

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

Dissertação de Mestrado

**Sinalização androgênica em tumores de próstata**

**Caetana Machado Ledur**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre, fevereiro de 2017

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

Dissertação de Mestrado

**Sinalização androgênica em tumores de próstata**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
PPG Ciências Biológicas: Fisiologia como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Caetana Machado Ledur**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre, fevereiro de 2017

*“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis. É preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”*

Albert Einstein

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha Orientadora, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Ilma Simoni Brum, pelos ensinamentos, pelo apoio, incentivo confiança e tranquilidade transmitida.

Aos meus queridos colegas de laboratório, companheiros de profissão e grandes amigos em todos os momentos.

Aos meus amigos, que sempre foram grandes companheiros, proporcionando momentos de alegria como também um ombro amigo para que eu concluísse mais esta etapa com calma e perseverança.

Aos meus familiares, principalmente pelo incentivo, conselhos e atenção, que nunca faltou, por todo o suporte, pelo carinho e amor incondicional.

E por último, ao meu namorado Frederico, pelo companheirismo, amor e cumplicidade.

## Sumário

Sumário.....	5
Lista de figuras.....	7
Lista de tabelas.....	8
Lista de abreviaturas.....	9
Resumo:.....	14
Introdução:.....	16
Próstata.....	16
Câncer de próstata (CaP) .....	17
Hiperplasia prostática benigna (HPB) .....	20
Sinalização androgênica .....	21
<i>TaqManplatearray</i> .....	24
Justificativa: .....	38
Hipóteses:.....	39
Objetivos: .....	40
Objetivo geral: .....	40
Objetivos específicos: .....	40
Materiais e métodos:.....	41
Delineamento do estudo: .....	41
Critérios de Inclusão: .....	41
Aspectos éticos:.....	41
Obtenção das amostras: .....	42
Microdissecção: .....	42
Extração de RNA total e purificação: .....	43
Quantificação do RNA .....	44
Síntese de cDNA: .....	44
Análise da expressão gênica:.....	44
Análise da expressão proteica .....	45
Tamanho amostral: .....	46
Análise estatística: .....	46
Local de realização do projeto: .....	47
Fontes de financiamento .....	47

Descarte de resíduos:.....	47
Resultados.....	48
Discussão.....	72
Conclusão.....	101
Referências: .....	102
Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com HPB .	108
Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com CaP..	110

## Lista de figuras

Figura 1. Localização das zonas da próstata .....	16
Figura 2. Evolução do câncer de próstata.....	19
Figura 3. Mecanismo de ação dos androgênios.....	22
Figura 4. Vias para ativação do AR.....	23
Figura 5. Layout da placa Taqman Array. ....	25
Figura 6. Número de genes de acordo com as funções.....	28
Figura 7. Lâminas de HE.....	50
Figura 8. Resultado da expressão gênica .....	55
Figura 9. Rede de proteínas.....	58
Figura 10 Enzimas do metabolismo de androgênios.....	59
Figura 11. Modulação da transcrição gênica.....	60
Figura 12. Regulação negativa da proliferação.....	61
Figura 13. Regulação positiva da proliferação. ....	61
Figura 14. Diferenciação, tumorigenicidade e invasão.....	62
Figura 15.Coativadores do AR. ....	63
Figura 16. Inibidores do AR e de genes regulados pelo AR.....	63
Figura 17. Genes regulados por androgênios. ....	64
Figura 18. Funções na reprodução masculina. ....	65
Figura 19. Resposta imune.. ....	66
Figura 20. Receptores.....	66
Figura 21. Rede das proteínas .....	68
Figura 22. Imunohistoquímica de AR .....	69
Figura 23. Imunohistoquímica de BRCA1. ....	70
Figura 24. Imunohistoquímica de NKX3-1.....	71

## Lista de tabelas

Tabela 1. Descrição dos genes estudados no ensaio.....	29
Tabela 2. Características das amostras do estudo .....	49
Tabela 3. Valor de estabilidade de genes candidatos a normalizadores apresentado pelo programa NormFinder. ....	51
Tabela 4. Genes com expressão somente no grupo CaP .....	52
Tabela 5. Expressão gênica no tecido tumoral em relação ao tecido hiperplásico .....	53
Tabela 6 Genes que não foi possível realizar análise estatística .....	56
Tabela 7 Genes que não apresentaram expressão em ambos os grupos .....	56
Tabela 8. Relação da porcentagem de células coradas no grupo HPB e CaP com a intensidade da coloração.....	67

## Lista de abreviaturas

18S - *18S ribosomal RNA*

AIG1 - *androgeninduced 1*

AKR1C4 - *Aldo-keto reductase family 1 member C4*

AKT - *Protein kinase B*

AOF2 - *Amine oxidoreductase*

APPL1 - *Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1*

AR – Receptor de androgênios

AREs - elemento responsivo aos androgênios

BCL2 - *BCL2, apoptosis regulator*

BMX - *BMX non-receptor tyrosine kinase*

BRCA1 - *BRCA1, DNA repair associated*

BRCA2 - *BRCA2, DNA repair associated*

CALCOCO1 - *Calcium binding and coiled-coil domain 1*

CALR - Calreticulina

CaP – Câncer de Próstata

CDC25B - *Cell division cycle 25B*

CLDN3 - *Claudin 3*

CPPC – Câncer de pulmão de não pequenas células

CREBBP - *CREB binding protein*

CRISP1 - *Cysteine rich secretory protein1*

CRPC - Câncer de próstata refratário ao tratamento hormonal ou castração

CTD - Domínio C-terminal

CYP11A1 - *Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1*

CYP11B1 - *Cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1*

CYP19A1 - *Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1*

CYP21A2 - *Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 2*

DAXX - *Death domain associated protein*

DHRS9 - *Dehydrogenase/reductase 9*

DHT – dihidrotestosterona

DS - Disfunções sexuais

ER – Receptor de estrogênio

ErbB3 - *Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3*

ERG - *ETS transcription factor*

ERK - *Extracellular signal-regulated kinases*

ESR1 - *Estrogen receptor 1*

ESR2 - *Estrogen receptor 2*

FGF8 - *Fibroblast growth factor 8*

FKBP4 - *FK506 binding protein 4*

FN - Fator nuclear

FOXO3 - *Forkhead box O3*

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GPX5 - *Glutathioneperoxidase 5*

GR – Receptor de glicocorticoide

GRP - *Gastrin releasing peptide*

GSK3B - *Glicogênio sintase -quinase 3 $\beta$*

GUSB - *Glucuronidase beta*

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HPB - Hiperplasia prostática benigna

HPRT1 - *Hypoxanthinephosphoribosyltransferase 1*

HSD11B1 - *Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1*

HSD17B3 - *Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3*

HSD17B6 - *Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 6*

HSD17B8 - *Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 8*

HSD3B1 - *Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1*

IFNG - Interferon gamma

IGFBP5 - *Insulin like growth factor binding protein 5*

IL4 - *Interleukin 4*

IL6 - *Interleukin 6*

IL8 - *C-X-C motif chemokine ligand 8*

KAT2B - *Lysine acetyltransferase 2B*

KLK4 - *Kallikrein related peptidase 4*

LUTS - *Sintomas do trato urinário inferior*

MAP - *Mitogen Activated Protein Kinases*

MCF-7 - *Human breast adenocarcinoma cell line*

MDA-MB-231 - *Human Caucasian breast adenocarcinoma*

MED1 - *Mediator complex subunit 1*

MED12 - *Mediator complex subunit 12*

MED13 - *Mediator complex subunit 13*

MED14 - *Mediator complex subunit 14*

MED16 - *Mediator complex subunit 16*

MED17 - *Mediator complex subunit 17*

MED24 - *Mediator complex subunit 24*

MED4 - *Mediator complex subunit 4*

MIS - *Substância inibidora de Muller*

MYST2 - *MYST histoneacetyltransferase 2*

NCOA1 - *Nuclear receptor coactivator 1*

NCOA2 - *Nuclear receptor coactivator 2*

NCOA4 - *Nuclear receptor coactivator 4*

NFAT - *fator nuclear das células T ativadas*

NKX3-1 - *Nk homeobox 3*

NR2C1 - *Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1*

NSD1 - *Nuclear receptor binding SET domain protein 1*

NTD - *Domínio N-terminal*

PA2G4 - *Proliferation-associated 2G4*

PAK6 - *p21 (RAC1) activated kinase 6*

PARK7 - *Parkinsonism associated deglycase*

PART1 - *Prostate androgen-regulated transcript 1*

PATZ1 - *POZ/BTB and AT hook containing zinc finger 1*

PBS – Tampãofosfatosalino

PDS5B - *PDS5 cohesin associated factor B*

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase*

PIAS1 - *Protein inhibitor of activated STAT 1*

PIAS2 - *Protein inhibitor of activated STAT 2*

PIAS3 - *Protein inhibitor of activated STAT 3*

PIM1 - *Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase*

PMEPA1 - *Prostate transmembrane protein, androgen induced 1*

PIN – Neoplasia intra-epitelial

POR - *Cytochrome p450 oxidoreductase*

PSA – *Antígeno prostático específico*

RCHY1 - *Ring finger and CHY zinc finger domain containing 1*

RDH11 - *Retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)*

RT-qPCR - *Reação quantitativa em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa em tempo real*

