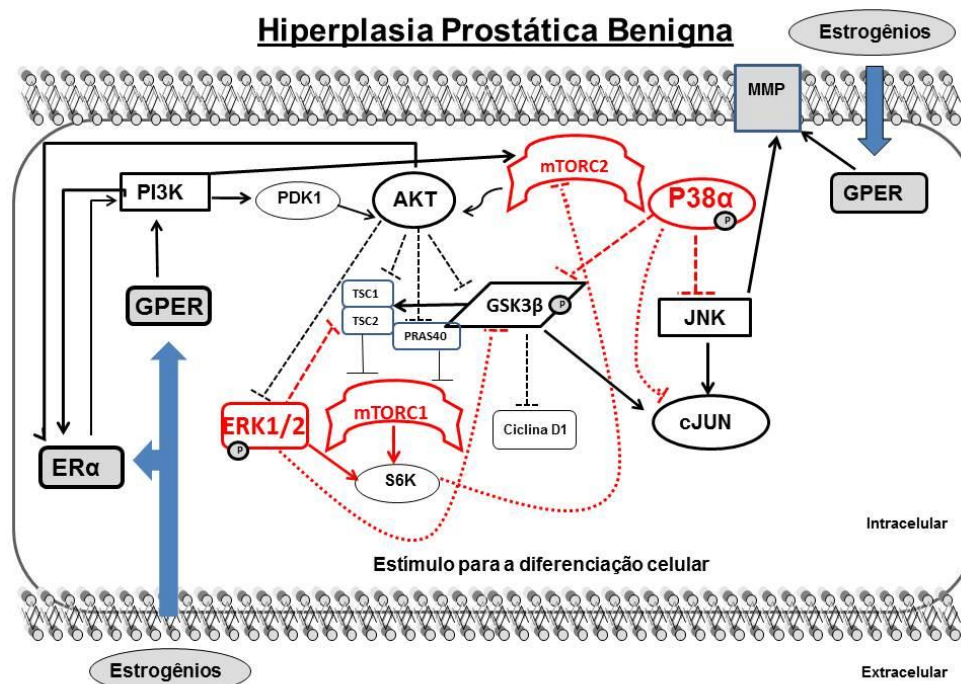
Na Figura 30, propomos possíveis mecanismos de atuação do estrogênio através dos seus receptores, ER α e GPER sobre as vias de sinalização MAPK e PI3K no câncer de próstata e na hiperplasia prostática benigna.

No câncer de próstata temos maior concentração de estrogênio no tecido prostático do que na hiperplasia. Este estrogênio liga-se aos seus receptores ER α e GPER presentes também em maior quantidade neste tecido. Ambos receptores ativados podem atuar sobre a via da PI3K ativando a AKT. Ao mesmo tempo, a própria proteína PI3K e a AKT podem diretamente ativar o receptor ER α , independentemente da presença do estrogênio. A AKT e as proteínas p38 α e ERK fosforilam a GSK3 β regulando-a negativamente. No câncer de próstata, temos maior ativação da AKT e menor ativação das proteínas p38 α e ERK, resultando na permanência da GSK3 β na sua forma menos fosforilada, ou seja, na sua forma ativa. A GSK3 β atua diretamente sobre os inibidores do complexo mTORC1 (TSC1/TSC2), levando à inibição da mTORC1. Além disso, a GSK3 β e a JNK estimulam a proteína c-JUN, relacionada ao desenvolvimento da carcinogênese. A JNK é regulada negativamente pela p38 α . A p38 α menos ativa no câncer de próstata, resulta na maior ativação da JNK. A JNK além de ativar a c-JUN promove a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e pode

atuar sinergicamente com o GPER, o que pode facilitar o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases.



A)



B)

Figura 30. Proposta de mecanismo de ação dos hormônios estrogênios no câncer de próstata em A e na hiperplasia prostática benigna em B.

Na hiperplasia prostática benigna temos a presença de estrogênio e de seus receptores ER α e GPER, porém em menor quantidade do que no câncer de próstata. Ambos receptores não estão estimulando a via PI3K/AKT. Na HPB temos diminuição na expressão da PI3K e menor ativação da AKT, proteínas classicamente relacionadas ao crescimento e a proliferação celular. Ainda, temos maior ativação da p38 α , proteína que regula negativamente a proliferação celular por supressão da ativação da via JNK/c-JUN. Além disso, a maior ativação da ERK pode ter papel determinante na diferenciação celular na HPB.

Além dos receptores de estrogênio ER α e GPER, nosso estudo avaliou o receptor de estrogênio ER β . Este receptor tem um papel importante no mecanismo de ação do estrogênio na próstata principalmente devido a sua ação sobre o receptor de estrogênio ER α . Recentemente foram descritas novas isoformas do ER β ainda pouco estudadas na próstata.

No presente estudo, os resultados mostraram maior expressão gênica do receptor de estrogênio ER β total no câncer de próstata em relação ao grupo hiperplasia prostática benigna. Porém, a análise da expressão proteica deste receptor em ambos os grupos não apresentou diferença significativa.

O ER β é o receptor de estrogênio predominante na próstata normal. No entanto, parece haver um declínio gradual na sua expressão no desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna e no câncer de próstata invasivo (Hartman *et al.*, 2012). O ER β tem sido relacionado com a supressão da proliferação e promoção da diferenciação no epitélio prostático, sendo expresso tanto no estroma quanto no epitélio da próstata normal (Imamov *et al.*, 2005). Horvath e colaboradores (2001) avaliaram a expressão do ER β por imunistoquímica em tecido de próstata normal, hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata e observaram que a perda da expressão do ER β estava associada com a progressão da doença prostática. Outros autores também tiveram o mesmo resultado (Pasquali *et al.*, 2001; Pravenotti *et al.*, 2007).

Sabe-se que tecidos que expressam ambos os receptores de estrogênio ER β e ER α na mesma célula, tendem a formar heterodímeros deste receptor, tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas (Powell *et al.*, 2012). Além disso, o ER β parece agir como regulador dominante da sinalização estrogênica. A formação de ER α /ER β causa uma redução da ativação transcricional mediada pelo ER α , dependente da concentração de ER α (Matthews & Gustafsson, 2003).

Embora não haja diferença na expressão proteica do ER β entre os grupos HPB e CaP, o estudo deste receptor é relevante uma vez que a formação de heterodímeros pode atenuar os efeitos do ER α . Além disso, o fato de existir uma maior expressão gênica do ER β no câncer de próstata pode estar relacionado a uma resposta fisiológica do organismo a fim de tentar promover a produção deste receptor.

A discrepância entre a expressão do mRNA e a expressão proteica do ER β total tem sido relacionada com a expressão de pelo menos 5 isoformas deste receptor (Smith *et al.*, 2010). Isso se deve ao fato de que alguns estudos não utilizaram anticorpos que fossem específicos para todas as isoformas. Além disso, estudos revelam que a expressão de algumas isoformas do receptor de estrogênio ER β pode ser regulada por regulação transcricional e pós-transcricional (Lee, 2013).

Neste estudo foi avaliada a expressão gênica de 6 isoformas do receptor de estrogênio ER β . As isoformas ER β 1, ER β 2 e ER β 5 têm sido relacionadas com outros tipos de câncer dependentes de hormônio tais como o de mama, o endometrial e o de ovário (Davies *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2009; Ciucci *et al.*, 2014).

A isoforma 1 (variante A) codifica a proteína mais longa que possui 530 aminoácidos e a isoforma 6 (variante G) codifica uma proteína com 439 aminoácidos e possui um segmento interno a menos que a isoforma 1. Devido ao fato de que não há diferença nos pares de bases do mRNA entre ambas as isoformas, a análise realizada mediu a expressão das

mesmas conjuntamente. Nosso estudo mostrou uma maior expressão de ER β 1 e ER β 6 no tecido de hiperplasia prostática benigna quando comparado ao tecido de câncer de próstata. Leung e colaboradores avaliaram a expressão gênica de ER β 1 em tecido prostático normal e em células de linhagem PC3, DU145 e LNCaP e detectaram a presença desta isoforma (Leung *et al.*, 2006). O ER β 1 tem sido relacionado com a supressão tumoral na próstata e sua perda seria suficiente para promover a transição epitelial a mesenquimal indicando que o ER β 1 seria antimetastático (Mak *et al.*, 2010; Dey *et al.*, 2012). Leung e colaboradores (2006) descreveram que a isoforma ER β 1 é a única isoforma capaz de formar homodímeros, enquanto as demais isoformas do ER β formam somente heterodímeros. Na próstata normal, o ER β 1 está localizado principalmente no epitélio basal onde o ER α é raramente encontrado (Leav *et al.*, 2001). É bem estabelecido que ER β 1 exerce um efeito antiproliferativo no epitélio prostático (McPherson *et al.* 2010). Ho e colaboradores (2012) propuseram que a expressão da isoforma ER β 1 está presente no epitélio basal da próstata normal, é perdida na neoplasia intraepitelial prostática e no câncer de próstata e é re-expressada em metástases. O fato de nós termos encontrado maior expressão gênica de ER β 1 no tecido de HPB em comparação ao tecido de CaP, pode indicar que, apesar de não termos diferença na expressão proteica entre os grupos, existe uma resposta fisiológica em direção à produção desta proteína que atuaria de forma antiproliferativa.

A isoforma 2 (variante B) origina uma proteína que possui um C-terminal diferente da isoforma 1, esta proteína predominantemente inibe a atividade de outros membros da família dos receptores de estrogênio enquanto que a isoforma 5 (variante F), codifica uma proteína de 474 aminoácidos que possui um C-terminal diferente e mais curto do que a isoforma 1. No presente trabalho, os resultados mostraram maior expressão das isoformas ER β 2 e ER β 5 no câncer de próstata. Estas isoformas têm sido associadas com a regulação de vias que podem levar a metástase, estando aumentadas em células de câncer de próstata invasivas e em células

que migram mais rapidamente (Leung *et al.*, 2010). O ER β 2 parece suprimir a expressão do ER β 1 e funcionar como um dominante negativo do ER α (Zhao *et al.*, 2010; Ogawa *et al.*, 1998). Ho e colaboradores (2012) propuseram que a isoforma ER β 2 é expressa no epitélio basal e luminal da próstata normal, é perdida na neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e reaparece no epitélio basal no câncer de próstata e em metástases. Já a isoforma ER β 5 é expressa na próstata normal e na PIN no epitélio luminal, passa a ser expressa no epitélio basal no câncer de próstata e em metástases.

A isoforma 3 (variante D) transcreve uma proteína de 481 aminoácidos com um C-terminal diferente e mais curto que a isoforma 1. Nosso estudo não detectou a expressão desta isoforma em ambos os tecidos. Não foram encontrados relatos na literatura sobre a expressão desta isoforma no tecido prostático.

A isoforma 4 (variante E) foi revisada em 24 de abril de 2014 no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e esta foi permanentemente removida do *GenBank* por representar uma sequência parcialmente descrita. O transcrito completo é um *nonsense mediated mRNA decay* (NDM). Neste estudo nós não detectamos a presença desta isoforma nos grupos avaliados.

A análise das isoformas do ER β na literatura é difícil já que oligonucleotídeos específicos para PCR ou anticorpos específicos para imunoistoquímica ou Western Blot não foram usados em alguns estudos. Além disso, o fato de ser dinâmica a revisão da sequência de mRNA no NCBI, faz com que muitos estudos que tenham sido planejados não tenham validade mesmo obtendo resultados já que as sequências de mRNA estudadas não correspondem mais ao gene no NCBI .

7 CONCLUSÕES

- A maior concentração de estrogênio e de seus receptores (ER α e GPER) no câncer de próstata sugere a ação estrogênica na fisiopatologia desta doença.
- A correlação positiva entre o escore de Gleason e a expressão dos receptores ER α e GPER no CaP pode sugerir o estudo destes receptores como marcadores tumorais na próstata.
- A maior estimulação da via de proliferação celular PI3K/AKT no câncer de próstata pode estar relacionada ao aumento do GPER e do ER α nesta doença.
- A menor ativação da ERK1/2 no CaP pode estar relacionada à perda da diferenciação celular apresentada nesta doença.
- O GPER pode estar atuando em sinergia com a JNK sobre as metaloproteinases de membrana o que pode promover a formação de metástases.
- Há diferença na expressão do GPER e ER α entre os compartimentos estromal e epitelial na HPB e no CaP;
- O aumento na expressão gênica do ER β total no CaP não corresponde a expressão proteica;
- Há maior expressão gênica das isoformas ER β 1 e ER β 6 na HPB;
- Há maior expressão gênica no CaP das isoformas ER β 2 e ER β 5 relacionadas a formação de metástases;
- Não foi detectada a presença da isoforma ER β 3 em ambos os tecidos.

8 PERSPECTIVAS

Analisar a modulação estrogênica, através dos receptores ER α e GPER, na expressão de proteínas das vias PI3K e MAPK em culturas celulares de carcinoma prostático tratadas com estrogênio e com inibidores seletivos para o ER α (toremifene) e para o GPER (G-15).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCONCIA F; MARINO M. The effect of 17 β -estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane. **Front Physiol.** 2011; 2:30 doi: 10.3389/ fphys. 2011.00030.

AGUIRRE-GHISO J. A; ESTRADA Y; LIU D; OSSOWSKI L. ERK^{MAPK} activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38^{SAPK}. **Cancer Res.** 2003; 63: 1684-1695.

AIRES, M. M. **Fisiologia.** 2012. 4 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

ALBANITO L, MADEO A, LAPPANO R, VIVACQUA A, RAGO V, *et al.* G proteincoupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 β -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. **Cancer Res.** 2007; 67: 1859–1866.

ALTOMARE D. A; KHALED A. R. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. **Curr. Med. Chem.** 2012; 19: 3748-3762.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014. Disponível na internet no endereço www.cancer.org/downloads/stt/CFF2014_EstCD_3.pdf.

AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION. 2014. Disponível na Internet no endereço <http://www.urologyhealth.org/urology/index.cfm?article=59>.

ANGEL P; KARIN M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **Biochim. Biophys. Acta.** 1991; 1072 (2-3): 129-157.

AYALA G; THOMPSON T; YANG G; FROLOV A *et al.* High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. **Clin. Can. Res.** 2004; 10: 6572-6578.

- BARDIN A; BOULLE N; LAZENNEC G *et al.* Loss of Er β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. **Endoc-Rel. Cancer.** 2004. 11: 537-551.
- BAUMAN D. R; STECKELBROECK S; PEEHL D. M; PENNING T.M. Transcript profiling of the androgen signal in normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer. **Endocrinology.** 2006 Dec; 147 (12): 5806-5816.
- BODE A. M; DONG Z. The functional contrariety of JNK. **Mol. Carcinog.** 2007; 46 (8): 591-598.
- BOLTE S; CORDEBELIERES F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. **Journal of Microscopy.** 2006; 224: 213-232.
- BONKHOFF H & FIXEMER T. Implications of estrogens and their receptors for the development and progression of prostate cancer. **Pathologie.** 2005 Nov; 26 (6): 461-468.
- BONKHOFF H, FIXEMER T, HUNSICKER I, REMBERGER K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. **Am. J. Path.** 1999;155 (2): 641-647.
- BOYLE P, SEVERI G, GILES GG. The epidemiology of prostate cancer. **Urol. Clin. North. Am.** 2003 May; 30 (2): 209-217.
- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 1976 May; 7 (72): 248-254.
- BRITO N. M; JÚNIOR O. P. A; POLESE L; RIBEIRO M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente.** 2003; 13: 129-146.
- BUSTIN S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J. Mol. Endocrinol.** 2000; 25 (2): 169-193.
- CAMPBELL R. A; BHAT-NAKSHATRI P; PATEL N. M; CONSTANTINIDOU D *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor α . **J. Biol. Chem.** 2001; 276 (13): 9817-9824.
- CARREAU S; LOMBARD S; DELALANDE C; DENIS-GALERAUD I. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol.** 2003; 1:35.
- CARRUBA G. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 2006. 1089: 201-217.
- CARRUBA G. Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. **J. Cel. Bioch.** 2007; 102: 899-911.

CIUCCI A; ZANNONI G. F; TRAVAGLIA D; PETRILLO M; SCAMBIA G; GALLO D. Prognostic significance of the estrogen receptor beta (ER β) isoforms ER β 1, ER β 2, and ER β 5 in advanced serous ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.** 2014 Feb;132 (2): 351-359.

CHAN Q. K; LAM H. M; NG C. F *et al.*, Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest. **Cell Death Differ.** 2010 Sep, 17 (9): 1511-1523.

CHENG S-B; GRAEBER C. T; QUINN J. A; FILARDO E. J. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. **Steroids.** 2011; 76: 892-896.

CHIEN C. S; SHEN K. H; HUANG J. S; KO S. C *et al.* Antimetastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with downregulation of MMP-2/9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. **Mol. Cell. Biochem.** 2010; 333 (1-2): 169-80.

COLLINS F; MACPHERSON S; BROWN P; BOMBAIL V; WILLIAMS A. R; ANDERSON R. A *et al.* Expression of oestrogen receptors, ER α , ER β , and ER β variants, in endometrial cancers and evidence that prostaglandin F may play a role in regulating expression of ER α . **BMC Cancer.** 2009 Sep 16; 9:330. doi: 10.1186/1471-2407-9-330.

COTRAN R. S; KUMAR V; ROBBINS S.L. **Robbins: Bases Patológicas das Doenças.** 7 ed. RJ:Elsevier, 2005.

COUSE J. F; KORACH K. S. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? **Endocr. Rev.** 1999; 20 (3): 358-417.

CUNHA G. R; HAYWARD S. W; WANG Y. Z; RICKE W. A. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. **Int. J. Cancer.** 2003; 107: 1-10

CURKENDALL S. M; JONES J. K; DALE G *et al.* Incidence of medically detected erectile dysfunction and related diseases before and after ViagraTM (sildenafil citrate) (abstr). **Eur. Urol.** 2000; 37 (suppl 2): 81.

DAVIES M. P; O'NEILL P. A; INNES H; SIBSON D. R; PRIME W *et al.* Correlation of mRNA for oestrogen receptor beta splice variants ER β 1, ER β 2/ER β cx and ER β 5 with outcome in endocrine-treated breast cancer. **J. Mol. Endocrinol.** 2004 Dec; 33 (3): 773-782.

DEROO B. J; KORACH K. S. Estrogen receptors and human disease. **J. Clin. Invest.** 2006; 116 (3): 561-570.

DEY P; JONSSON P; HARTMAN J; WILLIAMS C *et al.* Estrogen receptors β 1 and β 2 have opposing roles in regulating proliferation and bone metastasis genes in the prostate cancer cell line PC3. **Mol. Endocrinol.** Dec 2012, 26 (12): 1991-2003.

DJAVAN B, REMZI M, ERNE B, MARBERGER M. The pathophysiology of benign prostatic hyperplasia. **Drugs today (Barc).** 2002 Dec; 38 (12): 867-876.

DOBLE B.W; WOODGETT JR. GSK-3: tricks of the trade for a multitasking kinase. **J. Cell. Sci.** 2003; 116: 1175–1186.

ELLEN S. J; RISBRIDGER G. P. The dual opposing roles of estrogen in the prostate. **An. N. Y. Acad. Sci.** 2009. 1155: 174-186.

FARAGO M; DOMINGUEZ I; LANDESMAN-BOLLAG E; XU X; ROSNER A *et al.* Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3 β promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. **Cancer Res.** 2005; 65: 5792–5801.

FILARDO E. J; QUINN J. A; BLAND K. I; FRACKELTON A. R Jr. Estrogen-induced activation of ERK-1 and ERK-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. **Mol. Endocrinol.** 2000; 14: 1649–60.

FILARDO E. J; QUINN J. A; FRACKELTON A. R JR, BLAND K. I. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. **Mol. Endocrinol.** 2002; 16: 70–84.

FILARDO E. J; GRAEBER C. T; QUINN J. A; RESNICK M. B; GIRI D *et al.* Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. **Clin. Cancer Res.** 2006; 12: 6359–6366.

FOSTER C. S. Pathology of benign prostatic hyperplasia. **Prostate.** Suppl 2000; 9: 4-14.