SART3 - *Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3*

SCARB1 - *Scavenger receptor class B, member 1*

SENP1 - *SUMO1/sentrin specific peptidase 1*

SHBG - *Sex hormone binding globulin*

SHH - *Sonic hedgehog*

SOAT1 - *Sterol O-acyltransferase 1*

SPAG11B,SPAG11A - *Sperm associated antigen 11B*

SPDEF - *SAM pointed domain containing ETS transcription factor*

SRD5A1 - *Steroid 5 alpha-reductase 1*

SRD5A2 - *Steroid 5 alpha-reductase 2*

SRY - *Sex determining region of Chr Y*

STAT - *Ativadores de transcrição*

STS - *Steroidsulfatase (microsomal), isozyme S*

SUMO1 - *Small ubiquitin-like modifier 1*

TFS - *Fatores de transcrição*

TGFB111 - *Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1*

TGIF1 - *TGFB induced factor homeobox 1*

TGM4 - *Transglutaminase 4*

TMPRSS2 - *Transmembrane protease, serine 2*

UGT1A8 - *UDP glucuronosyltransferase family 1 member A8*

UGT2A1 - *UDP glucuronosyltransferase family 2 member A1 complex locus*

UGT2B15 - *UDP glucuronosyltransferase family 2 member B15*

UGT2B17 - *UDP glucuronosyltransferase family 2 member B17*

UGT2B7 - *UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7*

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

WDR19 - *WD repeat domain 19*

ZMIZ1 - *Zinc finger MIZ-type containing 1*

## Resumo:

O desenvolvimento de doenças que acometem a próstata está associado ao eixo de sinalização androgênica, o qual é altamente dependente do receptor de androgênios (AR) e dos níveis de androgênios circulantes. O AR atua como fator de transcrição, mediando a ativação ou repressão da transcrição de inúmeros genes. Deste modo, o AR apresenta um importante papel na regulação da proliferação e diferenciação de células prostáticas. Nesse estudo, buscamos identificar a expressão gênica de diversos genes associados à via de sinalização androgênica em amostras microdissecadas de tecido epitelial de hiperplasia prostática benigna (HPB) (n=3) e câncer de próstata (CaP) (n=3) através do ensaio TaqManArrayHumanAndrogens pela técnica de RT-qPCR, além da expressão proteica de alguns genes diferentemente expressos. A expressão gênica mostrou que 17 genes (AIG1, APPL1, BRCA1, BRCA2, CDC25B, ESR2, HSD17B3, HSD17B8, IL8, MED17, MED24, PAK6, PIM1, POR, SHH, SOAT1 e WDR19) apresentaram expressão somente no grupo CaP, 7 genes (MED13, SPDEF, RDH11, CALR, NKX3-1, KLK4 e PMEPA1) apresentaram expressão aumentada no grupo CaP em relação ao grupo HPB, 40 genes (HSD11B1, TGFB1I1, BCL2, UGT2B17, SRY, UGT2B15, MED1, RCHY1, PA2G4, KAT2B, FOXO3, MED14, SUMO1, PIAS2, CALCOCO1, HSD17B6, DAXX, MED4, PARK7, PATZ1, NR2C1, TMPRSS2, PIAS1, AR, MED12, SCARB1, PART1, PIAS3, NSD1, MED16, AOF2, ZMIZ1, NCOA1, MYST2, IGFBP5, SART3, CREBBP, TGIF1, CLDN3 e FKBP4) apresentaram expressão diminuída no grupo CaP em relação ao grupo HPB, 21 genes (AKR1C4, BMX, CRISP1, CYP11A1, CYP11B1, CYP19A1, CYP21A1, DHRS9, FGF8, GPX5, GRP, HSD3B1, IL4, INFG, SHBG, STS, SPAG11B, TGM4, UGT1A8, UGT2A1 e UGT2B7) não apresentaram expressão em nenhum dos grupos e 7 genes (ESR1, IL6, NCOA2, NCOA4, PDS5B, SRD5A1 e SRD5A2) apresentaram expressão em ambos os grupos, mas não foi possível analisá-los. Na expressão proteica do AR encontramos que este está mais expresso no núcleo de células hiperplásicas e no citoplasma em células tumorais. O

BRCA1 predomina no citoplasma de células tumorais, enquanto uma pequena fração de células hiperplásicas apresenta positividade no núcleo e o NKX3-1 apresenta maior expressão citoplasmática no CaP e semelhante expressão no núcleo de ambos os grupos. Assim, este trabalho mostra a grande heterogeneidade tumoral através da variação na expressão gênica e proteica tanto de genes que favorecem como que os que impedem a permanência tumoral no tecido tumoral específico, e, acredita-se que por se tratar de um CaP primário, ainda estejam ativadas vias regulatórias que tendem a contensão tumoral.

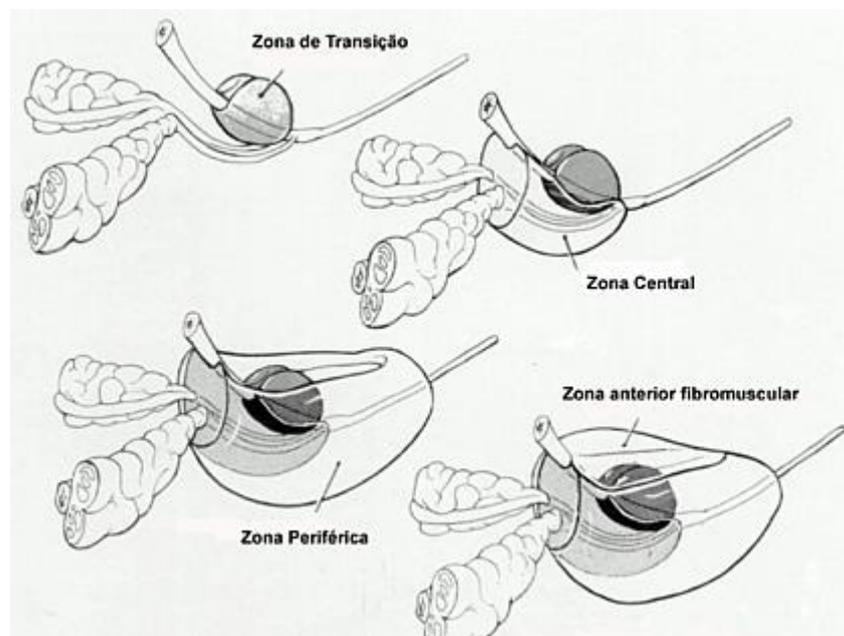
## Abstract:

The development of diseases affecting the prostate is associated with the androgenic signaling axis, which is highly dependent on the androgen receptor (AR) and circulating levels of androgens. The AR acts as a transcription factor, mediating the activation or repression of the transcription of innumerable genes. Thus, AR plays an important role in the regulation of prostate cell proliferation and differentiation. In this study, we sought to identify the gene expression of several genes associated with the androgenic signaling pathway in microdissected samples of benign prostatic hyperplasia (BPH) (n = 3) and prostate cancer (PC) (n = 3) by RT-qPCR, as also the protein expression of some differentially expressed genes. Gene expression showed that 17 genes (AIG1, APPL1, BRCA1, BRCA2, CDC25B, ESR2, HSD17B3, HSD17B8, IL8, MED17, MED24, PAK6, PIM1, POR, SHH, SOAT1 and WDR19) presented expression only in the CaP group. Seven genes (MED13, SPDEF, RDH11, CALR, NKX3-1, KLK4 and PMEPA1) presented increased expression in the CaP group compared to the HPB group; 40 genes (HSD11B1, TGFB11, BCL2, UGT2B17, SRY, UGT2B15, MED1, RCHY1, PA2G4, KAT2B, FOXO3, MED14, SUMO1, PIAS2, CALCOCO1, HSD17B6, DAXX, MED4, PARK7, PATZ1, NR2C1, TMPRSS2, PIAS1, AR, MED12, SCARB1, PART1, PIAS3, NSD1, MED16, AOF2, ZMIZ1, NCOA1, MYST2, IGFBP5, SART3, CREBBP, TGIF1, CLDN3 and FKBP4) had decreased expression in the CaP group compared to the HPB group; 21 genes (AKR1C4, BMX, CRISP1, CYP11B1, CYP19A1, CYP21A1, DHRS9, FGF8, GPX5, GRP, HSD3B1, IL4, INFG, SHBG, STS, SPAG11B, TGM4, UGT1A8, UGT2A1 and UGT2B7) did not show expression in any of the groups and 7 genes (ESR1, IL6, NCOA2, NCOA4, PDS5B, SRD5A1 and SRD5A2) presented expression in both groups, but it was not possible to analyze them. In the protein expression of AR we find that it is more expressed in the nucleus of hyperplastic cells and in the cytoplasm in tumor cells. BRCA1 predominates in the cytoplasm of tumor cells, whereas a small fraction of hyperplastic cells is positive in the nucleus, and NKX3-1 shows greater cytoplasmic expression in CaP and similar expression in the nucleus of both groups. Thus, this work shows the great tumor heterogeneity through the variation in the gene and protein expression of both genes that favor as well as those that prevent tumor permanence in the specific tumor tissue, and it is believed to be the primary CaP, regulatory pathways that tend to contain tumor are activated.

## Introdução:

### Próstata

A próstata é uma glândula acessória que faz parte do sistema genital masculino e contribui para a secreção do fluido seminal (McDougal, Wein et al. 2011). Ela situa-se abaixo da bexiga, é envolvida por uma cápsula fibrosa e internamente é dividida em 3 zonas. A zona periférica compreende todo o tecido glandular prostático presente no ápice bem como o tecido posterior próximo a cápsula. Esta zona é considerada o local onde ocorre mais comumente o desenvolvimento de carcinomas, prostatites crônicas e atrofia pós-inflamatórias. A zona de transição compreende a região localizada entre a zona periférica e a central, é o local que frequentemente está envolvido com a hiperplasia prostática benigna (HPB); e a zona central, apresenta formato cônico que envolve a uretra e os ductos seminiais (Figura 1)(Kai H. Hammerich 2009).



**Figura 1.** Localização das zonas da próstata (Kai H. Hammerich 2009)

A glândula prostática é túbulo-alveolar, composta de tecidos epiteliais incorporados em tecido estromal, incluindo fibroblastos, miofibroblastos e células

musculares lisas. O tecido epitelial apresenta células basais e células secretoras que secretam o fluido prostático contendo o antígeno prostático específico (PSA) e prostaglandinas. Estas células também expressam o receptor de androgênio (AR); assim, apresentam regulação dependente da concentração de androgênios circulantes. As células estromais segregam fatores de crescimento e expressam o AR, receptor de estrogênio (ER), o receptor adrenérgico e 5- $\alpha$ -redutase (Niu and Xia 2009). As células nos dois compartimentos mantêm relação simbiótica através do mecanismo parácrino. Estas comunicações recíprocas entre os compartimentos são fundamentais para a preservação da homeostase do tecido (Wadhwa and Dumbre 2016).

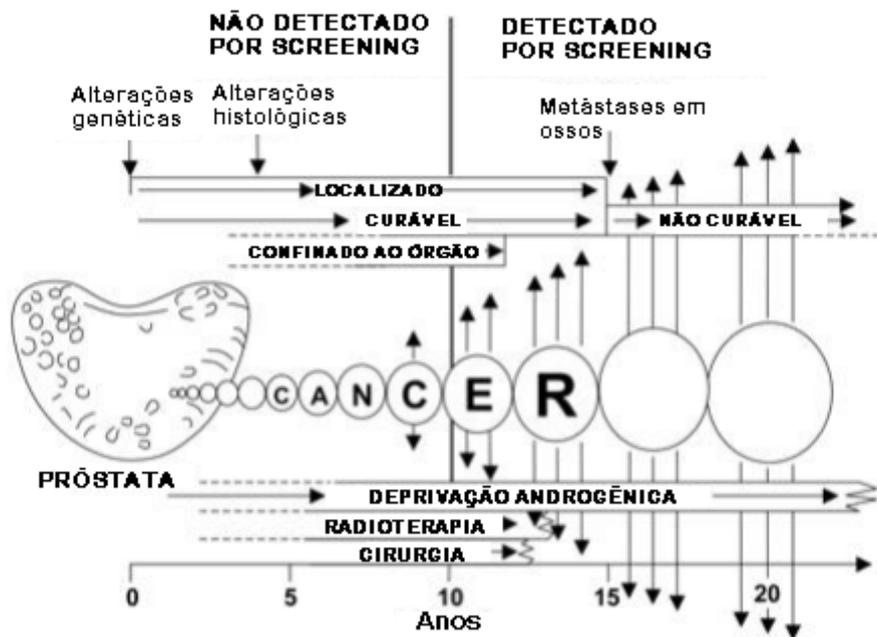
As alterações do tecido prostático são cada vez mais frequentes. Um dos possíveis fatores relacionados com estas alterações é o aumento da expectativa de vida das populações. As alterações clinicamente mais importantes de proliferação celular anormal da próstata são a Hiperplasia Prostática benigna (HPB)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

### **Câncer de próstata (CaP)**

O CaP é o tipo de câncer com maior prevalência no sexo masculino, inclusive no Brasil, estando atrás apenas do câncer de pele não-melanoma (INCA 2016). Para o ano de 2016, estima-se 61.200 novos casos de CaP, sendo que no ano de 2013, ocorreram 13.772 mortes por esta doença. Já no Rio Grande do Sul, estima-se 6.000 novos casos a cada 100 mil homens em 2016(INCA 2016). Nos últimos anos uma melhora nos métodos de diagnósticos e a modernização na qualidade dos sistemas de registros e informação dos casos no país, permitiram detectar um aumento nas taxas de incidência de CaP no Brasil (INCA 2016). Nos Estados Unidos, o CaP apresenta-se como o segundo tipo de câncer mais prevalente e como a segunda causa de morte de homens, sendo que, para o ano de 2016 foi estimado que 180.890 novos casos serão diagnosticados e que 26.120 homens morrerão da doença (ACS 2016).

O CaP é classificado como um adenocarcinoma, pois cerca de 95% dos casos de CaP se desenvolvem nos ácinos dos ductos prostáticos. Os fatores de risco para o desenvolvimento do CaP incluem: o aumento da idade, histórico familiar, genética, raça (afro-americanos são os mais afetados) e fatores dietéticos (Udensi and Tchounwou 2016). Quando diagnosticado em fases iniciais, é potencialmente curável por prostatectomia radical ou radioterapia. Contudo, a progressão do CaP é um processo de várias etapas, de entendimento complexo devido a sua heterogeneidade e sua propensão a se espalhar rapidamente no local e gerar metástases em linfonodos e ossos, que representam a maior parte da morbidade e mortalidade de pacientes com CaP. Uma vez que o crescimento de células do CaP depende da presença de androgênios, a terapia de privação de androgênio tem sido o tratamento principal para os pacientes com células de CaP metastático (Wadhwa and Dumbre 2016).

Alguns estudos retrospectivos sugerem que mais da metade dos homens americanos têm aos 80 anos algumas células cancerosas em sua próstata. No entanto, a maioria destes homens são assintomáticos e o tratamento clínico não é realizado. Em alguns casos, algumas células cancerosas apresentam comportamento agressivo devido ao fenótipo pouco diferenciado, o que por sua vez agrava o índice proliferativo, a mobilidade e a invasão celular (Wadhwa and Dumbre 2016). Mesmo que a grande maioria dos pacientes permanece assintomática nas fases iniciais, o CaP avançado pode ser acompanhado por uma variedade de sintomas urinários, dor e inchaço nas pernas e na área pélvica, os quais também são encontrados na HPB. Assim, a utilização de antígeno específico de próstata plasmático total (TPSA) como marcador clínico torna-se importante, sendo considerado o valor de corte de 4 ng / mL como indicativo de CaP, juntamente com biópsia transretal guiada por ultrassom (Kgatle, Kalla et al. 2016).



**Figura 2.** Evolução do câncer de próstata. Representação esquemática da evolução do câncer de próstata a partir do aparecimento da primeira alteração genética (Labrie, Belanger et al. 2005).

A figura 2 mostra a evolução do CaP a partir de uma mutação ou alteração genética. Durante anos, as células cancerosas podem ser vistas por histologia ou marcadores genéticos, mas é quando o tumor atinge um volume relativamente grande (0,3 cc ou mais) que o diagnóstico pode ser feito por rastreamento usando PSA e ecografia transretal da próstata. Quando o diagnóstico se torna possível por rastreamento, 50% dos casos de CaP já migraram para fora da próstata e não são mais órgãos confinados. A prostatectomia radical só pode curar a doença quando o câncer é órgão confinado e a radioterapia e braquiterapia têm aproximadamente a mesma eficácia. A terapia de privação androgênica também pode ser realizada, sendo o tratamento de escolha no estágio avançado da metástase óssea o único tratamento ativo (Labrie, Belanger et al. 2005).

Em razão do lento crescimento, o CaP pode levar até 10 anos para progredir de uma neoplasia intra-epitelial (PIN) para um carcinoma invasivo. Histologicamente, o PIN pode ser classificado em baixo e alto grau, sendo caracterizados pela

arquitetura celular e molecular. O Score de Gleason, o sistema de classificação desenvolvido pelo Dr. Donald F. Gleason entre 1966 e 1974 foi recentemente revisto e melhorado pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica de 2014 e continua a ser um dos mais poderosos preditores do prognóstico do CaP. Uma alternativa ao atual Gleason foi recentemente proposta com o objetivo de diminuir o excesso de tratamento de CaP de baixo grau detectado pelo rastreamento de PSA. A nova classificação CaP simplificada incorpora cinco graus e estes incluem o grupo de grau 1 (escore de Gleason  $\leq 6$ ), grupo de grau 2 (pontuação de Gleason  $3 + 4 = 7$ ), grupo de grau 3 (pontuação de Gleason  $4 + 3 = 7$ ), grupo de grau 4 (pontuação de Gleason 8) e, finalmente, Grupo 5 (pontuação de Gleason 9-10) (Kgatle, Kalla et al. 2016).

### **Hiperplasia prostática benigna (HPB)**

A hiperplasia prostática benigna é uma doença progressiva, que provoca um aumento do volume da próstata, uma diminuição na taxa máxima de fluxo urinário, bem como o desenvolvimento de retenção urinária aguda, em seus estágios mais avançados. É a doença urológica não-maligna mais comum entre os homens idosos e afeta mais de 40% dos indivíduos com idade superior aos 60 anos (Minutoli, Rinaldi et al. 2016).

A HPB é comumente caracterizada por sintomas do trato urinário inferior (LUTS) em associação com disfunções sexuais (DS), tais como disfunção erétil e ejaculação, diminuição da libido e insatisfação geral, o que leva esta doença ter um impacto significativo na qualidade de vida de homens acometidos. Contudo, os processos específicos que levam ao fenótipo observado em HPB ainda não foram completamente esclarecidos. Evidências indicam uma ligação molecular entre androgênios, estrogênios, fatores de crescimento e neurotransmissores na evolução da HPB. O aumento de volume da próstata é causado por um crescimento complexo e gradual que envolve tanto o epitélio glandular da próstata quanto o estroma fibromuscular na zona de transição (Minutoli, Rinaldi et al. 2016).

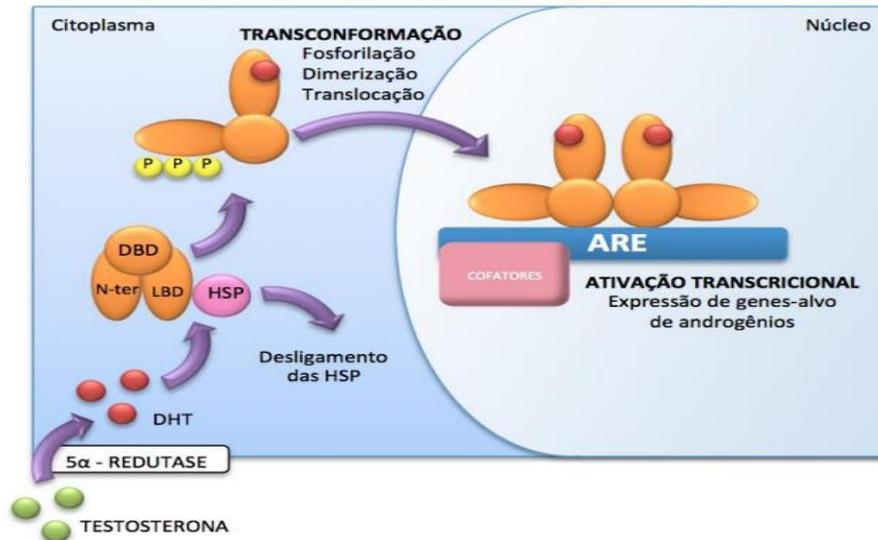
A HPB é a doença mais prevalente da próstata sendo relatado já em 1991 por Garraway e cols. na Escócia que 14% dos homens com idade entre 40-50 anos e 43% dos homens com idade superior a 60 anos apresentavam HPB (Garraway, Collins et al. 1991). Além disso, evidências microscópicas demonstram que 50% dos homens aos 50 anos de idade e 90% dos homens aos 80 anos apresentam HPB (Carson and Rittmaster 2003). Ou seja, grande parte dos homens que atingem a expectativa de vida é acometida por esta doença.

### Sinalização androgênica

O eixo de sinalização androgênica participa tanto do desenvolvimento normal da próstata com também do desenvolvimento da HPB e do CaP. O hormônio dihidrotestosterona (DHT) é um precursor da testosterona e, embora a DHT esteja geralmente relacionada ao desenvolvimento normal da glândula prostática, um desbalanço na função ou nos níveis de androgênios, ou dos fatores de crescimento dependentes da DHT, podem causar a proliferação excessiva da glândula, levando assim ao desenvolvimento de doenças proliferativas da próstata (Carson and Rittmaster 2003). No entanto, sabe-se que os androgênios desempenham um papel importante no desenvolvimento do CaP através da modulação do receptor de androgênios (Caffo, Maines et al. 2016).

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

DNA polimerase tipo II) e também diferentes cofatores, que atuam inibindo ou ativando a transcrição gênica (Guo, Yang et al. 2009) (Figura 3).