FUJIMURA T; TAKAHASHI S; URANO T; OGAWA S *et al.* Differential expression of estrogen receptor β (Er β) and its C-terminal truncated splice variant Er β c α as prognostic predictors in human prostatic cancer. **Bioch. Biophys. Res. Comm.** 2001; 289: 692-699.

GRAFF J. R; KONICEK B. W; McNULTY A. M; WANG Z *et al.* Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27^{Kip1} expression. **J. Biol. Chem.** 2000; 275 (32): 24500-24505.

GRÖNBERG H. Prostate cancer epidemiology. **Lancet.** Mar 2003; 361 (9360): 859-864.

GUESS H. A. Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. **Epidemiol Rev.** 2001; 23 (1): 152-158.

HANKEY B. F; FEUER E. J; CLEGG L. X *et al.* Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer - part 1: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. **J. Natl. Cancer Inst.** 1999; 91 (12): 1017-1024.

HARTMAN J; STRÖM A; GUSTAFSSON J. Å. Current concepts and significance of estrogen receptor β in prostate cancer. **Steroids.** 2012; 77 (12): 1262-1266.

HE Y. Y; CAI B; YANG Y. X; LIU X. L; WAN X. P. Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation,

invasion potential, and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway. **Cancer Sci.** 2009; 100 (6): 1051-61.

HELDRING N; PIKE A; ANDERSSON S; MATTHEWS J *et al.* Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiol. Rev.** 2007 July; 87: 905-931.

HESS R. A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Repr. Biol. Endoc.** 2003; 52:1-14.

HIGUCHI R; FOCKLER C. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (NY).** 1993; 11 (9): 1026-1030.

HO S-M; LEUNG Y-K; CHUNG I. Estrogens and antiestrogens as etiological factors and therapeutics for prostate cancer. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 2006 Nov; 1089: 177-193.

HO S-M; LEE M-T; LAM H-M; LEUNG Y-K. Estrogens and prostate cancer: etiology, mediators, prevention, and management. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.** 2011 September; 40 (3): 591-614.

HORVATH L. G; HENSHALL S. M; LEE C. S; HEAD D. R; QUINN D. I *et al.* Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. **Cancer Res.** 2001 Jul 15; 61 (14): 5331-5335.

HUANG X; CHEN S; XU L; LIU Y *et al.* Genistein inhibits p38 Map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. **Cancer Res.** 2005; 65 (8): 3470-3478.

HUGGETT J & DHEDA K. Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations. **Genes Immun.** 2005; 6 (4): 279-284.

HUI L; BAKIRI L; STEPANIAK E; WAGNER E. F. p38 α a supresor of cell proliferation and tumorigenesis. **Cell Cycle.** 2007; 20: 2429-2433.

IACOPINO F; ANGELUCCI C; LAMA G *et al.* Apoptosis-related gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. **Anticancer Res.** 2006, May; 26 (3A): 1849-1854.

IMAMOV O; SHIM G-J; WARNER M *et al.* Estrogen receptor beta in health and disease. **Biol. Rep.** 2005. 73: 866-871.

INCA -Instituto Nacional do Câncer- Ministério da Saúde/Brasil. Avaliado em: URL: <http://www.inca.gov.br>

ITO T, TACHIBANA M, YAMAMOTO S, NAKASHIMA J, MURAI M. Expression of estrogen receptor (ER-alpha and ER-beta) mRNA in human prostate cancer. **Eur. Urol.** 2001 Nov; 40 (5): 557-563.

JUNTTILA M. R; LI S. P; WESTERMARCK J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. **FASEB J.** 2008; 22 (4): 954-965.

KO Y. H; MIYAKE H; BEHNSAWY H. M; CHEON J *et al.* Limited significance of activated Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway in prostate cancer progression. **Urol. Int.** 2014 Feb 20 (Epub ahead of print).

KOEHLER K. F; HELGUERO L. A; HALDOSÉN L-A *et al.* Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β . **Endoc. Rev.** 2005; 26 (3): 465–478.

KREISBERG J. I; MALIK S. N; PRIHODA T. J; BEDOLLA R. G *et al.* Phosphorylation of Akt (Ser⁴⁷³) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. **Cancer Research.** 2004; 64: 5232-5236.

KUO W. H; CHANG L. Y; LIU D. L; HWA H. L *et al.* The interactions between GPR30 and the major biomarkers in infiltrating ductal carcinoma of the breast in an Asian population. **Taiwan J. Obstet. Gynecol.** 2007; 46 (2): 135-145.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 1970; 227 (5259): 680-685.

LEAV I; LAU K-M; ADAMS J. Y; MCNEAL J. E *et al.* Comparative studies of the estrogen receptor β and α and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. **Am. J. Pathol.** 2001; 159 (1): 79-92.

LEE M. T; OUYANG B; HO S. M; LEUNG Y. K. Differential expression of estrogen receptor beta isoforms in prostate cancer through interplay between transcriptional and translational regulation. **Mol. Cell. Endocrinol.** 2013 Aug 25; 376 (1-2): 125-135.

LEE J. T; STEELMAN L. S; CHAPPELL W. H; McCUBREY J. A. Akt inactivates ERK causing decreased response to chemotherapeutic drugs in advanced CaP cells. **Cell. Cycle.** 2008; 7 (5): 631-636.

LEPOR H. Pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. **Reviews in Urology.** 2004; vol. 6, suppl. 9.

LEUNG Y-K; LAM H-M; WU S; SONG D *et al.* Estrogen receptor β 2 and β 5 are associated with poor prognosis in prostate cancer, and promote cancer cell migration and invasion. **Endocrine-Related Cancer.** 2010. 17: 675-689.

LEUNG Y-K; MAK P; HASSAN S. HO S-M *et al.* Estrogen receptor (ER)- β isoforms: a key to understanding ER- β signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2006 Aug; 103 (35): 13162–13167.

LI Q; LAU A; MORRIS T. J; GUO L; FORDYCE C. B; STANLEY E. F. A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. **J. Neurosci.** 2004 Apr 21; 24 (16): 4070-4081.

LI W; WU C; FEBBO P. G *et al.* Stromally expressed c-jun regulates proliferation of prostate epithelial cells. **Am. J. Pathol.** Oct 2007. 171 (4):1189-1198.

LIU J; LIN A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. **Cell. Res.** 2005; 15 (1): 36–42.

LUO J. Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. **Cancer Letters**. 2009; 273: 194-200.

LUSTIG B; BEHRENS J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. **J. Cancer Res. Clin. Oncol**. 2003; 129: 199-221.

MA C; WANG J; GAO Y; GAO T. W *et al*. The role of glycogen synthase kinase 3beta in the transformation of epidermal cells. **Cancer Res**. 2007; 67: 7756-7764.

MAEDA N; TANARA E; SUZUKI T; OKUMURA K *et al*. Accurate determination of tissue steroid hormones, precursors and conjugates in adult male rat. **J. Biochem**. 2013; 153 (1): 63-71.

MAGGIOLINI M; PICARD D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. **J. Endocrinol**. 2010; 204 (2): 105-114.

MAGI-GALLUZZI C; MISHRA R; FIORENTINO M; MONTIRONI R *et al*. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. **Lab. Invest**. 1997; 76 (1): 37-51.

MAJUMDER P. K; SELLERS W. R. Akt-regulated pathways in prostate cancer. **Oncogene**. 2005; 24: 7465-7474.

MALIK S. N; BRATTAIN M; GHOSH P. M; TROYER D. A *et al*. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high gleason grade prostate cancer. **Clin. Can. Res**. 2002; 8: 1168-1171.

MANDERS E. E. M; VERBEEK F. J; ATEN J. A. Measurement of co-localisation of objects in dual-colour confocal images. **Journal of Microscopy**. 1993; 169, 375-382.

MARIEB E. N.; HOEHN K. **Anatomia e fisiologia**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MARONI P. D; KOUL S; MEACHAM R. B; KOUL H. K. Mitogen activated protein kinase signal transduction pathways in the prostate. **Cell Communication and Signaling**. 2004; 2:5. doi:10.1186/1478-811X-2-5.

MATTHEWS J, GUSTAFSSON J. A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and ER β . **Mol. Intervent**. 2003; 3: 281–292.

MAK P; LEAV I; PURSELL B; BAE D; YANG X *et al*. ER β impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1 α and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. **Cancer Cell**. 2010; 17: 319-332.

McPHERSON S. J; HUSSAIN S; BALANATHAN P; HEDWARDS S. L *et al*. Estrogen receptor- β activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNF α mediated. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**. 2010; 107 (7): 3123-3128.

- MOORE J. T; MCKEE D; SLENTZ-KESLER K; MOORE L. B *et al.* Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. **Bioch. Bioph. Res. Comm.** 1998. 247 (1): 75-78.
- MORANI A; WARNER M & GUSTAFSSON J-A. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. **J. Internal. Med.** 2008; 264: 128-142.
- MORRISON T. B; WEIS J. J; WITWER C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques.** 1998; 24 (6): 954-8, 960, 962.
- MULHOLLAND D. J; DEDHAR S; WU H; NELSON C. C. PTEN and GSK3 β : key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer. **Oncogene.** 2006; 25: 329-337.
- NELSON W. G; DE MARZO A. M; ISAACS W. B. Prostate cancer. **New Engl. J. Med.** 2003; 349: 366-381.
- NILSSON S; GUSTAFSSON J-A. Estrogen receptor transcription and transactivation. Basic aspects of estrogen action. **Breast Cancer Res.** 2000; 2: 360-366.
- NIU Y-N; XIA S-J. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. **Asian J. Andro.** 2009; 11: 28-35.
- OGAWA S; INOUE S; WATANABE T; ORIMO A *et al.* Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor β cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. **Nucleic Acids Research.** 1998; 26 (15): 3505-3512.
- OUGOLKOV A. V; BILLADEAU D. D. Targeting GSK-3: a promising approach for cancer therapy? **Future Oncol.** 2006; 2: 91-100.
- OUYANG X; JESSEN W. J; AL-AHMADIE H; SERIO A. M *et al.* Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer. **Cancer Res.** 2008; 68 (7): 2132-2144.
- PARK I. I; ZHANG Q; LIU V; KOZLOWSKI J. M *et al.* 17 β -estradiol at low concentrations acts through distinct pathways in normal versus benign prostatic hyperplasia-derived prostate stromal cells. **Endocrinology.** 2009; 150 (10): 4594-4605.
- PASQUALI D; ROSSI V; ESPOSITO D; ABBONDANZA C *et al.* Loss of estrogen receptor β expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2001; 86 (5): 2051-2055.
- PEARSON G; ROBINSON F; GIBSON T. B; XU B *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr. Rev.** 2001; 22 (2): 153-183.
- POWELL E; SHANLE E; BRINKMAN A; LI J; KELES S *et al.* Identification of estrogen receptor dimer selective ligands reveals growth-inhibitory effects on cells that co-express ER α

and ER β . **PLoS One**. 2012; 7(2): e30993. doi: 10.1371/journal.pone.0030993. Epub 2012 Feb 7.

PRAVENOTTI A; MORNATI O; MORNATI P. G *et al*. Estrogen receptor beta (ERbeta) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: studies on the possible mechanism of action in DU 145 cells. **Mol. Cell. Endocrinol**. 2007 Jan; 263 (1-2): 46-54.

PROSSNITZ E. R; ARTERBURN J. B; SMITH H. O; Oprea T. I *et al*. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. **Annu. Rev. Physiol**. 2008. 70: 165-190.

PROSSNITZ E. R. & MAGGIOLINI M. Mechanisms of estrogen signaling via GPR30. **Mol. Cell. Endocrinol**. 2009; 308 (1-2): 32-38.

RAYASAM G. V; TULASI V. K; SODHI R; DAVIS J. A. RAY A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. **Brit. J. Pharmacol**. 2009; 156: 885-898.

RAZANDI M, PEDRAM A, PARK S. T; LEVIN E. R. Proximal events in signaling by plasma. Characterized membrane estrogen receptors. **J. Biol. Chem**. 2003; 278: 2701–2712.

REVANKAR C. M; CIMINO D. F; SKLAR L. A; ARTERBURN J. B; PROSSNITZ E. R. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**. 2005; 307: 1625–1630.

RICOTE M; GARCIA-TUÑÓN I; BETHENCOURT F; FRAILE B *et al*. The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. **J. Pathol**. 2006; 208: 401-407.

RISBRIDGER G. P; BIANCO J. J; ELLEM S. J; McPHERSON S. J. Oestrogens and prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**. 2003; 10: 187-191.

RISBRIDGER G. P; WANG H; YOUNG P; KURITA T; WONG Y *et al*. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. **Dev. Biol**. 2001; 229: 432-442.

ROEHRBORN C. G. Benign prostatic hyperplasia: an overview. **Reviews in Urology**. 2005; vol. 7, suppl. 9.

ROZEN S; SKALETSKY H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol**. 2000; 132: 365-386.

ROYUELA M; ARENAS M. I; BETHENCOURT F. R. SANCHEZ-CHAPADO M *et al*. Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. **Hum. Pathol**. 2002; 33 (3): 299-306.

SAMARTZIS E. P; NOSKE A; MEISEL A; VARGA Z *et al*. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer. **PLOS One**. 2014; 9 (1): e83296.

SARKER D; REID A. H. M; YAP T. A; BONO J. S. Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. **Clin. Cancer Res.** 2009; 15 (15): 4799-4805.

SEIBEL, F. E. R. Expressão gênica e proteica das isoformas dos receptores de estrogênio e da enzima aromatase em hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia. **UFRGS**; 2010.

SIGNORETTI S; LODA M. Estrogen receptor β in prostate cancer: brake pedal or accelerator? **Am. J. Pathol.** July 2001; 159 (1): 13-16.

SMITH L; BRANNAN R. A; HANBY A. M; SHAABAN A. M; VERGHESE E. T; PETER M. B et al. Differential regulation of oestrogen receptor β isoforms by 5' untranslated regions in cancer. **J. Cell. Mol. Med.** 2010 Aug; 14 (8): 2172-2184.

SMITH L; COLEMAN L. J; CUMMINGS M; SATHEESHA S et al. Expression of oestrogen receptor β isoforms is regulated by transcriptional and pos-transcriptional mechanisms. **Biochem. J.** 2010; 429, 283-290.

TAKAHASHI Y; PERKINS S. N; HURSTING S. D; WANG T. T. 17Beta-estradiol differentially regulates androgen-responsive genes through estrogen receptor-beta- and extracellular-signal regulated kinase-dependent pathways in LNCaP human prostate cancer cells. **Mol. Carcinog.** 2007 Feb; 46 (2): 117-129.

TAYLOR S. E; MARTIN-HIRSH P. L. MARTIN F. L. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. **Cancer Letters.** 2010. 288: 133-148.

UZGARE A. R; KAPLAN P. J; GREENBERG N. M. Differential expression and/or activation of p38MAPK, ERK1/2, and JNK during the initiation and progression of prostate cancer. **Prostate.** 2003; 55 (2): 128-139.

VIVACQUA A; BONOFIGLIO D; ALBANITO L; MADEO A; RAGO V, *et al.* 17 β -Estradiol, genistein and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30. **Mol. Pharmacol.** 2006a; 70: 1414–1423

VIVACQUA A; BONOFIGLIO D; RECCHIA A. G; MUSTI A. M; PICARD D *et al.* The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. **Mol. Endocrinol.** 2006b; 20: 631–46.

WANG X; PROUD C. G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. **Physiology.** 2006; 21: 362-369.

WILLIAMS G. Aromatase up-regulation, insulin and raised intracellular oestrogens in men, induce adiposity, metabolic syndrome and prostate disease, via aberrant ER- α and GPER signaling. **Mol. Cell. Endocrinol.** 2012; 351: 269-278.

YANG Q; GUAN K-L. Expanding mTOR signaling. **Cell. Research.** 2007; 17: 666-681.

YIP I; HEBER D; ARONSON W. Nutrition and prostate cancer. **Urol. Clin. North. Am.** 1999 May; 26 (2): 403-411.

ZANARDI M. F; KOBERSTEIN T. C. R. D; URBINATI E. C; FAGUNDES M *et al.* Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-nylo e maturação precoce após reversão sexual. **R. Bras. Zootec.** 2011; 40 (1): 7-11.

ZHANG Z; DUAN L; DU X ; MA H *et al.*, The proliferative effect of estradiol on human prostate stromal cells is mediated through activation of ERK. **Prostate.** 2008 Apr; 68 (5): 508-516.

ZHAO C; DAHLMAN-WRIGHT K; GUSTAFSSON J. Å. Estrogen signaling via estrogen receptor β . **J. Biol. Chem.** 2010 Dec 17; 285 (51): 39575-9. doi: 10.1074/jbc.R110.180109. Epub 2010 Oct 18.

ZHU Y-S; CAI L-Q; HUANG Y; FISH J *et al.* Receptor isoform and ligand-specific modulation of dihydrotestosterone-induced prostate specific antigen gene expression and prostate tumor cell growth by estrogens. **J. Androl.** 2005; 26 (4): 500-510.

ZHU Q; YANG J; HAN S; LIU J; HOLZBEIERLEIN *et al.* Suppression of glycogen synthase kinase 3 activity reduces tumor growth of prostate cancer. **The Prostate.** 2011; 71: 835-845

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: Receptores de estrogênio e vias de sinalização MAPK e PI3K em hiperplasia prostática benigna e câncer de 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 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 a formação desses tumores. Como o Senhor tem o diagnóstico de _____ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendado cirurgia, gostaríamos de convidá-la para participar do estudo.

Caso aceite, sua participação no estudo consistirá na permissão de que após a retirada da peça cirúrgica, dois pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético. 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.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras por até 5 anos 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 e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce 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. 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 a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (fone: 99969044), o Prof. Dr. Milton Berger (21018286), e a Ms. Fernanda E. R. Seibel (fone: 99724758). Caso o Sr. 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 (fone: 21018290).

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi 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 _____

Pesquisador _____

ANEXO B

Alinhamento das sequências das isoformas do ER β com seus ortólogos no programa Clustal W. Nucleotídeos com “*” são idênticos entre todos os transcritos. Traços “-“ representam *gaps* na sequência.

```
NM_001214902.1 ERB3 -----
NM_001214903.1 ERB4 -----
NM_001271876.1 ERB5 -----
NM_001437.2 ERB1 CTCGGTCTTTAAAAGGAAGAAGGGGCTTATCGTTAAGTCGCTTGTGATCT 50
NM_001271877.1 ERB6 -----
NM_001040275.1 ERB2 CTCGGTCTTTAAAAGGAAGAAGGGGCTTATCGTTAAGTCGCTTGTGATCT 50

NM_001214902.1 ERB3 -----
NM_001214903.1 ERB4 -----
NM_001271876.1 ERB5 -----
NM_001437.2 ERB1 TTTCAGTTTCTCCAGCTGCTGGCTTTTTGGACACCCACTCCCCGCCAGG 100
NM_001271877.1 ERB6 -----
NM_001040275.1 ERB2 TTTCAGTTTCTCCAGCTGCTGGCTTTTTGGACACCCACTCCCCGCCAGG 100

NM_001214902.1 ERB3 -----
NM_001214903.1 ERB4 -----
NM_001271876.1 ERB5 -----
NM_001437.2 ERB1 AGGCAGTTGCAAGCGCGGAGGCTGCGAGAAATAACTGCCTCTTGAAACTT 150
NM_001271877.1 ERB6 -----
NM_001040275.1 ERB2 AGGCAGTTGCAAGCGCGGAGGCTGCGAGAAATAACTGCCTCTTGAAACTT 150

NM_001214902.1 ERB3 -----
NM_001214903.1 ERB4 -----
NM_001271876.1 ERB5 -----
NM_001437.2 ERB1 GCAGGGCGAAGAGCAGGCGGCGAGCGCTGGGCCGGGGAGGGACCACCCGA 200
NM_001271877.1 ERB6 -----
NM_001040275.1 ERB2 GCAGGGCGAAGAGCAGGCGGCGAGCGCTGGGCCGGGGAGGGACCACCCGA 200

NM_001214902.1 ERB3 -----
NM_001214903.1 ERB4 -----
NM_001271876.1 ERB5 -----
NM_001437.2 ERB1 GCTGCGACGGGCTCTGGGGCTGCGGGGCAGGGCTGGCGCCCGGAGCCTGA 250
NM_001271877.1 ERB6 -----
NM_001040275.1 ERB2 GCTGCGACGGGCTCTGGGGCTGCGGGGCAGGGCTGGCGCCCGGAGCCTGA 250
```

NM_001214902.1 **ERB3** -----
NM_001214903.1 **ERB4** -----
NM_001271876.1 **ERB5** -----
NM_001437.2 **ERB1** GCTGCAGGAGGTGCGCTCGCTTTCCTCAACAGGTGGCGGGCGGGGCGCGCG 300
NM_001271877.1 **ERB6** -----
NM_001040275.1 **ERB2** GCTGCAGGAGGTGCGCTCGCTTTCCTCAACAGGTGGCGGGCGGGGCGCGCG 300

NM_001214902.1 **ERB3** -----
NM_001214903.1 **ERB4** -----
NM_001271876.1 **ERB5** -----
NM_001437.2 **ERB1** CCGGGAGACCCCCCTAATGCGGGAAAAGCACGTGTCCGCATTTAGAGA 350
NM_001271877.1 **ERB6** -----
NM_001040275.1 **ERB2** CCGGGAGACCCCCCTAATGCGGGAAAAGCACGTGTCCGCATTTAGAGA 350

NM_001214902.1 **ERB3** -----CCATTATACTTGCCACGAATC 22
NM_001214903.1 **ERB4** -----CCATTATACTTGCCACGAATC 22
NM_001271876.1 **ERB5** ----- CCATTATACTTGCCACGAATC 22
NM_001437.2 **ERB1** AGGCAAGGCCGGTGTGTTTATCTGCAAGCCATTATACTTGCCACGAATC 400
NM_001271877.1 **ERB6** -----CCATTATACTTGCCACGAATC 22
NM_001040275.1 **ERB2** AGGCAAGGCCGGTGTGTTTATCTGCAAGCCATTATACTTGCCACGAATC 400

NM_001214902.1 **ERB3** TTTGAGAACATTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTTCT 72
NM_001214903.1 **ERB4** TTTGAGAACATTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTTCT 72
NM_001271876.1 **ERB5** TTTGAGAACATTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTTCT 72
NM_001437.2 **ERB1** TTTGAGAACATTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTTCT 450
NM_001271877.1 **ERB6** TTTGAGAACATTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTTCT 72
NM_001040275.1 **ERB2** TTTGAGAACATTATAATGACCTTTGTGCCTCTTCTTGCAAGGTGTTTTCT 450

NM_001214902.1 **ERB3** CAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAA 122
NM_001214903.1 **ERB4** CAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAA 122
NM_001271876.1 **ERB5** CAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAA 122
NM_001437.2 **ERB1** CAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAA 500
NM_001271877.1 **ERB6** CAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAA 122
NM_001040275.1 **ERB2** CAGCTGTTATCTCAAGACATGGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAA 500

NM_001214902.1 **ERB3** TTCTCCTCCTCCTACAACCTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACG 172
NM_001214903.1 **ERB4** TTCTCCTCCTCCTACAACCTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACG 172
NM_001271876.1 **ERB5** TTCTCCTCCTCCTACAACCTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACG 172
NM_001437.2 **ERB1** TTCTCCTCCTCCTACAACCTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACG 550
NM_001271877.1 **ERB6** TTCTCCTCCTCCTACAACCTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACG 172
NM_001040275.1 **ERB2** TTCTCCTCCTCCTACAACCTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACG 550

NM_001214902.1 **ERB3** GCTCCATATACATACCTTCCTCCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCA 222
 NM_001214903.1 **ERB4** GCTCCATATACATACCTTCCTCCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCA 222
 NM_001271876.1 **ERB5** GCTCCATATACATACCTTCCTCCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCA 222
 NM_001437.2 **ERB1** GCTCCATATACATACCTTCCTCCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCA 600
 NM_001271877.1 **ERB6** GCTCCATATACATACCTTCCTCCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCA 222
 NM_001040275.1 **ERB2** GCTCCATATACATACCTTCCTCCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCA 600

NM_001214902.1 **ERB3** GCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAA 272
 NM_001214903.1 **ERB4** GCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAA 272
 NM_001271876.1 **ERB5** GCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAA 272
 NM_001437.2 **ERB1** GCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAA 650
 NM_001271877.1 **ERB6** GCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAA 272
 NM_001040275.1 **ERB2** GCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCCCAGCAA 800

NM_001214902.1 **ERB3** TGTCCTAACTTGGAAAGGTGGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATG 322
 NM_001214903.1 **ERB4** TGTCCTAACTTGGAAAGGTGGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATG 322
 NM_001271876.1 **ERB5** TGTCCTAACTTGGAAAGGTGGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATG 322
 NM_001437.2 **ERB1** TGTCCTAACTTGGAAAGGTGGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATG 700
 NM_001271877.1 **ERB6** TGTCCTAACTTGGAAAGGTGGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATG 322
 NM_001040275.1 **ERB2** TGTCCTAACTTGGAAAGGTGGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATG 700

ERβ total sense

NM_001214902.1 **ERB3** TGTTGTGGCCAACACCTG**GGCACCTTTCTCCTTTAGTG**GTCCATCGCCAG 372
 NM_001214903.1 **ERB4** TGTTGTGGCCAACACCTG**GGCACCTTTCTCCTTTAGTG**GTCCATCGCCAG 372
 NM_001271876.1 **ERB5** TGTTGTGGCCAACACCTG**GGCACCTTTCTCCTTTAGTG**GTCCATCGCCAG 372
 NM_001437.2 **ERB1** TGTTGTGGCCAACACCTG**GGCACCTTTCTCCTTTAGTG**GTCCATCGCCAG 750
 NM_001271877.1 **ERB6** TGTTGTGGCCAACACCTG**GGCACCTTTCTCCTTTAGTG**GTCCATCGCCAG 372
 NM_001040275.1 **ERB2** TGTTGTGGCCAACACCTG**GGCACCTTTCTCCTTTAGTG**GTCCATCGCCAG 750

ERβ total antisense

NM_001214902.1 **ERB3** TTATCACATCTGTATGCGGAAC**CTCAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGC**AAG 422
 NM_001214903.1 **ERB4** TTATCACATCTGTATGCGGAAC**CTCAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGC**AAG 422
 NM_001271876.1 **ERB5** TTATCACATCTGTATGCGGAAC**CTCAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGC**AAG 422
 NM_001437.2 **ERB1** TTATCACATCTGTATGCGGAAC**CTCAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGC**AAG 800
 NM_001271877.1 **ERB6** TTATCACATCTGTATGCGGAAC**CTCAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGC**AAG 422
 NM_001040275.1 **ERB2** TTATCACATCTGTATGCGGAAC**CTCAAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGC**AAG 800

NM_001214902.1 **ERB3** ATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGG 472
NM_001214903.1 **ERB4** ATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGG 472
NM_001271876.1 **ERB5** ATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGG 472
NM_001437.2 **ERB1** ATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGG 850
NM_001271877.1 **ERB6** ATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGG 472
NM_001040275.1 **ERB2** ATCGCTAGAACACACCTTACCTGTAAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGG 850

NM_001214902.1 **ERB3** TTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGG 522
NM_001214903.1 **ERB4** TTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGG 522
NM_001271876.1 **ERB5** TTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGG 522
NM_001437.2 **ERB1** TTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGG 900
NM_001271877.1 **ERB6** TTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGG 522
NM_001040275.1 **ERB2** TTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCTGTTACTGGTCCAGGTTCAAAGAGG 900

NM_001214902.1 **ERB3** GATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA 572
NM_001214903.1 **ERB4** GATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA 572
NM_001271876.1 **ERB5** GATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA 572
NM_001437.2 **ERB1** GATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA 950
NM_001271877.1 **ERB6** GATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA 572
NM_001040275.1 **ERB2** GATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGGATATCACTA 950

NM_001214902.1 **ERB3** TGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATT 622
NM_001214903.1 **ERB4** TGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATT 622
NM_001271876.1 **ERB5** TGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATT 622
NM_001437.2 **ERB1** TGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATT 1000
NM_001271877.1 **ERB6** TGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATT 622
NM_001040275.1 **ERB2** TGGAGTCTGGTTCGTGTGAAGGATGTAAGGCCTTTTTTAAAAGAAGCATT 1000

NM_001214902.1 **ERB3** AAGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGAT 672
NM_001214903.1 **ERB4** AAGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGAT 672
NM_001271876.1 **ERB5** AAGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGAT 672
NM_001437.2 **ERB1** AAGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGAT 1050
NM_001271877.1 **ERB6** AAGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGAT 672
NM_001040275.1 **ERB2** AAGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGTACAATCGAT 1050

NM_001214902.1 **ERB3** AAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTTACGA 722
NM_001214903.1 **ERB4** AAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTTACGA 722
NM_001271876.1 **ERB5** AAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTTACGA 722
NM_001437.2 **ERB1** AAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTTACGA 1100
NM_001271877.1 **ERB6** AAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTTACGA 722
NM_001040275.1 **ERB2** AAAAACCGGCGCAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTTACGA 1100

NM_001214902.1 **ERB3** AGTGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGAGAGAGAGATGTGGGTACCGCC 772
NM_001214903.1 **ERB4** AGTGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGAGAGAGAGATGTGGGTACCGCC 772
NM_001271876.1 **ERB5** AGTGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGAGAGAGAGATGTGGGTACCGCC 772
NM_001437.2 **ERB1** AGTGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGAGAGAGAGATGTGGGTACCGCC 1150
NM_001271877.1 **ERB6** AGTGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGAGAGAGAGATGTGGGTACCGCC 772
NM_001040275.1 **ERB2** AGTGGAATGGTGAAGTGTGGCTCCCGAGAGAGAGATGTGGGTACCGCC 1150

NM_001214902.1 **ERB3** TTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCGGCAAG 822
NM_001214903.1 **ERB4** TTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCGGCAAG 822
NM_001271876.1 **ERB5** TTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCGGCAAG 822
NM_001437.2 **ERB1** TTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCGGCAAG 1200
NM_001271877.1 **ERB6** TTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCGGCAAG 822
NM_001040275.1 **ERB2** TTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCAGCTGCACTGTGCCGGCAAG 1200

NM_001214902.1 **ERB3** GCCAAGAGAAGTGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGA 872
NM_001214903.1 **ERB4** GCCAAGAGAAGTGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGA 872
NM_001271876.1 **ERB5** GCCAAGAGAAGTGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGA 872
NM_001437.2 **ERB1** GCCAAGAGAAGTGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGA 1250
NM_001271877.1 **ERB6** GCCAAGAGAAGTGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGA 872
NM_001040275.1 **ERB2** GCCAAGAGAAGTGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCTGCTGCTGGA 1250

NM_001214902.1 **ERB3** CGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGC 922
NM_001214903.1 **ERB4** CGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGC 922
NM_001271876.1 **ERB5** CGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGC 922
NM_001437.2 **ERB1** CGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGC 1300
NM_001271877.1 **ERB6** CGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGC 922
NM_001040275.1 **ERB2** CGCCCTGAGCCCCGAGCAGCTAGTGCTCACCTCCTGGAGGCTGAGCCGC 1300

NM_001214902.1 **ERB3** CCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTCACCGAGGCCTCCATG 972
 NM_001214903.1 **ERB4** CCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTCACCGAGGCCTCCATG 972
 NM_001271876.1 **ERB5** CCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTCACCGAGGCCTCCATG 972
 NM_001437.2 **ERB1** CCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTCACCGAGGCCTCCATG 1350
 NM_001271877.1 **ERB6** CCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTCACCGAGGCCTCCATG 972
 NM_001040275.1 **ERB2** CCCATGTGCTGATCAGCCGCCCCAGTGCGCCCTTCACCGAGGCCTCCATG 1350

NM_001214902.1 **ERB3** ATGATGTCCCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAG 1022
 NM_001214903.1 **ERB4** ATGATGTCCCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAG 1022
 NM_001271876.1 **ERB5** ATGATGTCCCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAG 1022
 NM_001437.2 **ERB1** ATGATGTCCCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAG 1400
 NM_001271877.1 **ERB6** ATGATGTCCCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAG 1022
 NM_001040275.1 **ERB2** ATGATGTCCCTGACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAG 1400

NM_001214902.1 **ERB3** CTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGAGCTCAGCCTGTTTCGACCAAG 1072
 NM_001214903.1 **ERB4** CTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGAGCTCAGCCTGTTTCGACCAAG 1072
 NM_001271876.1 **ERB5** CTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGAGCTCAGCCTGTTTCGACCAAG 1072
 NM_001437.2 **ERB1** CTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGAGCTCAGCCTGTTTCGACCAAG 1450
 NM_001271877.1 **ERB6** CTGGGCCAAGAAGATTCCCGG----- 1043
 NM_001040275.1 **ERB2** CTGGGCCAAGAAGATTCCCGGCTTTGTGGAGCTCAGCCTGTTTCGACCAAG 1450

NM_001214902.1 **ERB3** TGCGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGATGGGGCTGATG 1122
 NM_001214903.1 **ERB4** TGCGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGATGGGGCTGATG 1122
 NM_001271876.1 **ERB5** TGCGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGATGGGGCTGATG 1122
 NM_001437.2 **ERB1** TGCGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGATGGGGCTGATG 1500
 NM_001271877.1 **ERB6** -----
 NM_001040275.1 **ERB2** TGCGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGATGGAGGTGTTAATGATGGGGCTGATG 1500

NM_001214902.1 **ERB3** TGGCGCTCAATTGACCACCCGGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGT 1172
 NM_001214903.1 **ERB4** TGGCGCTCAATTGACCACCCGGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGT 1172
 NM_001271876.1 **ERB5** TGGCGCTCAATTGACCACCCGGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGT 1172
 NM_001437.2 **ERB1** TGGCGCTCAATTGACCACCCGGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGT 1550
 NM_001271877.1 **ERB6** -----
 NM_001040275.1 **ERB2** TGGCGCTCAATTGACCACCCGGCAAGCTCATCTTTGCTCCAGATCTTGT 1550

NM_001214902.1 **ERB3** TCTGGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTG 1222
 NM_001214903.1 **ERB4** TCTGGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTG 1222
 NM_001271876.1 **ERB5** TCTGGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTG 1222
 NM_001437.2 **ERB1** TCTGGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTG 1600
 NM_001271877.1 **ERB6** -----
 NM_001040275.1 **ERB2** TCTGGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTG 1600

NM_001214902.1 **ERB3** ACATGCTCCTGGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACCTCCAACAC 1272
NM_001214903.1 **ERB4** ACATGCTCCTGGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACCTCCAACAC 1272
NM_001271876.1 **ERB5** ACATGCTCCTGGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACCTCCAACAC 1272
NM_001437.2 **ERB1** ACATGCTCCTGGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACCTCCAACAC 1650
NM_001271877.1 **ERB6** -----
NM_001040275.1 **ERB2** ACATGCTCCTGGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACCTCCAACAC 1650

NM_001214902.1 **ERB3** AAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTA 1322
NM_001214903.1 **ERB4** AAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTA 1322
NM_001271876.1 **ERB5** AAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTA 1322
NM_001437.2 **ERB1** AAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTA 1700
NM_001271877.1 **ERB6** -----TATGTA 1049
NM_001040275.1 **ERB2** AAAGAATATCTCTGTGTCAAGGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTA 1700

NM_001214902.1 **ERB3** CCCTCTGGTCACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTC 1372
NM_001214903.1 **ERB4** CCCTCTGGTCACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTC 1372
NM_001271876.1 **ERB5** CCCTCTGGTCACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTC 1372
NM_001437.2 **ERB1** CCCTCTGGTCACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTC 1750
NM_001271877.1 **ERB6** CCCTCTGGTCACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTC 1099
NM_001040275.1 **ERB2** CCCTCTGGTCACAGCGACCCAGGATGCTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTC 1750

NM_001214902.1 **ERB3** ACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGC 1422
NM_001214903.1 **ERB4** ACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGC 1422
NM_001271876.1 **ERB5** ACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGC 1422
NM_001437.2 **ERB1** ACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGC 1800
NM_001271877.1 **ERB6** ACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGC 1149
NM_001040275.1 **ERB2** ACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGC 1800

ERβ 3 sense **ERβ 4 sense**

NM_001214902.1 **ERB3** GGCATC**TCCTCCCAGCAGCAATCCA**TGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCT 1472
NM_001214903.1 **ERB4** GG**CATCTCCTCCCAGCAGCAATC**CATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCT 1472
NM_001271876.1 **ERB5** GGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCT 1472
NM_001437.2 **ERB1** GGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCT 1850
NM_001271877.1 **ERB6** GGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCT 1199
NM_001040275.1 **ERB2** GGCATCTCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCT 1850

ERβ 1/6 sense **ERβ 2 sense** **ERβ 3 antisense**

NM_001214902.1 **ERB3** CCTGTCCCACGTCAGGC**ATGCGAGATGGGGAGAAAAGC**AATTCATTCATT 1522
 NM_001214903.1 **ERB4** CCTGTCCCACGTCAGGCATGCGAGGT----- 1498
 NM_001271876.1 **ERB5** CCTGTCCCACGTCAGGCATGCGAGGT----- 1498
 NM_001437.2 **ERB1** CCTGTCC**CACGTCAGGCATGCGAG**----- 1874
 NM_001271877.1 **ERB6** CCTGTCC**CACGTCAGGCATGCGAG**----- 1223
 NM_001040275.1 **ERB2** CCTGTCCCACGTCAGGCATGCGAGGG----- 1876

NM_001214902.1 **ERB3** TGAAGTTATCTTAGTGCCAAGAGTCATGTGAAAATGTCCCTTGCATGTGG 1572
 NM_001214903.1 **ERB4** -----ACGCG-----CCCT----- 1507
 NM_001271876.1 **ERB5** -----CCTGTG----- 1504
 NM_001437.2 **ERB1** -----**TAACA**AGGG-CATG----- 1887
 NM_001271877.1 **ERB6** -----**TAACA**AGGG-CATG----- 1236
 NM_001040275.1 **ERB2** -----**CAGAAA**AGG-CCTCTC----- 1891

NM_001214902.1 **ERB3** GCAATGAAAGATTTGCAGACGATATAAAAACCCAGACTACCTCATAAAAAGA 1622
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** -----
 NM_001437.2 **ERB1** -----
 NM_001271877.1 **ERB6** -----
 NM_001040275.1 **ERB2** -----

NM_001214902.1 **ERB3** GTTTTGGGAATACACTGAGCTTTGAGTGAAAGAAGCTGCAGTGGCCTCCC 1672
 NM_001214903.1 **ERB4** -----AAGGAGCTGC----- 1517
 NM_001271876.1 **ERB5** -----
 NM_001437.2 **ERB1** -----GAACATCTGC----- 1897
 NM_001271877.1 **ERB6** -----GAACATCTGC----- 1246
 NM_001040275.1 **ERB2** -----AAACTC----- 1901

NM_001214902.1 **ERB3** TGGAGATGGGGAGCAAACCAGCTTAAAGGCCCTTATCCTGAGGAAGAGAC 1722
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** -----
 NM_001437.2 **ERB1** -----
 NM_001271877.1 **ERB6** -----
 NM_001040275.1 **ERB2** -----

NM_001214902.1 **ERB3** AAAAAATTGACATGCACAATATTAAGCTTTGAAATGCAGACCACACTTCCT 1772
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** -----
 NM_001437.2 **ERB1** -----
 NM_001271877.1 **ERB6** -----
 NM_001040275.1 **ERB2** -----

ERβ 2 antisense **ERβ 4 antisense** **ERβ 5 sense**

NM_001214902.1 **ERB3** TTCACTGCAACTTTGACTTGTCCCGCATCTCTACTT-AAGGGCAGAAAAG 1821
 NM_001214903.1 **ERB4** -----TCTGCTT----G**GGC**----- 1528
 NM_001271876.1 **ERB5** -----TAT**AC-AAG**----- 1512
 NM_001437.2 **ERB1** -----TCAACATGAAGTGCA----- 1912
 NM_001271877.1 **ERB6** -----TCAACATGAAGTGCA----- 1261
 NM_001040275.1 **ERB2** -----**CTCATTGGGAATG**----- 1914