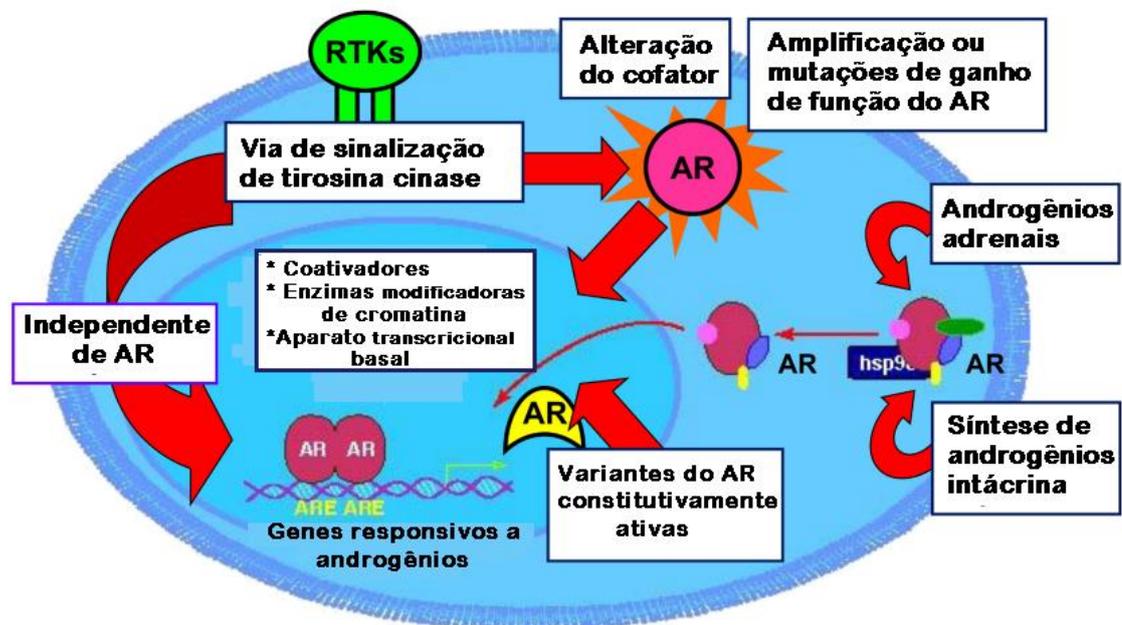


**Figura 3.** Mecanismo de ação dos androgênios. Exemplificado pela testosterona. Adaptada de (Gobinet, Pujol et al. 2002).

O AR pode atuar como fator de transcrição, sendo responsável por mediar a ativação ou repressão da transcrição de inúmeros genes. Essa modulação da transcrição gênica pode ocorrer pelo recrutamento de coativadores ou correpressores. Deste modo, o AR apresenta um importante papel na regulação da proliferação e diferenciação de células prostáticas (Dean and Knudsen 2013).

Visto que a ação do AR é mediada por androgênios e a testosterona é o principal androgênio masculino, Huggins e Hodges demonstraram em 1941 que a privação androgênica pela redução dos níveis de testosterona mediada por castração poderia possibilitar o controle do potencial metastático do CaP. No entanto, muitos pacientes que se submetiam a terapia de privação androgênica eventualmente se tornavam resistentes e o tumor permanecia, condição definida como câncer de próstata refratário ao tratamento hormonal ou castração (CRPC)(Caffo, Maines et al. 2016).

A habilidade das células tumorais de crescer em condições de privação hormonal está relacionada com a reativação do eixo de sinalização androgênica (Fig 4), que pode ocorrer devido a mecanismos da elevada expressão do AR, amplificação ou mutações de ganho de função do AR, expressão de coativadores e correpressores, síntese intrácrina de androgênios e ativação alternativa por sinalização dependente de tirosina cinase (Caffo, Maines et al. 2016). Desta forma, o CaP tornou-se foco intensivo de estudo para entender os mecanismos subjacentes à transição do CaP para o CaP resistente à ablação androgênica.



**Figura 4.** Vias para ativação do AR em casos de privação androgênica Adaptado de(Hoang, Iczkowski et al. 2016).

Devido a grande complexidade do CaP, muito esforço é investido na busca por moléculas que possam servir como biomarcadores ou até como alvos terapêuticos. A identificação de genes regulados pelo AR têm sido de interesse especial e a maioria dos estudos de expressão são realizados na linhagem celular LNCaP, que revelou que 1,5% a 4,3% do seu transcriptoma é regulado direta ou indiretamente pelos androgênios. Os genes regulados por androgênios pertencem a várias classes, incluindo genes que codificam as proteínas envolvidas na via secretora,

função principal da próstata e na sua contribuição para o fluido seminal. Além disso, genes que estão envolvidos na transcrição, *splicing*, biogênese ribossômica, mitogênese, processos bioenergéticos também podem ser regulados por androgênios no CaP; no entanto, o papel da maioria destes genes na carcinogênese permanece obscura. Dentre os genes regulados pelo AR, podemos citar os genes FGF8 (fator de crescimento envolvido na carcinogênese da próstata); KLK4 (envolvido na proliferação celular e metástases); NKX3-1 (regulador de crescimento epitelial e diferenciação na próstata) e TMPRSS2 (serina protease ligada à membrana)(Kaarbo, Klock et al. 2007).

### ***TaqManplatearray***

*TaqManplatearray* é um método de rastreamento de biomarcadores, painéis toxicológicos, análises de vias e genes alvo que utilizam a técnica de transcrição reversa quantitativa PCR (RT-qPCR) para detecção dos mesmos (Figura 5). *TaqManplatearray* é fácil de usar e econômico, apresentando resultados padronizados e com baixa variabilidade. Com base nesse pressuposto, o método de rastreamento *TaqManArrayHumanAndrogens* foi escolhido porque permitiu ao mesmo tempo, o rastreamento de 92 genes associados à via de sinalização androgênica, incluindo genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de androgênios, reguladores de produção de androgênios, receptores e proteínas de transdução que medeiam suas funções, e os alvos de sinalização de androgênica, como também, os genes SRY do cromossomo Y, que desempenham funções no desenvolvimento do fenótipo masculino e vários genes associados à via de sinalização do estrogênio. Portanto, este trabalho permitiu um melhor entendimento da expressão dos genes que estão relacionados com o CaP (AppliedBiosystems, 2014).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	CRISP1	AR	STS	BCL2	BMX	BRCA1	BRCA2	CALR
B	SCARB1	CDC25B	AKR1C4	CLDN3	CREBBP	CYP11A1	CYP11B1	CYP19A1	CYP21A2	DAXX	ESR1	ESR2
C	FGF8	FKBP4	FOXO3	GPX5	GRP	HSD3B1	HSD11B1	HSD17B3	IFNG	IGFBP5	IL4	IL6
D	IL8	NKX3-1	PA2G4	PIM1	POR	MED1	SHBG	SHH	SOAT1	SRD5A1	SRD5A2	SRY
E	TGFB111	TGM4	TGIF1	TMPRSS2	NR2C1	SUMO1	UGT2B7	UGT2B15	UGT2B17	HSD17B8	PIAS1	HSD17B6
F	PCAF	PIAS2	MED14	MED17	KLK4	SART3	MED24	MED12	MED13	MED16	DHRS9	PIAS3
G	SPAG11B, SPA1	NCOA2	UGT2A1	MYST2	PARK7	ADF2	PDS5B	PATZ1	SPDEF	PART1	RCHY1	APPL1
H	MED4	RDH11	AIG1	UGT1A8	PAK6	PMEPA1	ZMIZ1	CALCOCO	WDR19	NSD1	NCOA4	NCOA1

**Figura 5.** Layout da placa TaqmanArray utilizada para a análise de genes envolvidos na via de sinalização do AR, sendo que em cada poço havia uma sonda específica diferente, totalizando 96 sondas diferentes no ensaio.