NM_001214902.1 **ERB3** GCCTCTCAAACACTCACCTCATTGGGAATGAAGATGGAGACTCTTTTGCC 1871
 NM_001214903.1 **ERB4** -----**TTGGGATG**----- 1536
 NM_001271876.1 **ERB5** -----T**AAAATG**----- 1519
 NM_001437.2 **ERB1** -----AAAATGTGGT-----CCC----- 1925
 NM_001271877.1 **ERB6** -----AAAATGTGGT-----CCC----- 1274
 NM_001040275.1 **ERB2** -----**AAGATGGAGA**-----**CTCTTTTGCC** 1934

NM_001214902.1 **ERB3** TGAAGCAACGATGGAGCAGTGACCCTCTAATCAACTCGGTGGCCTAAAGA 1921
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** -----
 NM_001437.2 **ERB1** -----AGTGTA-----TGACCTGCTG-----CTGGAGA 1948
 NM_001271877.1 **ERB6** -----AGTGTA-----TGACCTGCTG-----CTGGAGA 1297
 NM_001040275.1 **ERB2** TGAAGCAACGATGGAGCAGTGACCCTCTAATCAACTCGGTGGCCTAAAGA 1984

NM_001214902.1 **ERB3** AAAATCTTGGGTAACATTTTCACTTCAGTTCCCTCTG----- 1959
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** -----
 NM_001437.2 **ERB1** -----TGCTGAATGCC-----CACGT---GCTTCGC----- 1971
 NM_001271877.1 **ERB6** -----TGCTGAATGCC-----CACGT---GCTTCGC----- 1320
 NM_001040275.1 **ERB2** AAAATCTTGGGTAACATTTTCACTTCAGTTCCCTCTGGGATCATTGTAA 2034

NM_001214902.1 **ERB3** -----GGATCATTGTAATCCATGAAAAA 1982
 NM_001214903.1 **ERB4** -----**GGATTAT-GTG**CTCCACGGAGGG 1558
 NM_001271876.1 **ERB5** -----CAGCTCACAAA----- 1530
 NM_001437.2 **ERB1** -----GGGT-----GCAAGTCCTCCA----- 1987
 NM_001271877.1 **ERB6** -----GGGT-----GCAAGTCCTCCA----- 1336
 NM_001040275.1 **ERB2** TCCATGAAAAAATAATTTTAAAGAAAGAGT-----TAAAATACTTTGAAG 2080

NM_001214902.1 **ERB3** AATAATTTTAAAGAAAGAGTTAAAATACTTTGAAGTTAGTTATGTGGTTA 2032
 NM_001214903.1 **ERB4** -----TGAAGT----- 1564
 NM_001271876.1 **ERB5** -----AGT----- 1533
 NM_001437.2 **ERB1** -----TCACGGGGTCCG----- 1999
 NM_001271877.1 **ERB6** -----TCACGGGGTCCG----- 1348
 NM_001040275.1 **ERB2** TTAG-----TTATGTGGTTAA----- 2096

**

ERβ 1/6 antisense

NM_001214902.1 **ERB3** AAAACCACCTTCCTTTCTATTATCAATCCAACAATTTGATAACTGTAAAC 2082
 NM_001214903.1 **ERB4** -----GATTTGGGAA----- 1574
 NM_001271876.1 **ERB5** -----CCTGGTATCC----- 1543
 NM_001437.2 **ERB1** --AG-----TG-----CAGCCCGGCA-----GAG**GACAGTAAA**-- 2025
 NM_001271877.1 **ERB6** --AG-----TG-----CAGCCCGGCA-----GAG**GACAGTAAA**-- 1374
 NM_001040275.1 **ERB2** --AAACCACCTTCCTTTCTATTATCAATCCAACAATTTGATAACTGTAAAC 2145

*

NM_001214902.1 **ERB3** GCTAAAGTGAAGACGGATTCTCTTCAGATGGTCTCCTTAACTGCCAGGG 2132
 NM_001214903.1 **ERB4** -----AAGTG----- 1579
 NM_001271876.1 **ERB5** -----AGTGCA-----TCGATTAT---TTGGAT----- 1563
 NM_001437.2 **ERB1** -----**AGCAAAGAGGGC**T-----CCCAGAA 2045
 NM_001271877.1 **ERB6** -----**AGCAAAGAGGGC**T-----CCCAGAA 1394
 NM_001040275.1 **ERB2** GCTAAAGTGAAGACGGATTCTCTTCAGATGGTCTCCTTAACTGCCAGGG 2195

**

ERβ 5 antisense

NM_001214902.1 **ERB3** CTTGCAGATGTCTCACCCATGAGGGGCACCAATGTAGAAAGCTGAGGCTT 2182
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** -----AGAT--TTTC-----TGTA-----T 1577
 NM_001437.2 **ERB1** CCCACAG-----TCTCAGTGACGCCTGGCCCTGAGGTGAA-----CTGG----- 2084
 NM_001271877.1 **ERB6** CCCACAG-----TCTCAGTGACGCCTGGCCCTGAGGTGAA-----CTGG-----1433
 NM_001040275.1 **ERB2** CTTGCAGATGTCTCACCCATGAGGGGCACCAATGTAGAAAGCTGAGGCTT 2245

NM_001214902.1 **ERB3** CATCTACTGATGAGCTTCACTGGTTTCCCCTGAGGTTTGTGCTTTGGCAG 2232
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** CATT-----TGAGTTTGATTAG-----AATTATATCCTTT-----AC 1610
 NM_001437.2 **ERB1** ---CCCACAGAGG-----TCACAGG-----CTGAAGCGTGAAGTCCAG----- 2119
 NM_001271877.1 **ERB6** ---CCCACAGAGG-----TCACAGG-----CTGAAGCGTGAAGTCCAG----- 1468
 NM_001040275.1 **ERB2** CATCTACTGATGAGCTTCACTGGTTTCCCCTGAGGTTTGTGCTTTGGCAG 2295

NM_001214902.1 **ERB3** AGAAGGGGAGGAGGGGACTGGGATTGTGTGGTCAGCTGTGCCTGCCAACA 2282
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** AGATGGGGAGAAAAG-----CAATT 1630
 NM_001437.2 **ERB1** -----TGTGT--CAG---GAGCCTG----- 2134
 NM_001271877.1 **ERB6** -----TGTGT--CAG---GAGCCTG----- 1483
 NM_001040275.1 **ERB2** AGAAGGGGAGGAGGGGACTGGGATTGTGTGGTCAGCTGTGCCTGCCAACA 2345

NM_001214902.1 **ERB3** GATGCAGGTTAGGAACTGTGTTTCACTATCTTCCAATAAGAAAGGGGAAAAT 2332
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** CATTCA----TTTGAAGTTAT--CTTAGTG-----CCAAGAGTCATGTGAAAAT 1673
 NM_001437.2 **ERB1** -----GGCT-----TCA-----TCTTTC-----T 2148
 NM_001271877.1 **ERB6** -----GGCT-----TCA-----TCTTTC-----T 1497
 NM_001040275.1 **ERB2** GATGCAGGTTAGGAACTGTGTTTCACTATCTTCCAATAAGAAAGGGGAAAAT 2395

NM_001214902.1 **ERB3** GCCGATGCCTATCCTCTTTGTTTAGGTAGAAAGTAAAATGCTACTGGACT 2382
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** GTC-----CCTTG-----CATGTGGGCAATGAAA-----GATT 1701
 NM_001437.2 **ERB1** GCTG-----TGT-----GGTC-----CCTC-----ATT 2166
 NM_001271877.1 **ERB6** GCTG-----TGT-----GGTC-----CCTC-----ATT 1515
 NM_001040275.1 **ERB2** GCCGA-----TGC-----CTAT-----CCTCTTTGTT 2417

NM_001214902.1 **ERB3** TAAATGGGCAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 2407
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** T---GCAGACGATATAAAACCCAGAC----- 1724
 NM_001437.2 **ERB1** T-----GG----- 2169
 NM_001271877.1 **ERB6** T-----GG----- 1518
 NM_001040275.1 **ERB2** T-----AGGTAGAAAGTAAAATGCTACTGGACTTAAATGGGCAAAAAAAAA 2463

NM_001214902.1 **ERB3** -----
 NM_001214903.1 **ERB4** -----
 NM_001271876.1 **ERB5** -----
 NM_001437.2 **ERB1** -----
 NM_001271877.1 **ERB6** -----
 NM_001040275.1 **ERB2** AAAAAAA 2470

ANEXO C

Elsevier Editorial System(tm) for Molecular and Cellular Endocrinology

Manuscript Draft

Manuscript Number: MCE-D-14-00405

Title: The role of GPER, non-classical estrogen receptor and MAPKs in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia

Article Type: Research Paper

Keywords: GPR30, p38 α ; ERK1/2; JNK1/2; c-JUN; steroid hormone

Corresponding Author: Dr. Ilma silva,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Fernanda Seibel

Order of Authors: Fernanda Seibel; Alex Araujo; Carmem Sartorio; Joelson Tomedi; Milton Berger; Brasil Neto; Ilma Silva.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: The estrogen receptor GPER is associated with prostate diseases via the activation of intracellular signaling. This paper investigated the role GPER on activation of the mitogen-activated protein kinases in benign prostate hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa). The expression of GPER, and c-JUN proteins and the activation of ERK1/2, p38 α , and JNK1/2 were examined by Western blotting. Cancer cells showed decreased activation of p-38 α protein and ERK1/2 protein as compared to BPH. The activation of JNK1/2, GPER and c-JUN protein expression was significantly higher in PCa.

Our results demonstrated increased gene and protein expression of GPER in PCa. GPER was expressed in the epithelium and stroma with a similar intensity in BPH, but was elevated in the epithelium and stroma in the PCa. GPER is distributed around the nuclear membrane in PCa and BPH. The different distribution of GPER between compartments is an important finding of this work, as this suggests differentiation and the degree of aggressiveness of a tumor.

The role of GPER, non-classical estrogen receptor and MAPKs in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia

Seibel F. E. R¹; Araujo A. S. R¹; Sartorio C. L.¹; Tomedi J¹; Berger M²; Neto B. S²;
Brum I. S¹.

¹*Laboratory of Biology Molecular Endocrine and Tumoral, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,* ²*Urology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.*

Corresponding author: Ilma Simoni Brum da Silva

Rua Sarmiento Leite, 500. Department of Physiology

CEP: 90050-170 - Porto Alegre - RS – Brasil

Email: ilma@ufrgs.br

Telephone: 5521-51 33083656

Abbreviations: PCa, prostate cancer; BPH, benign prostatic hyperplasia.

Abstract

The estrogen receptor GPER is associated with prostate diseases via the activation of intracellular signaling. This paper investigated the role GPER on activation of the mitogen-activated protein kinases in benign prostate hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa). The expression of GPER, and c-JUN proteins and the activation of ERK1/2, p38 α , and JNK1/2 were examined by Western blotting. Cancer cells showed decreased activation of p-38 α protein and ERK1/2 protein as compared to BPH. The activation of JNK1/2, GPER and c-JUN protein expression was significantly higher in PCa. Our results demonstrated increased gene and protein expression of GPER in PCa. GPER was expressed in the epithelium and stroma with a similar intensity in BPH, but was elevated in the epithelium and stroma in the PCa. GPER is distributed around the nuclear membrane in PCa and BPH. The different distribution of GPER between compartments is an important finding of this work, as this suggests differentiation and the degree of aggressiveness of a tumor.

Keywords: GPR30, p38 α ; ERK1/2; JNK1/2; c-JUN; steroid hormone.

1. Introduction

During the aging process in men, the major urogenital tract diseases are prostate cancer (PCa), a malignant cellular growth, as well as benign prostatic hyperplasia (BPH), a benign condition (Boyle et al. 2003; Foster, 2000). Nevertheless, the molecular mechanisms involved in prostatic alterations are not still completely understood. There are many factors associated with the pathogenesis of prostate diseases, such as environmental factors, immune and inflammatory responses, and sexual hormones (testosterone and estrogens) (McNeal, 1990; Denis et al. 1999; Djavan et al. 2002; Nelson et al. 2003). Indeed, prostate diseases have been associated with estrogens and their receptors. However, the effects of estrogens on prostatic epithelium are not totally clear (Carruba, 2006; Carruba, 2007).

Estrogens exert a relevant role on the growth, differentiation and function of many target tissues in women and men. The classical mechanism of action of estrogens is based on its interaction with the estrogen nuclear receptor (ER), leading to the control of gene expression. On the other hand, the non-genomic mechanism of estrogens seems to exert a role on signaling pathways that direct or indirectly modulate gene expression. In this scenario, the G protein-coupled receptor, GPER (previously named GPR30), has been implicated in mediating both rapid and transcriptional events in response to estrogen (Maggiolini and Picard, 2010).

GPER is a member of the 7-transmembrane receptor family, which signals through heterotrimeric guanine nucleotide binding proteins, modulating the activity of effector proteins (Prossnitz and Maggiolini, 2009). Some studies support the hypothesis that GPER represents an estrogen-responsive receptor, and its overexpression seems to be pivotal in breast, endometrial and ovarian carcinomas (Filardo et al. 2006; Vivacqua et al. 2006b; Albanito et al. 2007). In the same way, GPER can activate multiple cellular signaling pathways, such as the phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (Prossnitz and Maggiolini, 2009).

MAPKs are serine/threonine kinases that mediate intracellular signaling associated with a variety of cellular activities, including cell proliferation, differentiation, survival, death, and transformation (Pearson et al. 2001). Three main members that integrate the MAPK family are the extracellular signal-regulated protein kinases (ERK1/2), stress-activated protein kinase c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), and stress-activated protein kinase 2 (p38). ERK1/2 are generally associated with mitogenesis and inversely related to

apoptosis. JNK is generally associated with apoptosis induction, while p38 seems to play dual role in cellular growth and death (Pearson et al. 2001).

There is a paucity of studies that have demonstrated the key role of MAPK-dependent intracellular signaling and GPER on the development of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer (Rodriguez-Berriguete et al. 2011). Therefore, the aim of this study is to investigate whether not only differential activation, but also interplay between GPER and MAPK pathways exist in the development of BHP and PCa.

2. Materials and methods

2.1. Patient selection

The study included prostate specimens obtained from patients with ages ranging from 45 to 90 years, who were undergoing transurethral resection for the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH) or radical prostatectomy for the treatment of prostate cancer (PCa), during a 12-month period at the Urology Service, at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. The prostatic tissue of sixteen patients was analyzed with regard to gene expression and ten patients were assessed for protein expression in each group of the study. Patients submitted to hormonal treatment or with other neoplasia concomitant were excluded.

2.2. Study protocol

All patients included in this study were submitted to routine preoperative assessment. The diagnosis of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer was based on anatomopathologic examination. Clinicopathological data collected included age and Gleason score. Samples from the tumoral area of tissues were obtained during the surgery, identified, immediately frozen in liquid nitrogen and then transferred to a -80°C freezer for later protein extraction. The study protocol was approved by the Ethics Committee at HCPA (# 110518), and written and informed consent was obtained from every subject.

2.3. Immunofluorescence analysis

The formalin-fixed samples were paraffin-embedded, sectioned at a thickness of 5 μm and placed on coated glass slides (Biocare Medical). Slides were kept at 56°C overnight; sections were deparaffinized by incubation in xilol for 15 minutes, and then rehydrated through a graded series of ethanol and water. After hydration, antigen retrieval was performed

by heating sections in 10 mM Sodium Citrate buffer for 20 minutes. Samples were then blocked with a solution of PBS containing 1% albumin and Tween 0.1% for 30 minutes at room temperature. Slides were incubated overnight at 4°C with the following polyclonal rabbit primary antibodies anti-GPR30 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), and further incubated with a secondary antibody anti-rabbit Alexa Fluor[®] 488 (Life Technologies, USA). In order to identify epithelial cells, the slides were secondarily incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti cytokeratin 8 diluted 1:300 (Dako Cytomation). The samples were then washed with PBS and incubated with the secondary antibody Alexa Fluor[®] 660 anti-mouse (Life Technologies, USA). To identify stromal cells, the slides were incubated with antibody rabbit anti-vimentina conjugated with Alexa Fluor[®] 660 diluted 1:300 (Cell Signaling). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Hoechst). Slides were mounted and the immunolabeled slices were observed using a confocal laser microscope Olympus FV1000. Ten single confocal sections of 0.7 µm were taken parallel to the coverslip (xy sections) using an Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope equipped with an x60 (numeric aperture 1.35) oil-immersion objective (Olympus, U plan-super-apochromat, UPLSAPO60XO). For each sample, images of three fields were acquired with Olympus FluoView FV1000 software.

Imaging pre-processing (iterative deconvolution) and fluorescence intensity measurements were performed using the public domain Java Image processing software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.4. Quantitative Real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

RNA was extracted by an RNeasy mini kit (RNeasy Mini Kit[®] Qiagen, Germany). The supernatant was used to complete the RNA extraction according to the manufacturer's guidelines. The total RNA concentration was measured by absorbance at 260 nm in a spectrophotometer for nucleic acids (GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Cambridge, England), and the optical density (OD) ratios (260/280 nm) were greater than 1.6.

First-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA, using the SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), according to the manufacturer's guidelines.

GPER was quantified using RT-qPCR assays in 7500 Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, EUA). Primer sequences were chosen with the assistance of the

computer Primer Express[®] Software v3.0 (Applied Biosystems, California, USA). The oligonucleotides and their sequences were as follows: the housekeeping gene *β2-microglobulin* (BMG): (forward), CTATCCAGCGTACTCCAAAG, BMG (reverse), ACAAGTCTGAATGCTCCACT and GPER (forward), CTGGGGAGTTTCCTGTCTGA, GPER (reverse), GCTTGGGAAGTCACATCCAT. PCR reactions were performed using Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), with a DNA Engine Opticon 2 (MJ Research, USA). The final volume was 25 μL; cDNA was diluted tenfold for GPER and BMG. The PCR cycle conditions were: GPER – denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 59°C for 40 s, and extension at 72°C for 40 s; BMG – denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. PCR products were confirmed by specific melting point. A relative quantification standard curve with a pool of ten-fold serial dilutions from a known amount of cDNA was used to quantify the amount of mRNA in the samples. The pool was made of 10 BPH cDNA samples and used for all experiments.

2.5. Western blot analysis

Protein was extracted with RIPA buffer and quantified using the Bradford method (Bradford, 1976). Tissue homogenization, electrophoresis, and protein transference were performed as described elsewhere (Araujo et al., 2011). Equal amounts of protein (50 μg) were loaded into each well. The membranes were processed for immunodetection using rabbit GPR30 polyclonal antibody (38 kDa), mouse anti-total ERK1/2 monoclonal antibody (44/42 kDa), rabbit anti-phospho-ERK1/2 (Thr 202; 44/42 kDa) polyclonal antibody, rabbit anti-total p38α polyclonal antibody (38 kDa), rabbit anti-phospho-p38 (Thr 180/Tyr 182; 38 kDa) polyclonal antibody, mouse anti-total JNK1/2 monoclonal antibody (46/54 kDa), mouse anti-phospho-JNK1/2 (Thr 183/Tyr 185; 46/54 kDa) monoclonal antibody and rabbit anti-c-JUN polyclonal antibody (39 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The bound primary antibodies were detected using goat-anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 1:5000, (Santa Cruz Biotechnology) and goat-anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology); secondary antibodies and membranes were revealed using chemiluminescence. The autoradiographs generated were semi-quantitatively analyzed for the protein levels with an image densitometer (Image J). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad). Mouse anti-β-

tubulin 50kDa (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was used to normalize GPR30 and c-JUN protein amounts. All results were expressed as arbitrary units (AU).

2.6. Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard error of mean (S.E.M.), unless otherwise noted. Comparisons between group means were analyzed by Student's *T* test. Comparisons between median values were analyzed using the Mann-Whitney test. Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$. All analyses were performed using the Statistical Packages for the Social Sciences 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For the immunofluorescence experiments, the degree of co-localization was calculated using the Manders co-localization coefficient (mean + S.E., * $P < 0.05$, unpaired two-tailed student's *T*-test).

3. Results

3.1. Patient characteristics

The mean age was similar in both groups: in BPH, the mean was 61 ± 3.17 years and in PCa, the mean was 64 ± 1.05 years (mean \pm S.E.). Patients with PCa showed PSA levels 4 times higher than the BPH group ($p = 0.007$, Student *T* test). In BPH, PSA measure in ng/mL was 3.92 ± 0.67 and in PCa this was 14.86 ± 5.25 (mean \pm S.E.)

The anatomopathologic examination of PCa group showed that 22% of the patients had a Gleason score equal to 6, 67% of the patients had a Gleason score of 7, and 11% of the patients had a Gleason score equal to 9. Of the samples analyzed, 78% had a Gleason score ≥ 7 .

3.2. Immunofluorescence

The location of the GPER receptor and its intensity was evaluated in prostatic tissue from BPH and PCa. The analysis of GPER by immunofluorescence showed that GPER is more highly expressed in epithelial tissue in both groups. The results are shown in Figures 1 and 2. Expression of GPER in PCa tissue was higher compared to the BPH group. The expression of GPER in epithelial tissue seemed to be higher in PCa compared to the BPH group.

Furthermore, measures of GPER relative to the nucleus show that this receptor is positively-located in the nucleus in both BPH and PCa tissue, being more co-located in the nucleus of PCa.

3.3. Gene and protein expression of GPER receptor

The results of GPER gene and protein expression are shown in Figures 3A and 3B, respectively. We detected GPER expression in all samples of PCa and BPH tissues. Both GPER gene and protein expression was increased in the PCa group compared to the BPH group with $P=0.0001$ and $P=0.001$, respectively.

3.4. Expression and activation of ERK1/2 and p38 α proteins

ERK1/2 protein expression was evaluated in BPH and PCa tissues. Our results showed ERK1/2 protein expression in both groups. Activation of ERK1/2 protein was decreased ($P=0.014$) in the PCa group compared to the BPH group (Figure 4A).

The evaluation of p38 α protein expression showed its presence in both groups. However, the level of phosphorylated p38 α measured by western blots (Figure 5B) was decreased ($P=0.004$) in the PCa group compared to the BPH group.

3.5. Expression and activation of JNK1/2 protein

JNK1/2 protein expression was evaluated in BPH and PCa tissues. Our results showed JNK1/2 protein expression in both groups. The evaluated activation of JNK1/2 protein showed an increase ($P=0.001$) in the PCa group compared to the BPH group (Figure 4C).

3.6. Protein expression of c-JUN

The c-JUN protein expression is shown in Figure 4D. We detected c-JUN protein expression in both PCa and BPH tissues; however, c-JUN protein expression was increased in the PCa group compared to the BPH group ($P=0.001$).

4. Discussion

Some relevant aspects were demonstrated in this study regarding the molecular mechanisms involved in the establishment of prostate hyperplasia and cancer. Initially, the increased GPER expression together with the activation of JNK1/2 and c-Jun protein in the prostate cancer seems to be crucial for tumor development. On the other hand, ERK1/2 and

p38 α activation were higher in prostatic hyperplasia and can contribute to better cell differentiation in this tissue in relation to prostate cancer tissue.

There are few studies on GPER in prostate tissue comparing gene and protein expression of this receptor between prostate hyperplasia and cancer. In this sense, our data showed that GPER expression was higher in PCa than BPH. The increased expression of GPER was significantly associated with tumor size and potential metastasis in breast cancer, suggesting a potential degree of tumor aggressiveness (Prossnitz et al. 2008). To date, studies comparing GPR30 protein expression in PCa human tissue and BPH human tissue have not been found. Park and collaborators demonstrated low protein expression of GPR30 in the BPH-derived prostate stromal cells compared to normal stromal line cells (Park et al. 2009). Chan and collaborators evaluated mRNA GPR30 in the androgen deprivation-resistant cell lines, PC-3 and DU-145, and showed that GPR30 gene expression was higher in PC-3 cells than in DU145 cells (Chan et al. 2010). The observation of increased GPER gene and protein expression in prostate cancer may indicate a novel mechanism of action of estrogen in this disease, since this hormone can bind to GPER and start estrogen-dependent signaling. In parallel, our results also demonstrated that GPER was expressed in the epithelium and stroma with similar intensity in hyperplastic tissue. Nevertheless, GPER levels were elevated in the epithelium compared to stroma in PCa and BPH. In addition, we observed strong GPER expression distributed around the nucleus membrane in tumor tissue, as observed by immunofluorescence. The different distribution of this receptor in the epithelial and stromal compartments between prostate hyperplasia and cancer is an important finding of this work, as this suggests differentiation and degree of aggressiveness of the tumor. In breast cancer, it has been reported that localization of GPER can be a cellular marker of differentiation. Indeed, Samartiz and colleagues demonstrated that predominantly nuclear GPER expression can indicate a poorly differentiated tumor. These results, therefore, suggest a pivotal role of GPER on molecular mechanisms involved in distinct types of cell growth (Samartiz et al. 2014). Likewise, GPER seems to play an important role in the modulation of intracellular signaling pathways (Revankar et al. 2005).

GPER may mediate the activation of estrogen-dependent kinases and transcriptional responses. Signaling pathways modulated by GPER include those of MAPKs, which can control transcriptional nuclear events and cell proliferation (Prossnitz et al. 2008). In the present study, we analyzed the expression and activation of MAPK family proteins, such as ERK1/2, JNK, and p38 α , in prostate hyperplasia and cancer. Our results demonstrated decreased ERK1/2 activation in prostate cancer compared to benign hyperplastic tissue.

ERK1/2 may be involved in increased cellular proliferation levels as observed not only in benign prostatic hyperplasia, but also in prostate cancer (Royuela et al. 2002). Uzgare and colleagues found that ERK1/2 is differentially expressed and activated during the progression of prostate cancer (Uzgare et al. 2003). It has been reported that GPER is involved in estrogen-induced signaling pathways, such as activating ERK1/2 in normal stromal prostate cells. Nevertheless, this mechanism does not occur in prostate hyperplasia, indicating that ERK1/2 activation is GPER-independent in this tissue (Park et al. 2009). On the other hand, in cell line PC3 prostate cancer, agonist G1-induced GPR30 activation inhibited cell growth through the stimulation of ERK1/2 (Chan et al. 2010). Moreover, ERK1/2 inhibition has been shown to coincide with high Gleason grades and poorly differentiated prostate cancer (Magi-Galluzzi et al. 1997; Malik et al. 2002). Considering these data, we suggest that ERK1/2 activation is associated with cellular growth in BPH and PCa. However, decreased activation of this signaling pathway during the progression of prostate cancer can lead to diminished cell differentiation. It has been postulated that pERK/p-p38 may be used to predict *in vivo* a predisposition to cancer, including prostate cancer, suggesting that the decrease in ERK activity in these cells is due to the negative feedback of p38 (Aguirre-Ghiso et al. 2003).

In this study, we observed a lower activation of p38 α in prostate cancer when compared to benign prostatic hyperplasia. Royuela and collaborators showed high activity of the p38 protein in the normal prostate tissue that may become more active in situations of cancer and benign prostatic hyperplasia (Royuela et al. 2002). Studies suggest that increased p38 activation can be lost in poorly differentiated tumor, such as in cervical intraepithelial neoplasia, and well-differentiated tumors (Uzgare et al. 2003). A previous study using a transgenic rat model showed that p38 activation occurs concomitantly with the prostate cell proliferation and the initiation of prostate cancer, while inactivation of p38 was concomitant with the appearance of a poorly differentiated metastatic androgen-independent phenotype (Uzgare et al. 2003). Our results are in agreement with this study, showing less activation of p38 in prostate cancer. Indeed, p38 α plays a role in cell differentiation, growth, proliferation, survival, apoptosis, transcription factor regulation, cell cycle and apoptosis (Pearson et al. 2001). Furthermore, the p38 α protein negatively regulates cell proliferation by suppressing the activation of JNK/c-Jun (Junttila et al. 2008).

Our results show that the activation of JNK and c-JUN proteins is increased in prostate cancer compared to benign prostatic hyperplasia tissue. JNK has been involved in development, morphogenesis, cell differentiation and programmed cell death (Liu and Lin, 2005). Depending on the situation, JNK can activate or deactivate signaling proteins, resulting

in a markedly different cellular response (Bode and Dong, 2007). In accordance with our study, Royuela and collaborators showed the increased expression of JNK in malignant prostatic epithelium, suggesting that the most likely action of JNK would be the stimulation of cell proliferation in prostate cancer (Royuela et al. 2002). In addition, JNK could be involved in the metastasis of prostate cancer through its ability to regulate cellular invasion and migration adhesion, promoting the expression of matrix metalloproteinases (MMPs), which are proteins that are responsible for degradation of the extracellular matrix during invasion in prostate cancer (Chien et al. 2010). As for JNK, GPR30 also appears to be involved in the activation of matrix metalloproteinases (Prossnitz et al. 2008). Furthermore, JNK is able to activate numerous functions in prostate cells, which include both transcription factors and functional proteins in cancer. c-Jun is a major substrate of JNK phosphorylation and an aggressive marker of prostate cancer (Bode and Dong, 2007; Ouyang et al., 2008). Our study showed increased protein expression of c-Jun in prostate cancer. c-Jun can form a complex with the transcription factor AP-1, which is key in carcinogenesis. The activation of AP-1 can also result in the binding of various genes involved in inflammation, apoptosis and proliferation to DNA (Angel and Karin, 1991).

5. Conclusion

Taken together, our results suggest that GPER may be acting in the development of prostate cancer. The increased GPER expression in prostate cancer can act synergistically with JNK-activating metalloproteinases, which may facilitate tumor growth and metastasis. We further propose that increased activation of p38 α in benign prostatic hyperplasia inhibits the activation of JNK/c-JUN, regulating proliferation in this disease. Furthermore, the increased activation of ERK1/2 and p38 α in BPH may explain the better cell differentiation in this disease compared to that in prostate cancer.

6. Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

7. Funding

This work was supported by the CNPq, CAPES and FAPERGS Brazilian Research Agencies.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul) and the Graduate Research Group (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

References

- Aguirre-Ghiso, J.A., Estrada, Y., Liu, D., Ossowski, L., 2003. ERK^{MAPK} activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38^{SAPK}. *Cancer Res.* 63, 1684–1695.
- Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Musti, A.M., Ando, S., Maggiolini, M., 2007. G protein coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 β -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 67, 1859–1866.
- Angel, P., Karin, M., 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1072, 129–157.
- Araujo, A. S., Diniz, G. P., Seibel, F. E., Branchini, G., Ribeiro, M. F., Brum, I. S., Khaper, N., Barreto-Chaves, M. L., Belló-Klein, A., 2011. Reactive oxygen and nitrogen species balance in the determination of thyroid hormones-induced cardiac hypertrophy mediated by renin-angiotensin system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 333, 78–84.
- Bode, A. M., Dong, Z., 2007. The functional contrariety of JNK. *Mol. Carcinog.* 46, 591–598.
- Boyle, P., Severi, G., Giles, G. G., 2003. The epidemiology of prostate cancer. *Urol. Clin. North Am.* 30, 209–217.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7, 248–254.
- Chan, Q. K. Y., Lam, H-M., Ng, C-F, Lee, A. Y. Y., Chan, E. S. Y., Ng, H-K., Ho, S-M., Lau, K-M., 2010. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent up-regulation of p21, and induction of G2 cell-cycle arrest. *Cell Death Differ.* 17, 1511–1523.
- Chien, C. S., Shen, K. H., Huang, J. S., Ko, S. C., Shih, Y. W., 2010. Anti-metastatic potential of fisetin involves inactivation of the PI3K/Akt and JNK signaling pathways with down-

regulation of MMP-2/9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Mol. Cell Biochem.* 333, 169–180.

Carruba, G., 2006. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1089, 201–217.

Carruba, G., 2007. Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *J. Cell. Biochem.* 102, 899–911.

Denis, L., Morton, M. S., Griffiths, K., 1999. Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur. Urol.* 35, 377–387.

Djavan, B., Remzi, M., Erne, B., Marberger, M., 2002. The pathophysiology of benign prostatic hyperplasia. *Drugs today.* 38, 867–876.

Filardo, E. J., Graeber, C. T., Quinn, J. A., Resnick, M. B., Giri, D., DeLellis, R. A., Steinhoff, M. M., Sabo, E., 2006. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 12, 6359–6366.

Foster, C. S., 2000. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 9, 4–14.

Junttila, M. R., Li, S. P., Westermarck, J., 2008. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 22, 954–965.

Liu, J., Lin, A., 2005. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res.* 15, 36–42.

Maggiolini, M., Picard, D., 2010. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J. Endoc.* 204, 105–114.

Magi-Galluzzi, C., Mishra, R., Fiorentino, M., Montironi, R., Yao, H., Capodiceci, P., Wishnow, K., Kaplan, I., Stork, P. J., Loda, M., 1997. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. *Lab. Invest.* 76, 37–51.

Malik, S. N., Brattain, M., Ghosh, P. M., Troyer, D. A., Prihoda, T., Bedolla, R., Kreisberg, J. I., 2002. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin. Can. Res.* 8, 1168–1171.

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

Nelson, W. G., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B., 2003. Prostate cancer. *New Engl. J. Med.* 349, 366–381.

Ouyang, X., Jessen, W. J., Al-Ahmadie, H., Serio, A. M., Lin, Y., Shin, W. J., Reuter, V. E., Scardino, P. T., Shen, M. M., Aronow, B. J., Vickers, A. J., Gerald, W. L., Abate-Shen, C.,

2008. Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer. *Cancer Res.* 68, 2132–2144.

Park, I. I., Zhang, Q., Liu, V., Kozlowski, J. M., Zhang, J., Lee, C., 2009. 17 β -estradiol at low concentrations acts through distinct pathways in normal versus benign prostatic hyperplasia-derived prostate stromal cells. *Endocrinology.* 150, 4594–4605.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M. H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews.* 22, 153–183.

Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Smith, H. O., Oprea, T. I., Sklar, L. A., Hathaway, H. J., 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 165–190.

Prossnitz, E. R., Maggiolini, M., 2009. Mechanisms of estrogen signaling via GPR30. *Mol. Cell. Endocrinol.* 308, 32–38.

Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., Prossnitz, E. R., 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 307, 1625–1630.

Rodriguez-Berriguete, G., Fraile, B., Martinez-Onsurbe, P., Olmedilla, G., Paniagua, R., Royuela, M., 2011. MAP kinases and prostate cancer. *J. Signal. Transduct.* 2012:169–170. doi: 10.1155/2012/169170. Epub.

Royuela, M., Arenas, M. I., Bethencourt, F. R., Sanchez-Chapado, M., Fraile, B., Paniagua, R., 2002. Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. *Hum. Pathol.* 33, 299–306.

Samartzis, E. P., Noske, A., Meisel, A., Varga, Z., Fink, D., Imesch, P., 2014. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer. *PLoS One.* 9 (1), e83296. doi: 10.1371/journal.pone.0083296.

Uzgare, A. R., Kaplan, P. J., Greenberg, N. M., 2003. Differential expression and/or activation of p38MAPK, ERK1/2, and JNK during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate.* 55, 128–139.

Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Recchia, A. G., Musti, A. M., Picard, D., Ando, S., Maggiolini, M., 2006. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 20, 631–646.

CAPTIONS:

Figure 1. Immunofluorescent staining analysis of GPER in stromal tissue of BPH and PCa. Column 1 represents benign prostatic hyperplasia tissue and column 2 represents prostate cancer tissue. A) Blue staining for nucleus, B) red staining for vimentin, C) green staining for GPER, D) merge, and E) PDM image. Mander's coefficient was 0.715 to BPH and 0.776 to PCa. Size image 70.312 μm x 70.312 μm .

Figure 2. Immunofluorescent staining analysis of GPER in epithelial tissue of BPH and PCa. Column 1 represents benign prostatic hyperplasia tissue and column 2 represents prostate cancer tissue. A) Blue staining for nucleus, B) red staining for cytokeratin, C) green staining for GPER, D) merge, and E) PDM image. Staining for GPER in prostate cancer was higher in PCa as compared to BPH and GPER expression seems to have increased intensity around the nucleus in PCa. Mander's coefficient was 0.705 to BPH and 0.772 to PCa. Size image 70.312 μm x 70.312 μm .

Figure 3. Gene and protein expression of GPER. qRT-PCR and western blot analysis was performed to estimate gene and protein expression, respectively. A) Gene expression (n= 18), Mann-Whitney test, data are expression as median and interquartile range 25/75. B) Protein expression (n= 10), T test, data are expressed as means \pm SEM. *, $P < 0.05$. Our results showed higher gene and protein expression of GPER in PCa group as compared to BPH.

Figure 4. Western blot analysis by antibody polyclonal (A) pERK1/2/total ERK, (B) p-P38 α /total P38 α (C) p-JNK1/2/total JNK1/2 and D) c-JUN/ β -tubulin protein expression in representative samples of BPH and PCa. Mann-Whitney test, data are expressed as median and interquartile range 25/75. *, $P < 0.05$. Our results showed ERK1/2 and p38 α activation higher in BPH, JNK1/2 activation and c-JUN protein expression higher in PCa.

Figure 1.

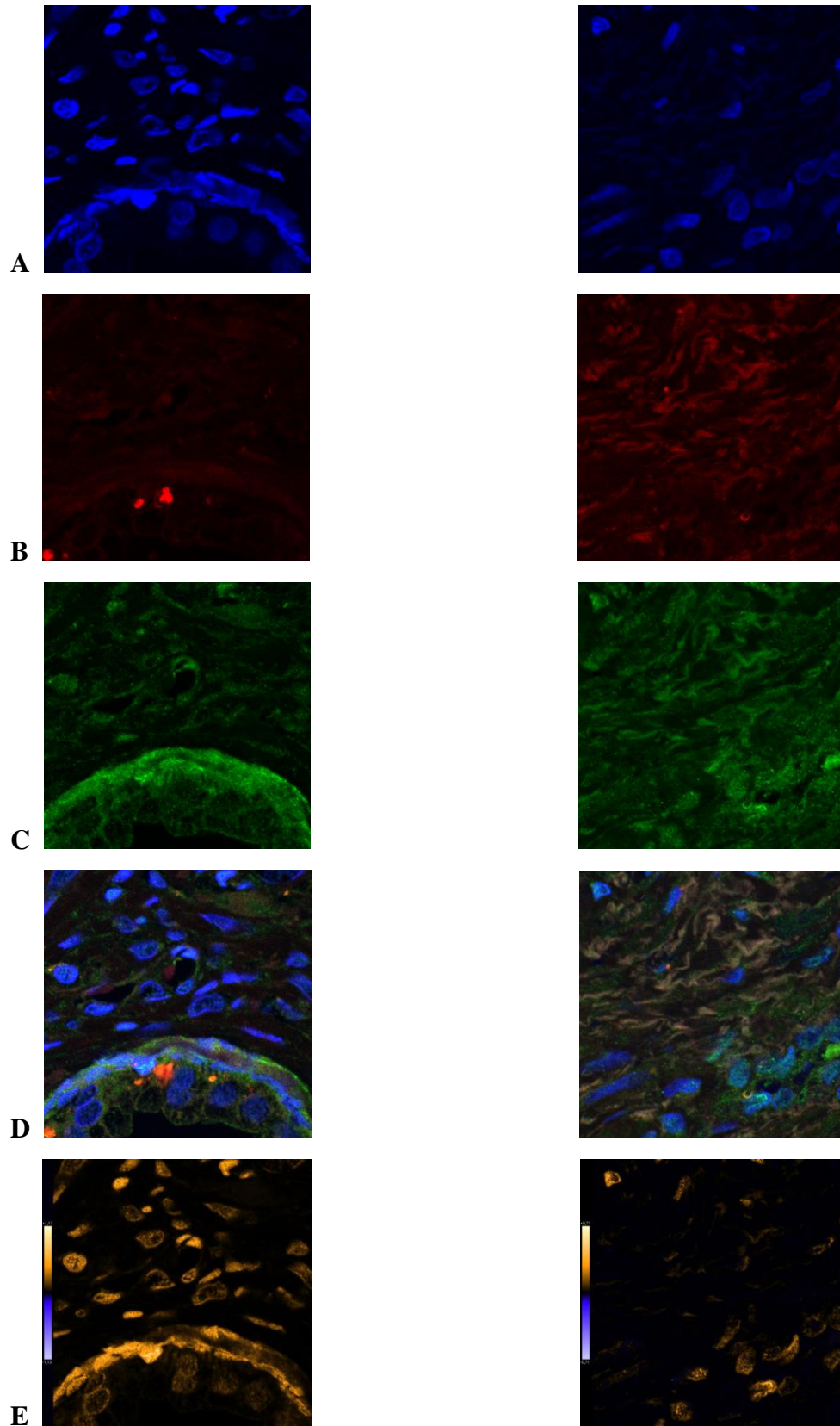


Figure 2.