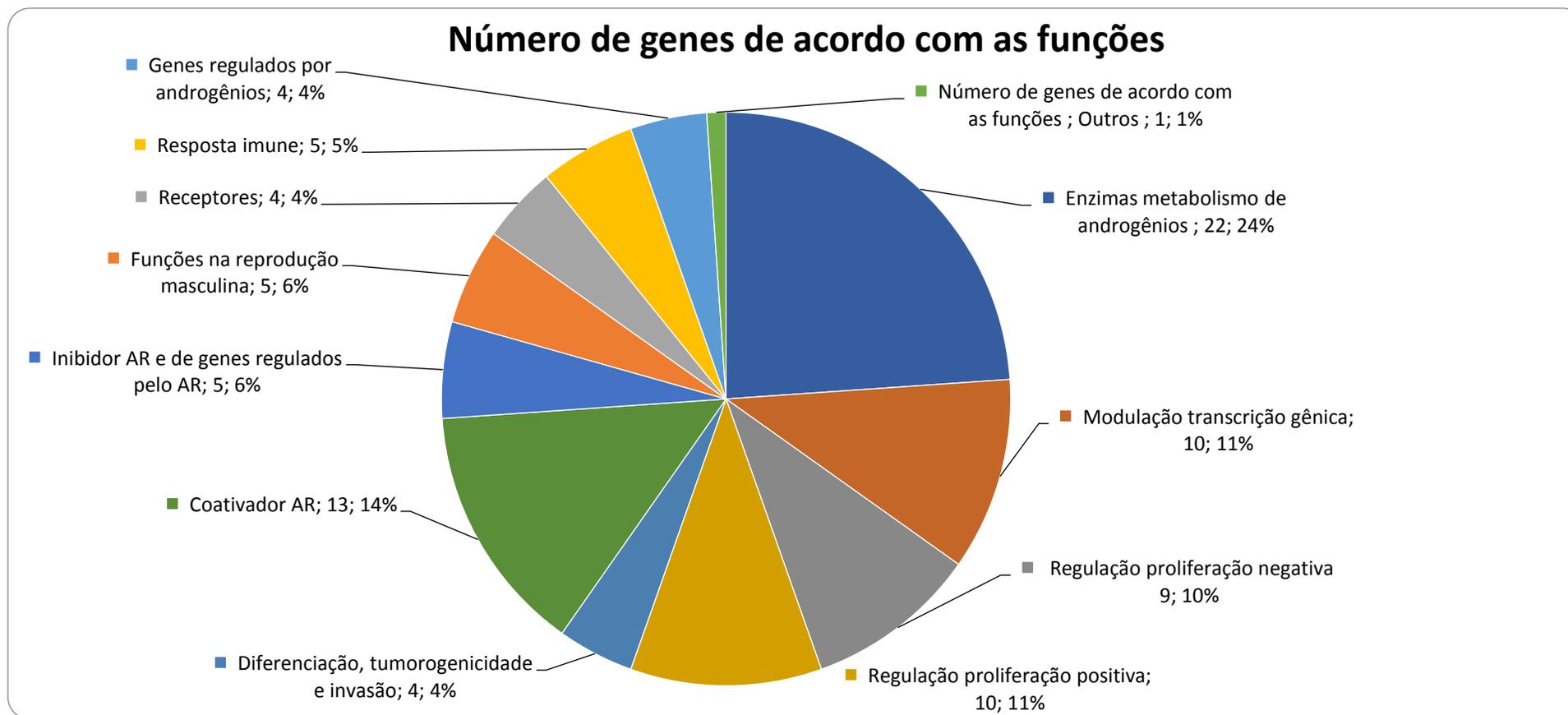
Os genes que estão envolvidos na síntese de androgênios podem auxiliar na verificação do perfil de síntese de hormônios esteroides nos tecidos de CaP e HPB. Como por exemplo, na família HSD, o gene que codifica a enzima HSD17B8 que converte estradiol em estrona, o gene HSD3B1 que codifica a enzima que catalisa a conversão de derivados de esteroides de desidroepiandrosterona-adrenal a DHT. A enzima 5 $\alpha$ -redutase codificada pelo gene SRD5A é outra enzima crítica no metabolismo dos androgênios, e converte a testosterona em dihidrotestosterona, o agonista mais potente do AR em células da próstata (Shiota, Fujimoto et al. 2015). As enzimas CYP (citocromo P450) que são enzimas predominantemente hepáticas que metabolizam drogas e outros xenobióticos. Contudo, sabe-se que estas enzimas estão envolvidas nas funções celulares como o metabolismo de eicosanoides, a biossíntese de colesterol e ácidos biliares, a síntese e metabolismo de esteroides, a síntese e degradação de amins biogênicas, a síntese e o metabolismo da vitamina D3 e a hidroxilação de ácido retinóico (Nebert and Dalton 2006).

Além disso, a análise de genes que codificam proteínas que regulam a atividade transcricional do AR, como a CALC (calreticulina) que o regula negativamente, impedindo sua ligação aos elementos responsivos a androgênios, coativadores do AR (TGFB111- fator de crescimento transformante beta, família NCOA- coativadores do receptor nuclear, família MED- complexo mediador, CREBBP- proteína ligadora de CREB), correpressores da expressão gênica (DAXX- proteína associada ao domínio de morte celular), e de genes que são considerados alvos do AR, também contribuem no entendimento da fisiopatologia do CaP, juntamente com a análise de genes que estão envolvidos com o fenótipo masculino.

O epitélio normal prostático e o CaP apresentam expressão diferencial de diversos genes. Genes que exercem funções como transdução de sinal, geralmente são superexpressos, enquanto genes supressores tumorais são pouco expressos. No entanto, a baixa expressão de genes supressores tumorais, junto com a diminuição da apoptose e a elevada proliferação, podem ser considerados fatores favoráveis para o câncer (Romics, Banfi et al. 2008). Contudo, a manutenção da regulação do ciclo celular é fundamental para determinar se a célula irá se diferenciar, proliferar ou se irá morrer (Lu, Liu et al. 1999). Compreender a interação de genes como BRCA1 e BRCA2 supressores tumorais, juntamente com os demais genes antiapoptóticos, como o BCL, oncogenes, e genes que codificam proteínas que favorecem a proliferação (KLK4 – kalitreína, GRP- peptídeo liberador de gastrina), invasão (FGF8- fator de crescimento fibroblástico 8) e angiogênese (Interleucina 8), podem favorecer o entendimento do ciclo celular desordenado no CaP em relação a HPB.

Na figura 6 apresentamos a distribuição dos genes de acordo com as funções: enzimas que participam do metabolismo dos androgênios; moduladores de transcrição; reguladores negativos da proliferação celular; processo de tumorigênese e invasão; reguladores positivos da proliferação celular; coativadores do AR; correpressores, genes envolvidos na reprodução masculina, mediadores da resposta imune; genes regulados pelo AR e receptores hormonais. Na tabela abaixo (Tabela 1) apresentamos todos os genes presentes no ensaio, juntamente com a

identificação da sonda (ID sonda), identificação do gene (ID Gene), nome do gene e suas funções.



**Figura 6.** Número de genes de acordo com as funções sendo: 22 genes que codificam enzimas que participam do metabolismo dos androgênios; 10 genes que modulam a transcrição gênica; 9 genes que atuam como reguladores negativos da proliferação celular; 10 genes que atuam como reguladores positivos da proliferação celular; 4 genes que participam do processo de tumorigênese e invasão; 13 genes coativadores do AR; 5 genes que atuam como corepressores; 5 genes que tem participação na reprodução masculina; 4 genes que codificam receptores; 5 genes mediadores da resposta imune; 4 genes regulados pelo AR e 1 gene na categoria outros.

**Tabela 1.** Descrição dos genes estudados no ensaio. (\*) Genes considerados genes normalizadores do ensaio.

<b>Símbolo</b>	<b>ID Sonda</b>	<b>ID Gene</b>	<b>Nome do Gene</b>	<b>Funções</b>
<b>18S*</b>	Hs99999901_s1		<i>18S ribosomal RNA</i>	Síntese proteica.
<b>AIG1</b>	Hs00211518_m1	51390	<i>Androgen induced 1</i>	Homeostase do Ca <sup>2+</sup>
<b>AKR1C4</b>	Hs00559542_m1	1109	<i>aldo-keto reductase family 1 member C4</i>	Enzima que catalisa a conversão de aldeídos e cetonas em seus correspondentes alcoólicos.
<b>AOF2</b>	Hs00323448_m1	5724032	<i>amineoxidoreductase</i>	Componente de complexos histona desacetilase
<b>APPL1</b>	Hs00179382_m1	26060	<i>adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1</i>	Regulação da proliferação celular.
<b>AR</b>	Hs00171172_m1	367	<i>androgen receptor</i>	Fator de transcrição ativado por hormônios esteroides.
<b>BCL2</b>	Hs00608023_m1	596	<i>BCL2, apoptosis regulator</i>	Anti-apoptótico.
<b>BMX</b>	Hs00176455_m1	660	<i>BMX non-receptor tyrosine kinase</i>	Regulador de diferenciação e tumorigenicidade.
<b>BRCA1</b>	Hs00173233_m1	672	<i>BRCA1, DNA repair associated</i>	Manutenção da estabilidade genômica e supressor tumoral
<b>BRCA2</b>	Hs00609060_m1	675	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>	Manutenção da estabilidade genômica e supressor tumoral
<b>CALCOCO1</b>	Hs00253023_m1	57658	<i>calcium binding and coiled-coil domain 1</i>	Coativador secundário de receptores nucleares.