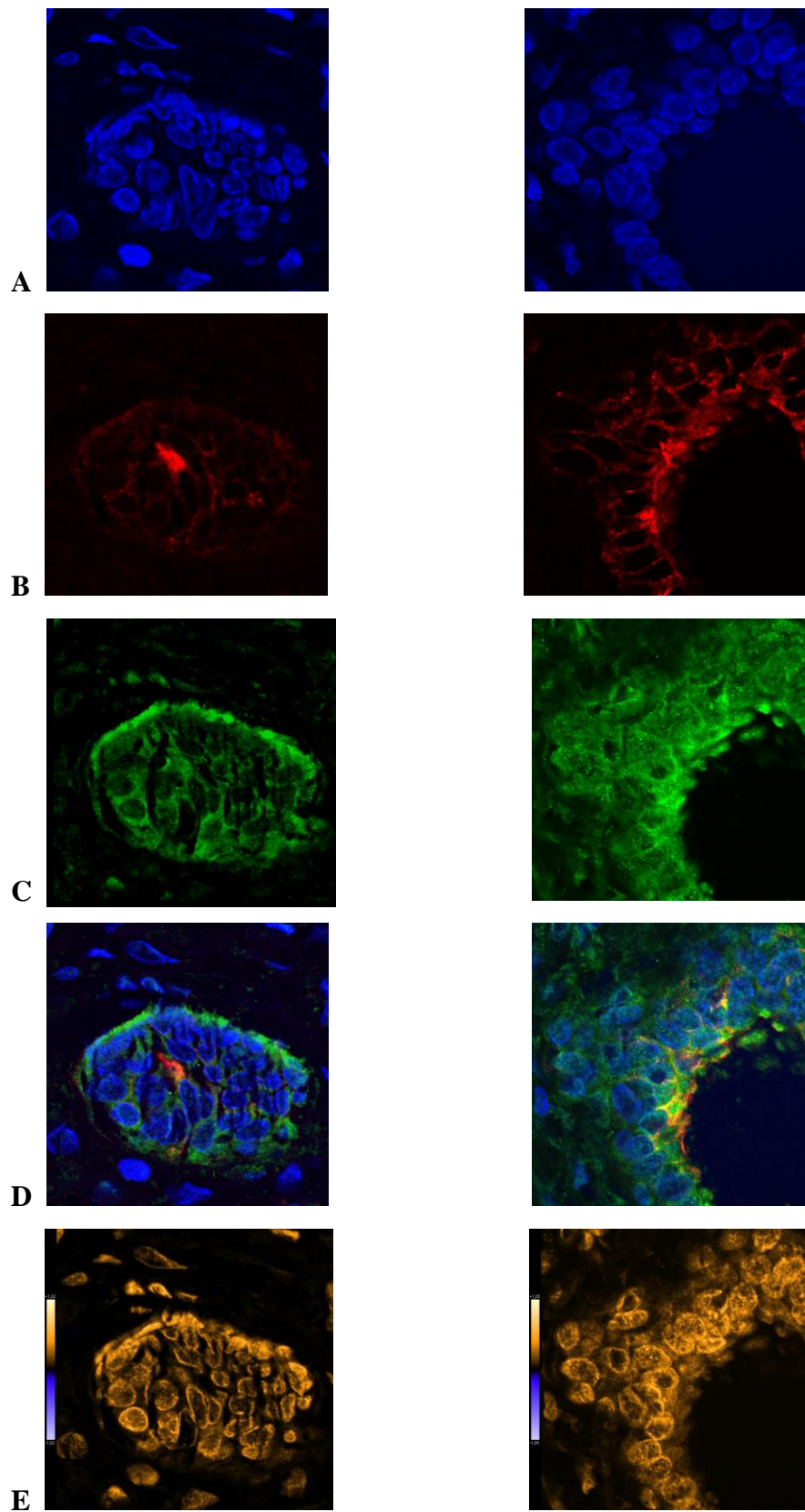
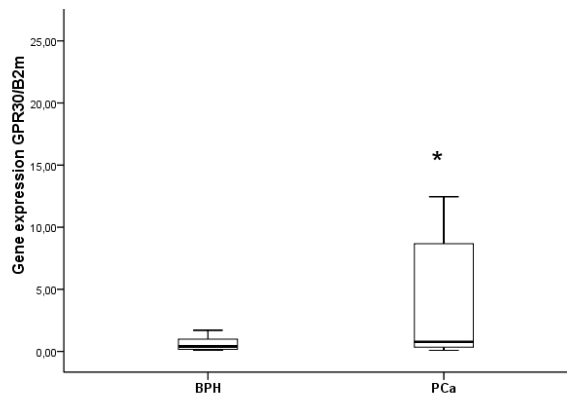


Figure 3.

A)



B)

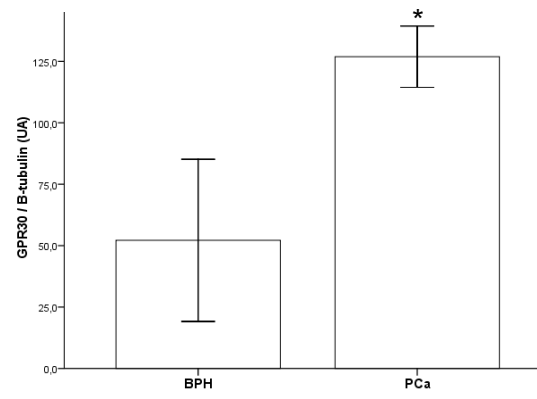
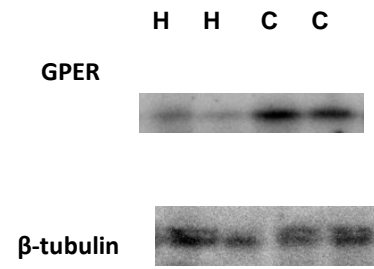
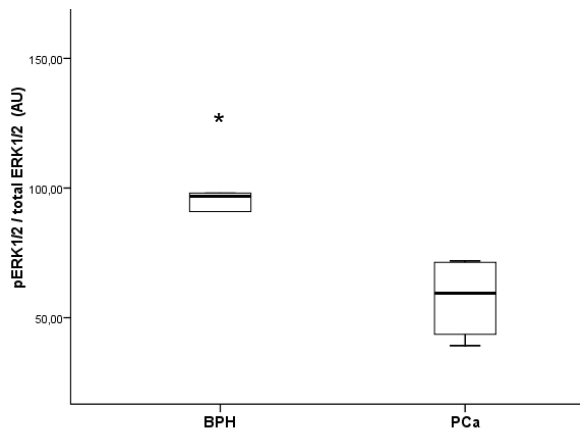
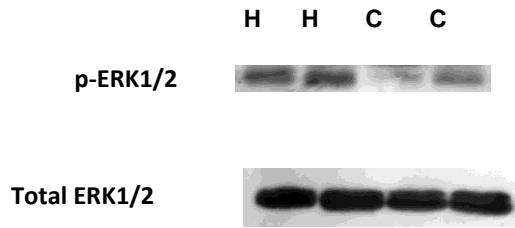
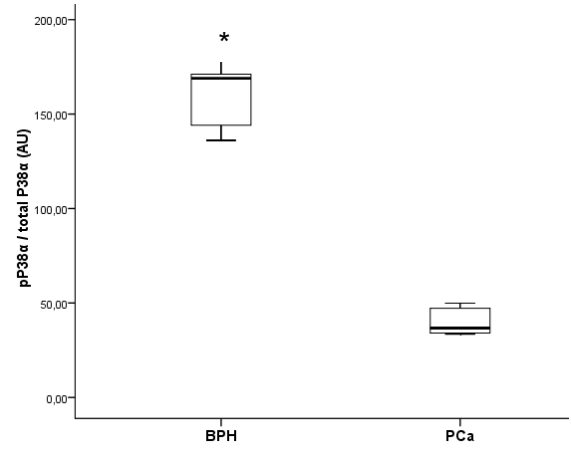
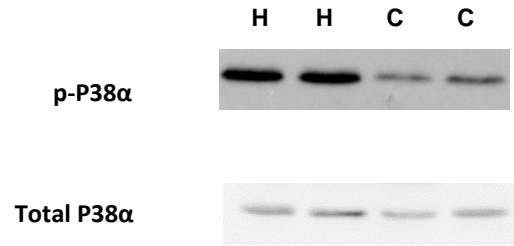


Figure 4.

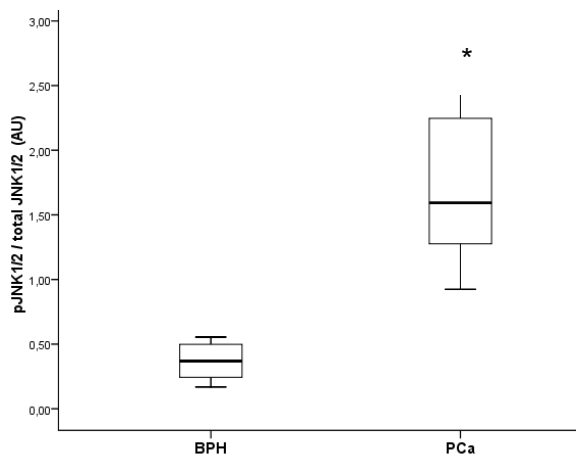
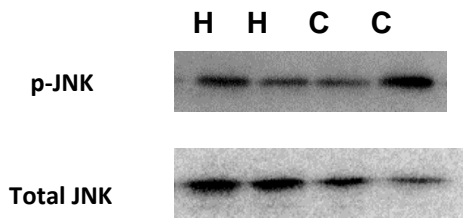
A)



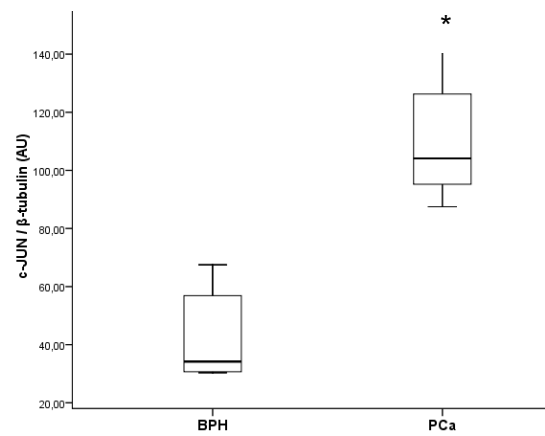
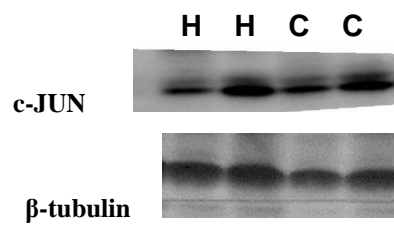
B)



C)



D)



ANEXO D

Role of estrogen receptors in prostate cancer: good or bad?

Seibel F. E. R¹; Araujo A. S. R¹; Sartorio C. L.¹; Berger M²; Brum I. S¹.

¹*Laboratory of Biology Molecular Endocrine and Tumoral, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ²Urology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil*

Corresponding author: Ilma Simoni Brum da Silva

Rua Sarmiento Leite, 500. Department of Physiology

CEP: 90050-170 - Porto Alegre - RS – Brasil

Email: ilma@ufrgs.br

Telephone: 552151 33083656

Abbreviations: ER, estrogen receptor; PCa, prostate cancer; BPH, benign prostatic hyperplasia.

Abstract

Estrogens have been associated with prostate diseases. The estrogen receptor ER α has been implicated as a mediator of genomic signaling seen in response to estrogen exposure, including the activation of PI3K and MAPK cascades. There are evidences relating ER α receptor with many types of cancer. This paper investigates the expression of ER α and the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa) and their relationship with mitogen-activated protein kinase.

Method: The expression of ER α , PI3K and mTOR proteins and activation of GSK3 β and AKT were examined by Western blot. Measure of estrogen tissue was performed in PCa and BPH.

Results: Our results showed in PCa increased activation of AKT and higher ER α and PI3K protein expression as compared to BPH. mTOR was decreased in PCa and GSK3 β was less activated. Measure of estrogen tissue was increased in PCa group.

Conclusions: There are three different ways of activating the estrogen receptor ER α in PCa: the higher concentration of estrogen, the higher protein expression of PI3K and the increased activity of AKT, suggesting that the presence of this receptor has a role important in the pathophysiology of this disease.

Key words: AKT; mTOR; GSK3 β ; GPER; ER α , MAPK.

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) is the most common malignant and benign disease, respectively, in aging men (Boyle et al., 2003). Molecular pathology of prostate diseases is still unknown. Some factors are associated with the pathogenesis of prostate diseases such as environmental factors (e.g., diet), host immune response, inflammatory response, testosterone and estrogens (Djavan et al., 2002; Grönberg et al., 2003; Nelson et al., 2003).

Prostate pathologies have been related to estrogens. It has been shown, in different species, that estrogens in synergy with the androgens, induce glandular hyperplasia, dysplasia and prostate cancer (Nilsson & Gustafsson, 2000).

In men, the balance of systemic levels of androgens and estrogens is altered significantly with age. Occurs decline in plasma androgen levels, while estrogen levels remain relatively constant or increased. This eventually leads to the decrease in the ratio androgen/estrogen with age, suggesting that estrogens may also play a role in the development of prostate cancer (Carruba, 2006).

One of the classical estrogen receptor, estrogen receptor α (ER α or ESR1) is coded for gene ESR1 located in the chromosomal 6q25.1 locus (Koehler et al., 2005). ER α is classified as type I receptor and is believed to possess properties common to all kinds of nuclear receptor type I. This classification is due to the fact that it is found in the cytosol and after connection with the binder it does nuclear translocation forming homodimers or heterodimers and binds the responsive elements (Leung et al., 2006).

Since estrogen is freely permeable to cell, it gets access to intracellular estrogen receptors. The binding of estrogen to the classical estrogen receptor (ER) leads to activation of transcription directly as well as the signal transduction events. Estrogens can directly activate ERs along with co-activators and corepressors, directly regulate transcriptional events. ERs can activate multiple cellular pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphatidylinositol-3-kinases (PI3Ks) that can lead to phosphorylation of ERs by altering the interactions of ERs with co-regulators (Prossnitz et al., 2008).

This study aims to evaluate the possible interaction between the estrogen receptor ER α with PI3K pathway in the development of prostatic diseases.

2. Materials and Methods

2.1. Patients selection

The study included prostate specimens obtained from patients undergoing transurethral resection for the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH) or radical prostatectomy for the treatment of prostate cancer (PCa), during a 12-month period at the Urology Service, at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. Eighteen patients for each group, whose ages ranged from 45 to 90 years, were selected for the study. Patients submitted hormonal treatment was eliminated.

2.2. Study protocol

All patients included in this study were submitted to routine preoperative assessment. The diagnosis of BPH and PCa was based on anatomopathologic examination. Clinicopathological data collected included age and Gleason score. Samples from the tumoral area of tissues were obtained during the surgery, identified, immediately frozen in liquid nitrogen and then transferred to a -80°C freezer for posterior protein extraction. The study protocol was approved by the Ethics Committee at HCPA (# 110518), and written and informed consent was obtained from every subject.

2.3. Immunofluorescence analysis

The formalin fixed samples were paraffin embedded, sectioned at 5 μm thickness and placed on coated glass slides (Biocare Medical). Slides were kept at 56°C overnight, sections were deparaffinized by incubation in xilol during 15 minutes, then, rehydrated through a graded series of ethanol and water. After hydration, antigen retrieval was performed by heating sections in 10 mM Sodium Citrate buffer for 20 minutes. Samples were then blocked with solution of PBS 1% albumin, Tween 0,1% during 30 minutes at room temperature. Slides were incubated overnight at 4°C with the following polyclonal rabbit primary antibodies: anti-ER α 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and further incubated with a secondary antibody anti-rabbit Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen Molecular Probes, Paisley, UK). In order to identify epithelial cells, the slides were secondarily incubated overnight at 4°C , with mouse monoclonal anti cytokeratin 8 diluted 1:300, (Dako Cytomation). The samples were washed with PBS and incubated with the secondary antibody Alexa Fluor 660 anti-mouse (Invitrogen). To identify stromal cells, the slides were incubated with antibody rabbit anti-vimentina conjugad with Alexa Fluor[®] 660 diluted 1:300 (Cell Signaling). Nucleus was

stained with Hoechst 33342 (Hoechst). Slides were mounted and the immunolabeled slices were observed using a confocal laser microscope Olympus FV1000 with Olympus Fluoview FV1000 program.

Ten single confocal sections of 0.7 μm were taken parallel to the coverslip (xy sections) in the Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscopy equipped with an x60 (numeric aperture 1.35) oil-immersion objective (Olympus, U plan-super-apochromat, UPLSAPO60XO). For each sample, images of three fields were acquired with Olympus FluoView FV1000 software.

Imaging pre-processing (iterative deconvolution) and fluorescence intensity measurement was performed using the public domain Java Image processing software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.4. Measure of estrogen in prostate tissue

2.4.1. Extraction of steroid hormones in prostate tissue

Approximately 50 mg of prostate tissue (15 samples per group) were individually homogenized in a homogenizer for 30 seconds at speed 3 to 4°C with 250 μL of PBS solution. Then, the samples were sonicated for 20 seconds using 0.5 cycle and amplitude 75. 153 μL of homogenate formed was stated on another eppendorf, 670 μL of ether was added, the samples were placed on the vortex mixer for 20 seconds, twice centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm in order to distinguish between the phases. The eppendorf tubes were placed in liquid nitrogen to freeze the bottom fraction containing no ether. The supernatant was pipetted into another eppendorf. After thawing the bottom fraction was added again 670 μL of ether, the samples were placed on the vortex mixer for 20 seconds, twice centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm and placed in liquid nitrogen. The supernatant was pipetted and placed together with the previous fraction. The supernatant tubes were left open at room temperature for evaporation to occur volume up to 67 μL , this extract was added 100 μL of ether and placed on a vortex mixer for 10 seconds. Then the tubes were placed in ultrasonic bath with the temperature of 30°C for 10 minutes. The supernatant tubes were left open at room temperature for evaporation to occur by the volume after 13 μL , then was added 50 PBS solution and samples were placed on a vortex mixer for 10 seconds and then centrifuged for 3 minutes at 4000 rpm. Finally, the tubes were kept open until the rest of the evaporating ether and stored at - 20 ° C for subsequent hormonal action (Zanardi et al., 2011).

2.4.2. Measure of estradiol

The method used for the measure of estradiol in samples of prostatic tissue with BPH and PCa was the enzyme immunoassay (ELISA) using the sensitive Estradiol ELISA kit (DRG Diagnostics, Germany, Ref EIA-4399). The manufacturer's guidelines for the conduct of the technique have been followed. Previously extracted samples were sonicated for 12 minutes in bath ultrasound. Reactive and the plate were left at room temperature before use. 50 μ L were dispensed into each well of samples and the patterns 0, 3, 10, 50 and 200 pg/ml. Was added to 100 μ L of the enzyme conjugate to each well, mixed for 10 seconds and the plate was left at room temperature for 4 hours. Then the contents of the wells were shaken vigorously and held by washing the wells at 400 μ L of washing solution 3 times. The plate was turned against absorbent paper to eliminate residual droplets. 100 μ L of substrate solution were added to each well and incubated for 30 minutes at room temperature. After, the enzymatic reaction was terminated by adding 50 μ L of stop solution to each well. The reaction was read at 450 nm within 10 minutes after addition of stop solution, the equipment Anthos Zenyth. For the calculation results was used 4PL regression curve using MyAssay program and results are expressed in pg/g tissue.

2.5. Quantitative Real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

RNA was extracted by an RNeasy mini kit (RNeasy Mini Kit[®] Qiagen, Germany). The supernatant was used to complete the RNA extraction according to the manufacturer's guidelines. The total RNA concentration was measured by absorbance at 260 nm in a spectrophotometer for nucleic acids (GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Cambridge, England), and the optical density (OD) ratios (260/280 nm) were greater than 1.6. First-strand cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA, using the SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), according to the manufacturer's guidelines. ER α was quantified using RT-qPCR assays in 7500 Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, EUA). Primer sequences were chosen with the assistance of the computer Primer Express[®] Software v3.0 (Applied Biosystems, California, USA). The oligonucleotides and

their sequences were as follows: the housekeeping gene *β2-microglobulin* (BMG): (forward), CTATCCAGCGTACTCCAAAG, BMG (reverse), ACAAGTCTGAATGCTCCACT and ER α (forward), CAGGGGTGAAGTGGGGTCTGC, ER α (reverse), ATGCGGAACCGAGATGAT. PCR reactions were performed using Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), with a DNA Engine Opticon 2 (MJ Research, USA). The final volume was 25 μ L; cDNA was diluted tenfold for ER α and BMG. The PCR cycle conditions were: ER α – denaturation at 94 °C for 40 s, annealing at 60 °C for 40 s, and extension at 55 °C for 40 s; BMG – denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. PCR products were confirmed by specific melting point. A relative quantification standard curve with a pool of tenfold serial dilutions from a known amount of cDNA was used to quantify the amount of mRNA in the samples. The pool was made of 10 BPH cDNA samples and used for all experiments.

2.6. Western blot analysis

Protein was extracted with RIPA buffer and was quantified using Bradford method (Bradford, 1976). Tissue homogenization, electrophoresis, and protein transference were performed as described elsewhere [17]. Equal amount of protein (50 μ g) was loaded to each well. The membranes were processed for immunodetection using mouse monoclonal antibody ER α , rabbit polyclonal antibody PI3-kinase p110, rabbit polyclonal antibody AKT 1/2/3, rabbit polyclonal antibody phospho-AKT 1/2/3 (Ser 473), rabbit anti GSK3 β polyclonal antibody, rabbit anti-phospho-GSK3 β (Ser 9) polyclonal antibody, rabbit anti-FRAP polyclonal antibody, all Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA. The bound primary antibodies were detected using goat-anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 1:5000, (Santa Cruz Biotechnology) and goat-anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology) secondary antibodies and membranes were revealed for chemiluminescence. The autoradiographies generated were quantitatively analyzed for the protein levels with an image densitometer (Image J). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad). Mouse anti- β -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was used to normalize ER α , PI3K and FRAP protein amounts. All results were expressed as arbitrary units (AU).

2.7. Statistical analysis

Results are presented as median and interquartil range, unless otherwise noted. Comparisons between median values were analyzed using the Mann-Whitney test. Comparisons between group means were analyzed by Student's *t* test. Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$. All analyses were performed using the Statistical Packages for the Social Sciences 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

For the immunofluorescence experiments we calculated the degree of colocalization using the Manders colocalization coefficient (mean + sem, * $p < 0.05$, unpaired two-tailed student's *t*-test).

3. Results

3.1. Patient characteristics

The anatomopathologic examination of Prostate Cancer group showed that 22% of the patients had Gleason score equal 6, 67% of the patients had Gleason score equal 7, 11% of the patients had Gleason score equal 9. The samples analyzed 78% had gleason score ≥ 7 . The mean age was similar in both groups. In BPH, mean 61 ± 3.17 years and in PCa mean 64 ± 1.05 years (mean \pm S.E.). Patients with PCa showed PSA levels 4 times higher than the BPH group ($p = 0.007$, Student T test). In BPH, PSA measure in ng/mL was 3.92 ± 0.67 and in CaP was 14.86 ± 5.25 (mean \pm S.E.).

3.2. Immunofluorescence

The location of the ER α receptor and its intensity was evaluated in prostatic tissue BPH and PCa. The analysis of ER α by immunofluorescence showed that ER α is expressed in both groups. The results are shown in Figures 01 and 02. There is no difference in the intensity of ER α in BPH tissue between the stroma and epithelium. In cancer tissue ER α intensity in the stromal tissue is greater than in the epithelial.

Furthermore, measures of ER α relative to the nucleus show that this receptor is positively-located in the nucleus in both BPH and PCa tissue being more co-located in the nucleus of PCa.

3.3. Tissue estrogen concentration measure

Fifteen samples from each group were analyzed to quantify the hormone estradiol in prostate tissue by ELISA after extraction. The results are shown in Figure 3 and show a difference in estradiol concentration in the BPH group when compared to the PCa group. A lower concentration of estradiol in the BPH group was observed compared to PCa.

3.4. Gene and Protein expression of ER α

The ER α gene and protein expression is shown in Figure 4A and 4B. We detected ER α mRNA and protein expression in prostatic cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) tissues. ER α gene and protein expression was increased in the PCa group as compared to the BPH group ($P=0.002$).

3.5. Expression of PI3K protein

PI3K protein expression was evaluated in BPH and PCa tissues. Our results showed PI3K protein expression in both groups. PI3K protein was increased ($P=0.007$) in the PCa group as compared to the BPH group (Figure 4C).

3.6. Expression and activation of AKT protein

The evaluation of AKT protein expression showed its presence in both groups. However, the level of phosphorylated AKT measured by western blots (Figure 4D) was increased ($P=0.004$) in the PCa group as compared to the BPH group.

3.7. Expression and activation of GSK3 β protein

GSK3 β protein expression was evaluated in BPH and PCa tissues. Our results showed GSK3 β protein expression in both groups. The evaluation of activation of GSK3 β protein showed an increase ($P=0.001$) in the PCa group as compared to the BPH group (Figure 5A).

3.8. Protein expression of mTOR

The mTOR protein expression is shown in Figure 5B. We detected mTOR protein expression in prostatic cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) tissues. However, mTOR protein expression was decreased in the PCa group as compared to the BPH group ($P=0.018$).

4. Discussion

Our results show higher concentrations of estradiol, greater expressions of estrogen receptor ER α and PI3K protein in prostate cancer (PCa) tissue compared to benign prostatic hyperplasia (BPH) tissue. Furthermore, AKT and GSK3 β are most active in this tissue as mTOR is more expressed in BPH. 78% of prostate samples were classified with Gleason score > 7, featuring aggressive and undifferentiated tumors.

Our study showed a higher concentration of estradiol in the PCa tissue compared to BPH tissue. There is consistent evidence that male serum testosterone level declines significantly with age, leading to an inverse association between circulating testosterone and the risk of developing PCa. Furthermore, plasma androgens/estrogen rate appears to decrease with age, suggesting that estrogens may play a role in PCa (Carruba, 2007). Not to our knowledge the measure of the concentration of estrogen (estradiol) in human prostatic tissue of BPH and PCa in the scientific literature to date. Estrogens in the prostate are from the action of the enzyme aromatase on testosterone (Carreau et al., 2003). Previous studies from our laboratory analyzed the gene and protein expression of aromatase in human BPH tissue and CaP, our findings showed no significant difference between groups (unpublished data). The activity of the aromatase enzyme in these groups was not assessed. However Risbridger and colleagues evaluated the activity of the enzyme aromatase in line cells of benign prostatic hyperplasia (PrEC) and prostate cancer lines (LNCaP, DU145 and PC3) and showed higher activity of this enzyme in cells of prostate cancer (Risbridger et al., 2003). Moreover, the high aromatase activity has been associated with the induction of adiposity, metabolic syndrome and prostatic diseases abnormal signaling via ER α and GPR30 (Williams, 2012). We suggest that the higher estrogen concentration in PCa tissue is due increased activity of the enzyme aromatase which lowers testosterone levels and increase intracellular levels of estradiol prostate which in turn can binds to estrogen receptors ER α , ER β and GPR30 stimulating signaling pathways that can directly induce hyperplasia and cell proliferation metaplastic changes in the prostate.

The analysis of ER α by immunofluorescence showed that ER α is expressed in both groups. Expression of ER α in the stromal tissue and epithelial tissue is stronger in PCa compared to BPH group. Few studies have evaluated the location of the prostate ER, however it is not of our knowledge the analysis comparing of the location of ER in the stroma and epithelium of BPH and CaP. Daniels and collaborators analyzed ER expression in stroma of tumor and adjacent tissue, they showed that expression levels of ER α was significantly lower in tumor-associated stroma than stroma surrounding benign prostatic glands on the same tissue section, however the expression of ER α was higher in PCa stroma with advanced tumor stage (Daniels et al., 2014). Other study observed similar levels of ER α receptor in both

normal and BPH-derived stromal cell (Park et al., 2009). While Nicholson and collaborators showed ER α expression was increased in BPH epithelium and stromal ER α expression was decreased in BPH compared to normal prostate (Nicholson et al., 2013). We suggest that the increased ER α presence in both epithelium and in the stroma prostatic could be decisive in cell differentiation to cancer and not to hyperplasia.

Furthermore, the gene and protein expression of the estrogen receptor ER α in our study is increased in CaP group as compared to BPH group. The ER α receptor has been associated with adverse actions of estrogen in the prostate such as abnormal proliferation, inflammation and malignancy. The induction of inflammation by ER α can also promote the development of malignancy as well as stimulate aromatase expression that is altered in malignancy and can be induced by inflammatory cytokines (Ellem & Risbridger, 2009). Some studies have shown increased ER α gene expression in PCa when compared to BPH or normal prostate tissue however these studies did not assess protein expression of ER α (Ito et al, 2001; Yang and Guan, 2007). Pasquali and colleagues evaluated the gene and protein expression of ER α in cell culture samples of PCa had a lower expression of ER α when compared to normal prostate (Pasquali et al., 2001). Despite several evidences correlating this receptor to cellular proliferation and cancer in many tissues, its role in PCa and BPH is not well established. According the literature cited above, the results are contradictory.

The estrogen receptor ER α can be activated by PI3K and AKT proteins in the absence of estrogens. The PI3K increases the activity of estrogen-dependent domain (AF-1) and estrogen independent domain (AF-2) receptor whereas AKT activity increases only AF-1. Furthermore, the PI3K pathway can activate ER of way dependent and/or independent of AKT protein (Campbell et al. 2001). Our study showed higher protein expression of PI3K and increased activity of AKT in PCa tissue compared to BPH tissue. Considering these results we can see that are three different ways of activating the estrogen receptor ER α in PCa: the higher concentration of estrogen, the higher protein expression of PI3K and the increased activity of AKT, suggesting that the presence of this receptor has a role important in the pathophysiology of this disease.

The accelerated growth of prostate tumor and disease progression has been attributed to increased activity of AKT (Graff et al., 2000). Furthermore, the increased activation of AKT has been associated with the presence of advanced forms of PCa with high Gleason grade being accompanied by the decrease in ERK activity (Kreisberg et al, 2004; Ayala et al, 2004.). AKT can directly phosphorylate and inactivate Raf-1 inactivating ERK in PCa cells (Lee et al., 2008). Due to inactivation of the ERK cell loses its ability to differentiate while

the high activity of AKT confers a more cell survival on prostate cell which could be one factor in the development of PCa. Furthermore, activation of AKT inhibits GSK3 β protein.

The GSK3 β is involved in a variety of cellular processes such as glycogen metabolism, insulin signaling, cell proliferation, neuronal function and oncogenesis (Rayasam et al., 2009). The GSK3 β kinase is an enzyme which is constitutively active and is inactivated by phosphorylation in response to cellular signals (Doble & Woodgett, 2003). The GSK3 β is subject to multiple mechanisms of regulation and phosphorylation of Ser 9 is probably the most important. Several kinases are capable of mediating this modification, including AKT, ERK and p38 α (Luo, 2009). One of the most well-known substrates of GSK3 β is β -catenin and GSK3 β is an important regulator of the Wnt signaling pathway/ β -catenin (Lustig & Behrens, 2003). Our study showed that GSK3 β is more phosphorylated in BPH and therefore more active in PCa. In this paper we analyze three proteins that regulate GSK3 β kinases (AKT, ERK and P38 α) and observe that two of them (P38 α and ERK) are more active in BPH which would explain the higher phosphorylation of GSK3 β in this tissue. The role of GSK3 β in tumorigenesis and cancer progression is controversial. Since GSK3 β negatively regulates many proto-oncogene proteins and cell cycle regulators it has been regarded as tumor suppressor. Skin cancer and breast cancer have been associated with the inactivation of GSK3 β that is accompanied by excessive increase in cyclin D1 and β -catenin suggesting its relationship with the deregulation of the Wnt/ β -catenin (Ma et al., 2007, Farago et al, 2005). In contrast to its role as a tumor suppressor, some studies suggest that GSK3 β may actually promote tumorigenesis and cancer development. High levels of GSK3 β were observed in ovarian, colon and pancreas carcinomas (Ougolkov & Billadeau, 2006).

Another protein that is associated with the activity of AKT is mTOR. mTOR is a member of two distinct complexes called mTORC1 and mTORC2. Complexes are distinguished by binding to accessory mTOR proteins, Raptor protein found in mTORC1 and Rictor protein found in mTORC2. The mTORC1 is regulated through the action of AKT inhibitor proteins on the mTORC1 complex (TSC and PRAS40) and their substrates are kinases S6K1 and S6K2 S6 and 4E-BP1 and 4E-BP2 proteins that regulate various aspects of the translocation of the mRNA. The regulation of mTORC2 is mediated signaling through growth factors and their effectors include AKT, PKC and SGK. For full activation of AKT phosphorylation of Ser473 by mTORC2 and phosphorylation of Thr308 by PDK1 is required. The mTORC2 is also related to indirect inactivation of GSK3 β via activation of AKT (GSK3 β phosphorylates inactivating it). There is a feedback mechanism to maintain the balance between the activity of mTORC1 and mTORC2 and indirectly regulate the activity of AKT.

The Akt/mTOR pathway is known to facilitate the survival and protection against apoptosis. The role of AKT signaling in regulating apoptosis and the role of mTOR in autophagy are crucial for the survival and cell death (Altomare & Khaled, 2012). Our study showed an increased protein expression of mTOR in the BPH tissue when compared to PCa tissue. Ko and colleagues analyzed by immunohistochemistry mTOR normal prostate tissue, prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia high grade (PIN) and found increased expression of the total mTOR (mTOR_t) and phosphorylated mTOR (p-mTOR) in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia tissue, but no difference in the ratio p-mTOR/mTOR_t between groups (Ko et al., 2014). High levels of mTOR activity results in dysregulation of cell size, organ size and cell growth control. Deregulation of the machinery of protein synthesis through mTOR may generate signals that cell cycle progression contributes to cancer (Majumder & Sellers, 2005).

Our laboratory analyzed the expression of estrogen receptor GPER, responsible for the rapid estrogenic action, and proteins of MAPK pathway (p38 α , ERK e JNK) in PCa and BPH tissue and we find increased expression of ERK and p38 α in BPH and increased expression of JNK in CaP (unpublished data).

In Figures 6, we suggest possible mechanisms of action of estrogen through its receptor, GPR30 and ER α pathways in MAPK and PI3K signaling in prostate cancer.

Our results indicate that estrogens and their receptors play an important role in the development of prostate cancer suggesting study of new drug therapies acting on these receptor for the treatment of prostate cancer.

5. Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

6. Funding

This work was supported by CNPq, CAPES and FAPERGS, Brazilian Research Agencies.

7. Acknowledgments

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio

Grande do Sul) and Graduate Research Group (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

8. References

- ALTOMARE D. A & KHALED A. R. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. **Curr Med Chem.** 2012; 19: 3748-3762.
- AYALA G; THOMPSON T; YANG G; FROLOV A *et al.* High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. **Clin Can Res.** 2004; 10: 6572-6578.
- BOYLE P, SEVERI G, GILES G. G. The epidemiology of prostate cancer. **Urol Clin North Am.** 2003 May; 30 (2): 209-217.
- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976 May; 7 (72): 248-254.
- CAMPBELL R. A; BHAT-NAKSHATRI P; PATEL N. M; CONSTANTINIDOU D *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor α . **J Biol Chem.** 2001; 276 (13): 9817-9824.
- CARREAU S; LOMBARD S; DELALANDE C; DENIS-GALERAUD I. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Reprod Biol Endocrinol.** 2003; 1:35 1-6.
- CARRUBA G. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. **Ann N Y Acad Sci.** 2006. 1089: 201-217.
- CARRUBA G. Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. **J Cel Bioch.** 2007; 102: 899-911.
- DANIELS G, GELLERT L. L, MELAMED J, HATCHER D, LI Y, WEI J, WANG J, LEE P. Decreased expression of stromal estrogen receptor α and β in prostate cancer. **Am J Transl Res.** 2014; 6 (2):140-146.
- DJAVAN B, REMZI M, ERNE B, MARBERGER M. The pathophysiology of benign prostatic hyperplasia. **Drugs today (Barc).** 2002 Dec; 38 (12): 867-876.

DOBLE B.W & WOODGETT JR. GSK-3: tricks of the trade for a multitasking kinase. **J Cell Sci.** 2003; 116: 1175–1186.

ELLEN S. J; RISBRIDGER G. P. The dual opposing roles of estrogen in the prostate. **An N Y Acad Sci.** 2009. 1155:174-186.

FARAGO M; DOMINGUEZ I; LANDESMAN-BOLLAG E; XU X; ROSNER A *et al.* Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3 β promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. **Cancer Res.** 2005; 65: 5792–5801.

GRAFF J. R; KONICEK B. W; McNULTY A. M; WANG Z *et al.* Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27^{Kip1} expression. **J Biol Chem.** 2000; 275(32): 24500-24505.

GRÖNBERG H. Prostate cancer epidemiology. **Lancet.** Mar 2003; 361 (9360):859-864.

ITO T, TACHIBANA M, YAMAMOTO S, NAKASHIMA J, MURAI M. Expression of estrogen receptor (ER-alpha and ER-beta) mRNA in human prostate cancer. **Eur Urol.** 2001 Nov; 40 (5): 557-563.

KING K. J; NICHOLSON H. D; ASSINDER S. J. Effect of increasing ratio of estrogen:androgen on proliferation of normal human prostate stromal and epithelial cells, and the malignant cell line LNCaP. **Prostate** 2006 Jan; 66 (1):105-114.

KO Y. H; MIYAKE H; BEHNSAWY H. M; CHEON J *et al.* Limited significance of activated Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway in prostate cancer progression. **Urol Int.** 2014 Feb 20 (Epub ahead of print).

KOEHLER K. F; HELGUERO L. A; HALDOSÉN L-A *et al.* Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β . **Endoc Rev** 2005; 26(3):465–478.

KREISBERG J. I; MALIK S. N; PRIHODA T. J; BEDOLLA R. G *et al.* Phosphorylation of Akt (Ser⁴⁷³) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. **Cancer Research.** 2004; 64: 5232-5236.

LEE J. T; STEELMAN L. S; CHAPPELL W. H; McCUBREY J. A. Akt inactivates ERK causing decreased response to chemotherapeutic drugs in advanced CaP cells. **Cell Cycle.** 2008; 7 (5): 631-636.

LEUNG Y. K; MAK P; HASSAN S *et al.* Estrogen receptor (ER)- β isoforms: a key to understanding ER- β signaling. **Proc Natl Acad Sci** 2006 Aug; 103 (35):13162–13167.

LUO J. Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. **Cancer Letters.** 2009; 273: 194-200.

LUSTIG B, BEHRENS J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. **J Cancer Res Clin Oncol.** 2003;129 (4): 199-221.

MA C; WANG J; GAO Y; GAO T. W *et al.* The role of glycogen synthase kinase 3beta in the transformation of epidermal cells. **Cancer Res.** 2007; 67: 7756-7764.

MAJUMDER P. K & SELLERS W R. Akt-regulated pathways in prostate cancer. **Oncogene.** 2005; 24: 7465-7474.

NELSON W. G; DE MARZO A. M; ISAACS W. B. Prostate cancer. **New Engl J Med.** 2003; 349:366-381.

NILSSON S; GUSTAFSSON J-A. Estrogen receptor transcription and transactivation. Basic aspects of estrogen action. **Breast Cancer Res** 2000; 2: 360-366.

OUGOLKOV A.V; BILLADEAU D.D. Targeting GSK-3: a promising approach for cancer therapy? **Future Oncol.** 2006; 2: 91–100.

PARK I. I; ZHANG Q; LIU V; KOZLOWSKI J. M *et al.* 17β-estradiol at low concentrations acts through distinct pathways in normal versus benign prostatic hyperplasia-derived prostate stromal cells. **Endocrinology.** 2009; 150 (10): 4594-4605.