<b>CALR</b>	Hs00189032_m1	811	<i>Calreticulin</i>	Proteína ligadora de cálcio (estocagem), inibidora do AR, moduladora da transcrição gênica de receptores hormonais nucleares.
<b>CDC25B</b>	Hs00244740_m1	994	<i>Cell division cycle 25B</i>	Propriedades oncogênicas, coativadora do AR.
<b>CLDN3</b>	Hs00265816_s1	1365	<i>claudin 3</i>	Componente das tight junction
<b>CREBBP</b>	Hs00231733_m1	1387	<i>CREB binding protein</i>	Coativador transcricional de diversos fatores de transcrição
<b>CRISP1</b>	Hs00538261_m1	167	<i>Cysteine rich secretory protein 1</i>	Atua na fusão espermatoócito-óvulo.
<b>CYP11A1</b>	Hs00167984_m1	1583	<i>cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1</i>	Metabolismo de drogas, síntese de colesterol, esteroides e outros lipídeos.
<b>CYP11B1</b>	Hs01596404_m1	1584	<i>cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1</i>	Idem ao anterior.
<b>CYP19A1</b>	Hs00240671_m1	1588	<i>cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1</i>	Idem ao anterior.
<b>CYP21A2</b>	Hs00416901_g1	1589	<i>cytochrome P450 family 19 subfamily A member 2</i>	Idem ao anterior.
<b>DAXX</b>	Hs00985566_g1	1616	<i>Death domain associated protein</i>	Repressor de supressor tumoral, regulador da autofagia, indutor de crescimento tumoral e a sobrevivência do tumor.
<b>DHRS9</b>	Hs00608375_m1	10170	<i>dehydrogenase/reductase 9</i>	Enzima com atividade oxidoreductase.
<b>ESR1</b>	Hs00174860_m1	2099	<i>estrogen receptor 1</i>	Desenvolvimento sexual e funções reprodutivas.

<b>ESR2</b>	Hs00230957_m1	2100	<i>estrogen receptor 2</i>	Desenvolvimento sexual, funções reprodutivas e fator de transcrição associado a ligante.
<b>FGF8</b>	Hs00171832_m1	2253	<i>Fibroblast growth factor 8</i>	Desenvolvimento embrionário, crescimento celular, reparo de tecidos, crescimento e invasão tumoral.
<b>FKBP4</b>	Hs00427038_g1	2288	<i>FK506 binding protein 4</i>	Regulador positivo do AR.
<b>FOXO3</b>	Hs00818121_m1	2309	<i>forkhead box O3</i>	Fator de transcrição de genes necessários para apoptose.
<b>GAPDH*</b>	Hs99999905_m1	2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Produção de energia no metabolismo dos carboidratos.
<b>GPX5</b>	Hs00559733_m1	2880	<i>Glutathione peroxidase 5</i>	Proteção das membranas dos espermatozoides dos efeitos da peroxidação lipídica e na prevenção da reação prematura do acrossoma.
<b>GRP</b>	Hs00181852_m1	2922	<i>gastrin releasing peptide</i>	Liberação de hormônios gastrointestinais, contração de células musculares lisas e proliferação de células epiteliais.
<b>GUSB*</b>	Hs99999908_m1	2990	glucuronidase beta	Hidrolase que degrada os glicosaminoglicanos.
<b>HPRT1*</b>	Hs99999909_m1	3251	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Catalisa a conversão de hipoxantina em monofosfato de inosina e guanina em monofosfato de guanosina.

<b>HSD11B1</b>	Hs00194153_m1	3290	<i>hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1</i>	Catalisa a conversão do hormônio do estresse cortisol para o metabólito inativo cortisona.
<b>HSD17B3</b>	Hs00609319_m1	3293	<i>hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3</i>	Catalisa a conversão de androstenediona em testosterona.
<b>HSD17B6</b>	Hs00366258_m1	8630	<i>hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 6</i>	Catabolismo androgênico.
<b>HSD17B8</b>	Hs00367151_m1	7923	<i>hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 8</i>	Oxida e inativa o estradiol, a testosterona e a dihidrotestosterona.
<b>HSD3B1</b>	Hs00426435_m1	3283	<i>hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1</i>	Catalisa a conversão oxidativa de precursores delta-5-3-beta-hidroxiesteróides em delta-4-cetoesteróides.
<b>IFNG</b>	Hs00174143_m1	3458	<i>Interferon gamma</i>	Desencadeia uma resposta celular às infecções virais e microbianas.
<b>IGFBP5</b>	Hs00181213_m1	3488	<i>insulin like growth factor binding protein 5</i>	Favorece apoptose e efeitos anti-migratório.
<b>IL4</b>	Hs00174122_m1	3565	<i>interleukin 4</i>	Proliferação celular e inibição da apoptose.
<b>IL6</b>	Hs00174131_m1	3569	<i>interleukin 6</i>	Coativador do AR e proliferação.
<b>IL8</b>	Hs00174103_m1	3576	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8</i>	Vigilância imune, inflamação e a angiogênese.
<b>KAT2B</b>	Hs00187332_m1	8850	<i>Lysine acetyltransferase 2B</i>	Coativador do AR e atividade de acetiltransferase.

<b>KLK4</b>	Hs00191772_m1	9622	<i>Kallikrein related peptidase 4</i>	Mobilidade celular, proliferação celular e transição epitelial-mesenquimal.
<b>MED1</b>	Hs00191130_m1	5469	<i>Mediator complex subunit 1</i>	Comunicar sinais de reguladores de Fatores de transcrição diretamente para a enzima RNA polimerase II.
<b>MED12</b>	Hs00192801_m1	9968	<i>Mediator complex subunit 12</i>	Idem ao anterior.
<b>MED13</b>	Hs00192834_m1	9969	<i>Mediator complex subunit 13</i>	Idem ao anterior.
<b>MED14</b>	Hs00188481_m1	9282	<i>Mediator complex subunit 14</i>	Idem ao anterior.
<b>MED16</b>	Hs00193899_m1	10025	<i>mediatorcomplexsubunit 16</i>	Idem ao anterior.
<b>MED17</b>	Hs00188669_m1	9440	<i>mediatorcomplexsubunit 17</i>	Idem ao anterior.
<b>MED24</b>	Hs00207863_m1	9862	<i>mediatorcomplexsubunit 24</i>	Idem ao anterior.
<b>MED4</b>	Hs00204327_m1	29079	<i>mediatorcomplexsubunit 4</i>	Idem ao anterior.
<b>MYST2</b>	Hs00272972_m1	425530	<i>MYST histoneace tyltransferase 2</i>	Acetilação de histonas.
<b>NCOA1</b>	Hs00186661_m1	8648	<i>nuclear receptor coactivator 1</i>	Coativador transcricional para receptores hormonais esteroides e nucleares.
<b>NCOA2</b>	Hs00197990_m1	10499	<i>nuclear receptor coactivator 2</i>	Idem ao anterior.
<b>NCOA4</b>	Hs00428328_m1	8031	<i>nuclear receptor coactivator 4</i>	Idem ao anterior.
<b>NKX3-1</b>	Hs00171834_m1	7240982	<i>nkhmeobox 3</i>	Regulador negativo do crescimento de células epiteliais em próstata.