PASQUALI D; ROSSI V; ESPOSITO D; ABBONDANZA C *et al.* Loss of estrogen receptor β expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. **J Clin Endocrinol Metab.** 2001; 86 (5): 2051-2055.

PROSSNITZ E. R; ARTERBURN J. B; SMITH H. O *et al.*, Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. **Annu. Rev. Physiol.** 2008. 70: 165-190.

RAYASAM G. V; TULASI V. K; SODHI R; DAVIS J. A *et al.* Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. **Brit J Pharmacol.** 2009; 156: 885-898.

RISBRIDGER G. P; BIANCO J. J; ELLEM S. J; McPHERSON S. J. Oestrogens and prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer.** 2003; 10: 187-191.

WILLIAMS G. Aromatase up-regulation, insulin and raised intracellular oestrogens in men, induce adiposity, metabolic syndrome and prostate disease, via aberrant ER-α and GPER signaling. **Mol Cell Endocrinol.** 2012; 351: 269-278.

YANG Q & GUAN K-L. Expanding mTOR signaling. **Cell Research.** 2007; 17: 666-681.

ZANARDI M. F; KOBERSTEIN T. C. R. D; URBINATI E. C; FAGUNDES M *et al.* Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-nilo e maturação precoce após reversão sexual. **R. Bras. Zootec.** 2011; 40 (1): 7-11.

Captions to figures:

Figure 1. Tissue estrogen concentration measure in BPH and PCa. Estrogen concentration in PCa tissue was higher as compared to BPH.

Figure 2. Immunofluorescent staining analysis of ER α in epithelial tissue of BPH and PCa. Column 1 represents benign prostatic hyperplasia tissue and column 2 represents prostate cancer tissue. A) blue staining for nucleus, B) red staining for vimentina, C) green staining for ER α , D) merge, and E) PDM image. Results of the staining revealed that expression of ER α in the stromal tissue seems to have the same intensity between BPH and PCa. Size image 211.509 μ M X 211.509 μ M and 70.518 μ m x 70.518 μ m.

Figure 3. Immunofluorescent staining analysis of ER α in stromal tissue of BPH and PCa. Column 1 represents benign prostatic hyperplasia tissue and column 2 represents prostate cancer tissue. A) blue staining for nucleus, B) red staining for cytokeratin, C) green staining for ER α , D) merge, and E) PDM image. Staining for ER α in prostate cancer was higher in PCa as compared to BPH and ER α expression seems to have increased intensity around the nucleus in PCa. Size image 211.554 μ M X 211.554 μ M and 70.518 μ m x 70.518 μ m.

Figure 4. Protein expression by Western blot analysis. A) ER α , (B) PI3K and (C) AKT phosphorylated/total in representative samples of benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa). Values are expressed as median and interquartil range. A) * $P = 0.002$ PCa vs. BPH, B) * $P = 0.007$ and C) * $P = 0.004$ (Mann-Whitney test).

Figure 5. Protein expression by Western blot analysis. (A) GSK3 β phosphorylated/total and (B) FRAP in representative samples of benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa). Values are expressed as median and interquartil range to A) * $P = 0.001$ PCa vs. BPH (Student's T test) and are expressed as media and standard error to B) * $P = 0.001$ (Mann-Whitney test).

Figure 6. Proposed mechanism of action of estrogen hormones in prostate cancer. In PCa have a higher concentration of estrogen in prostate tissue. This estrogen binds to its ER α and GPR30 receptors present in greater amounts in PCa tissue. Both activated receptors can act on the PI3K pathway by activating AKT. While the PI3K protein itself can directly activate the ER α receptor, regardless of the presence of estrogen. Activation of ER α receptor in prostate

tissue is related to cellular inflammation and carcinogenesis proliferation. AKT, ERK and p38 α proteins negatively regulate GSK3 β . In prostate cancer have increased activation of AKT and smaller activation p38 α and ERK proteins, resulting in the persistence of GSK3 β in its less phosphorylated form, ie, in its active form. The GSK3 β positively acts directly on the complex mTORC1 inhibitors (TSC1/TSC2), stimulating the inhibition of mTORC1. Inhibitors of mTORC1 complex are also negatively regulated by ERK and the AKT. In PCa have the activation of AKT, activation of GSK3 β and reduced activation of ERK, resulting in inhibition of the mTORC1 complex. At the same time the GSK3 β stimulate c-jun protein, which is a major component of the AP-1 transcription factor related to the development of carcinogenesis. The c-Jun protein can also be stimulated by JNK. JNK is negatively regulated by p38 α . As previously described, the p38 α is less active in prostate cancer, resulting in increased activation of JNK. The stimulation of c-Jun by JNK well as by GSK3 β results in higher expression in PCa tissue compared to BPH tissue. In addition to the activation of c-Jun, JNK promotes expression of matrix metalloproteinases (MMPs). As the JNK the GPR30 is also involved in the activation of MMPs act synergistically with JNK, which may facilitate tumor growth and metastasis. In addition, GPR30 acts antagonistically in prostate cancer as it can stimulate, simultaneously, the ERK pathway, which may be a mechanism of stimulation of cell differentiation.

Figure 1.

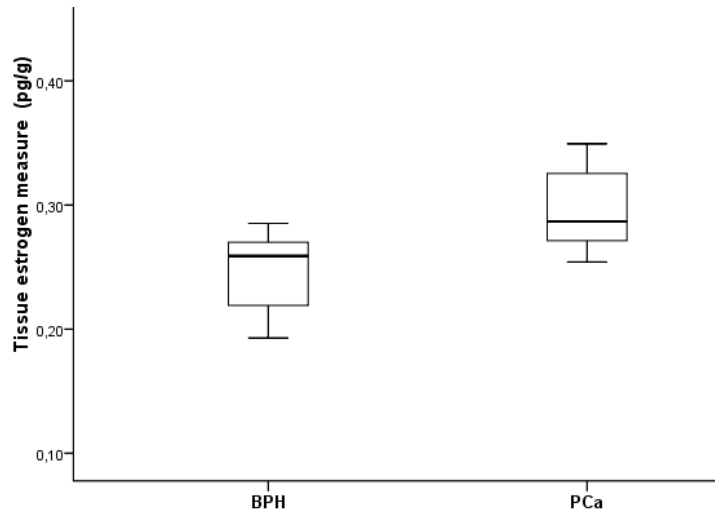


Figure 2:

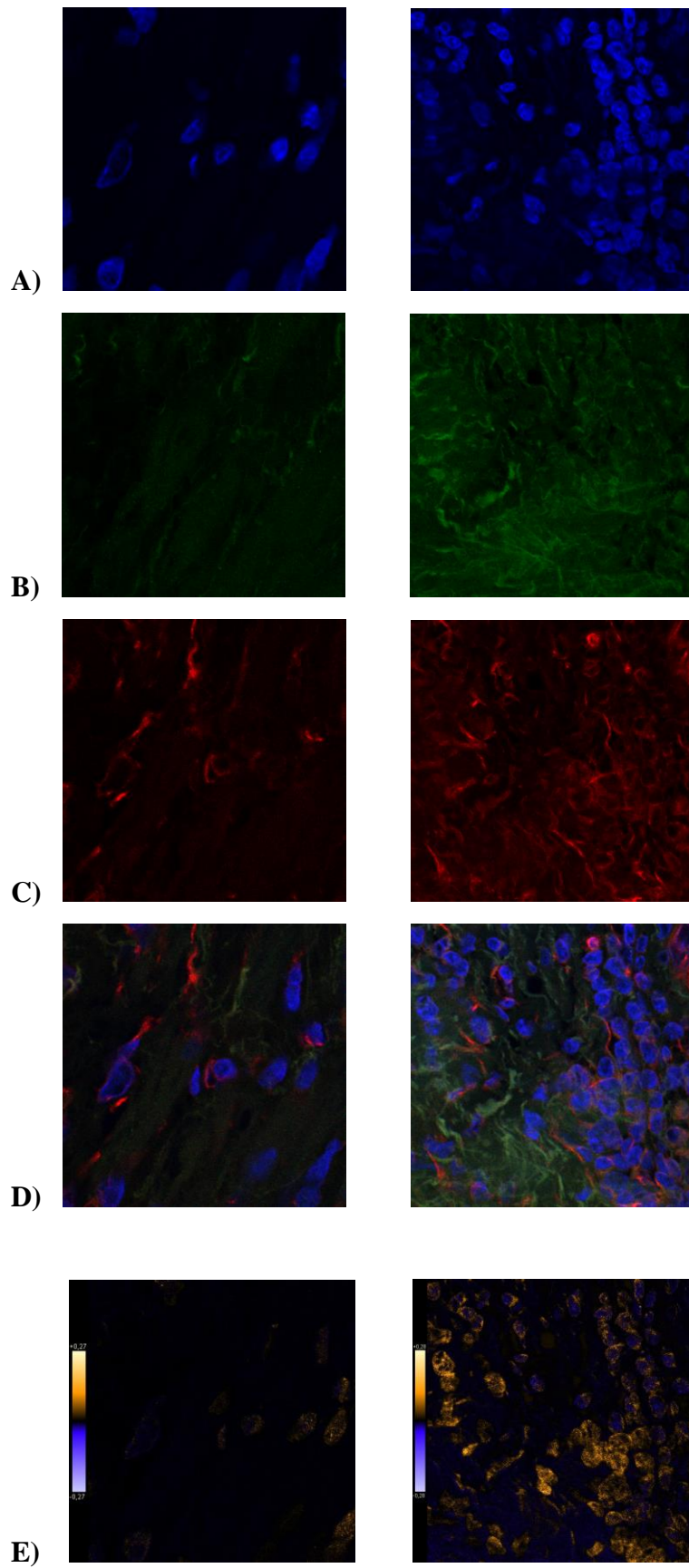


Figure 3.

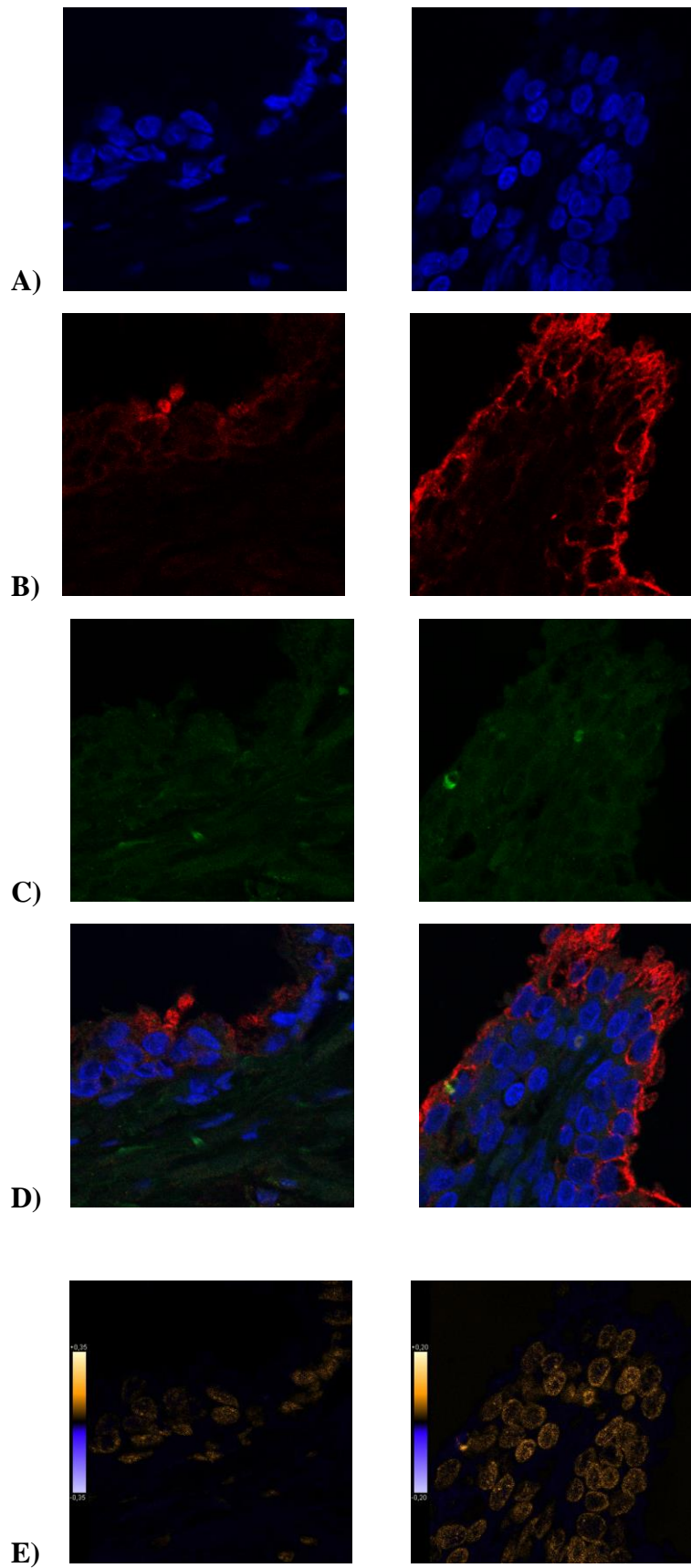


Figure 4.

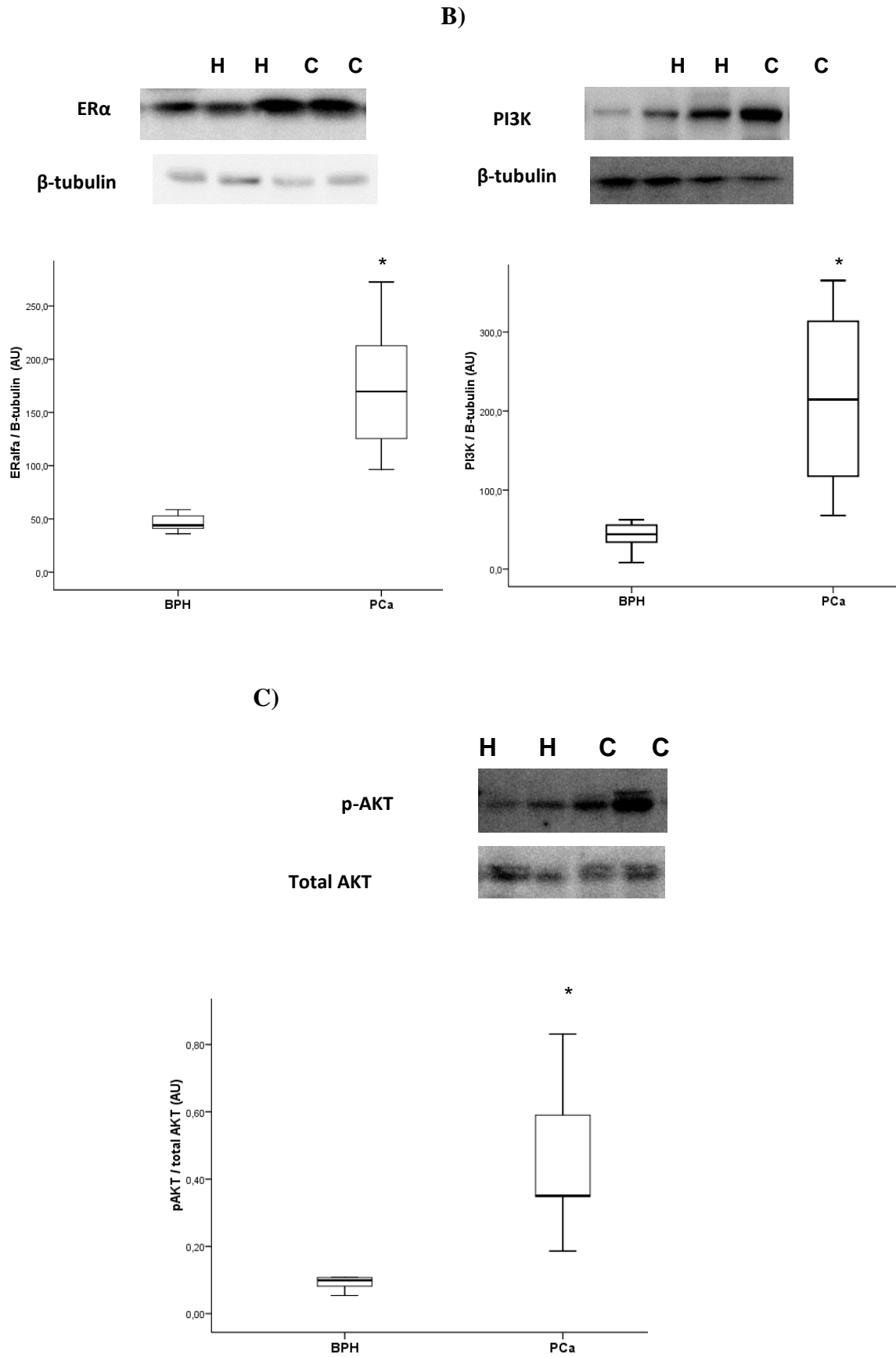


Figure 5.

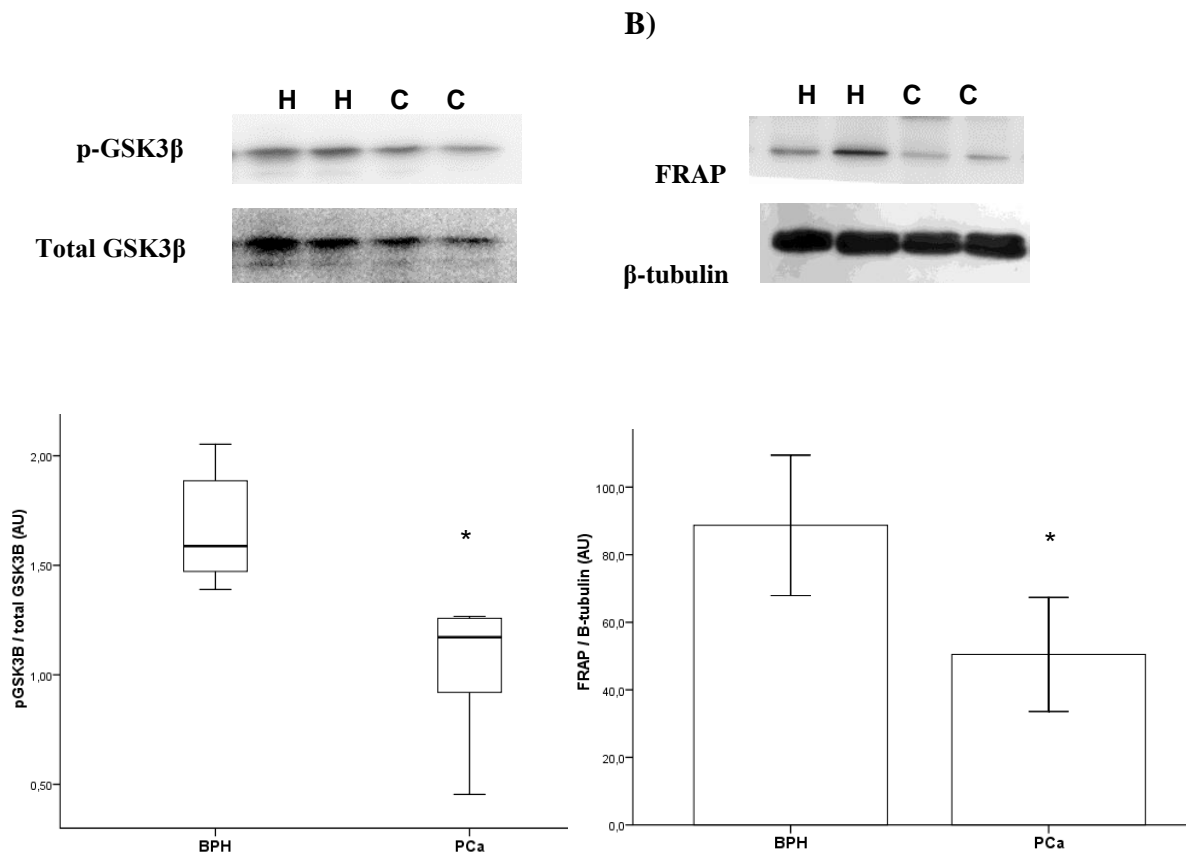


Figure 6.