<b>NR2C1</b>	Hs00172676_m1	22025	<i>nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1</i>	Receptor nuclear hormonal.
<b>NSD1</b>	Hs00223782_m1	64324	<i>nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>	Transativador do AR.
<b>PA2G4</b>	Hs00854538_g1	5036	<i>proliferation-associated 2G4</i>	Correpressor de genes regulados pelo AR.
<b>PAK6</b>	Hs00220131_m1	56924	<i>p21 (RAC1) activated kinase 6</i>	Regulador negativo do AR e supressor tumoral.
<b>PARK7</b>	Hs00994896_g1	11315	<i>Parkinsonism associated deglycase</i>	Inibidor de supressor celular.
<b>PART1</b>	Hs00213199_m1	25859	<i>Prostate androgen-regulated transcript 1</i>	Gene regulado por androgênios.
<b>PATZ1</b>	Hs00204880_m1	23598	<i>POZ/BTB and AT hook containing zinc finger 1</i>	Oncogene e supressor tumoral.
<b>PDS5B</b>	Hs00248269_m1	23047	<i>PDS5 cohesin associated factor B</i>	Regulador negativo da proliferação celular e supressor tumoral.
<b>PIAS1</b>	Hs00184008_m1	8554	<i>protein inhibitor of activated STAT 1</i>	Proliferação celular, coativação do AR.
<b>PIAS2</b>	Hs00190699_m1	9063	<i>protein inhibitor of activated STAT 2</i>	Idem ao anterior.
<b>PIAS3</b>	Hs00180666_m1	10401	<i>protein inhibitor of activated STAT 3</i>	Idem ao anterior.
<b>PIM1</b>	Hs01065498_m1	5292	<i>Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>	Oncogene, proliferação e sobrevivência celular.
<b>PMEPA1</b>	Hs00375306_m1	56937	<i>prostate transmembrane protein, androgen induced</i> 1	Supressor do AR.
<b>POR</b>	Hs00287016_m1	5447	<i>cytochrome p450 oxidoreductase</i>	Metabolismo de drogas e de hormônios esteroides.

<b>RCHY1</b>	Hs00295839_m1	25898	<i>ring finger and CHY zinc finger domain containing 1</i>	Inibe supressores tumorais e oncogenes.
<b>RDH11</b>	Hs00211283_m1	51109	<i>retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)</i>	Retinol desidrogenase.
<b>SART3</b>	Hs00206829_m1	9733	<i>squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3</i>	Gene antigênico de rejeição de tumor.
<b>SCARB1</b>	Hs00194092_m1	20778	<i>scavenger receptor class B, member 1</i>	Metabolismo de lipoproteínas e colesterol.
<b>SHBG</b>	Hs00168927_m1	6462	<i>sex hormone binding globulin</i>	Transporte de androgênios e estrogênio.
<b>SHH</b>	Hs00179843_m1	6469	<i>Sonic hedgehog</i>	Desenvolvimento dos órgãos, da proliferação celular e na diferenciação dos tecidos.
<b>SOAT1</b>	Hs00162077_m1	6646	<i>sterol O-acyltransferase 1</i>	Catalisa a formação de ésteres de colesterol e ácidos graxos.
<b>SPAG11B,SPAG11A</b>	Hs00414469_m1	10407	<i>Sperm associated antigen 11B</i>	Maturação do esperma.
<b>SPDEF</b>	Hs00171942_m1	25803	<i>SAM pointed domain containing ETS transcription factor</i>	Transativador do promoter do gene do PSA.
<b>SRD5A1</b>	Hs00602694_mH	6715	<i>steroid 5 alpha-reductase 1</i>	Catalisa a conversão da testosterona em dihidrotestosterona.
<b>SRD5A2</b>	Hs00165843_m1	6716	<i>steroid 5 alpha-reductase 2</i>	Idem ao anterior.
<b>SRY</b>	Hs00243216_s1	21674	<i>sex determining region of Chr Y</i>	Determinação do sexomascuino.
<b>STS</b>	Hs00165853_m1	412	<i>steroidsulfatase (microsomal), isozyme S</i>	Hidrolisa sulfatos de 3-beta-

				hidroxiesteróides, que são precursores estrogênicos, androgênicos e colesterol.
<b>SUMO1</b>	Hs00830844_g1	7341	<i>small ubiquitin-like modifier 1</i>	Transporte nuclear, regulação da transcrição, apoptose e estabilidade de proteínas.
<b>TGFB11</b>	Hs00210887_m1	7041	<i>transforming growth factor beta 1 induced transcript 1</i>	Coativador do AR.
<b>TGIF1</b>	Hs00820148_g1	7050	<i>TGFB induced fator homeobox 1</i>	Regula crescimento e migração celular.
<b>TGM4</b>	Hs00162710_m1	7047	<i>transglutaminase 4</i>	Promove invasividade e migração.
<b>TMPRSS2</b>	Hs00237175_m1	7113	<i>transmembrane protease, serine 2</i>	Oncogene.
<b>UGT1A8</b>	Hs01592482_m1	54576	<i>UDP glucuronosyltransferase family 1 member A8</i>	Transforma pequenas moléculas lipofílicas em metabólitos excretáveis solúveis em água.
<b>UGT2A1</b>	Hs00792016_m1	10941	<i>UDP glucuronosyltransferase family 2 member A1 complex locus</i>	Conjuga substratos lipofílicos com ácido glucurônico para aumentar a solubilidade e a excreção.
<b>UGT2B15</b>	Hs00870076_s1	7366	<i>UDP glucuronosyltransferase family 2 member B15</i>	Metabolismo e eliminação de componentes tóxicos
<b>UGT2B17</b>	Hs00854486_sH	7367	<i>UDP glucuronosyltransferase family 2 member B17</i>	Idem ao anterior.
<b>UGT2B7</b>	Hs00426592_m1	7364	<i>UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7</i>	Idem ao anterior.
<b>WDR19</b>	Hs00228414_m1	57728	<i>WD repeat domain 19</i>	Transcrição gênica, apoptose, a montagem do citoesqueleto, a

formação do fuso mitótico, o desenvolvimento e o tráfico vesicular.

**ZMIZ1**

Hs00393480\_m1

57178

*zinc finger MIZ-type containing 1*

Coativador do AR

---

**Justificativa:**

As doenças da próstata são muito prevalentes e possuem incidência relacionada com o avanço da idade, de forma que a grande parte dos homens que atingem a expectativa de vida brasileira é acometida. Dentre elas estão a hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata, sendo que ambas apresentam alterações do controle do crescimento prostático. Sabe-se que os androgênios possuem um papel crucial no desenvolvimento, na manutenção e na regulação da glândula prostática. A sinalização androgênica se dá através do receptor de androgênios, que atua como fator de transcrição, sendo capaz de mediar a ativação ou repressão da transcrição de inúmeros genes. Dessa forma, este receptor apresenta um importante papel na proliferação e diferenciação de células prostáticas. Portanto, alterações na via de sinalização androgênica podem estar relacionadas com o desenvolvimento da HPB e do CaP.

O estudo do perfil de expressão de genes relacionados na via de sinalização androgênica em CaP e HPB irá permitir a identificação de genes diferentemente expressos nesses dois tipos de tumores e um melhor entendimento acerca da fisiopatologia do CaP.

### Hipóteses:

H0: O CaP e HPB apresentam expressão similar dos genes envolvidos na via de sinalização do AR que induzem proliferação, diferenciação celular ou apoptose.

H1: O CaP e HPB apresentam expressão diferencial dos genes envolvidos na via de sinalização do AR que induzem proliferação, diferenciação celular ou apoptose. Esta diferença de expressão gênica está relacionada à proliferação celular

## **Objetivos:**

### **Objetivo geral:**

Avaliar a expressão gênica dos genes envolvidos na via de sinalização do AR que induzem proliferação, diferenciação celular ou apoptose em tecido proveniente de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata, assim como, a expressão proteica de genes diferentemente expressos nos dois tecidos.

### **Objetivos específicos:**

- Avaliar a expressão gênica dos genes relacionados à sinalização do AR em HPB e CaP.

- Verificar se existe diferença no perfil de expressão gênica dos grupos.- Dos 92 genes avaliados inicialmente, avaliar a expressão de proteínas de alguns genes diferentemente expressos entre os grupos que evidenciem rotas sequenciais de sinalização.

## **Materiais e métodos:**

### **Delineamento do estudo:**

Este trabalho consiste em um estudo transversal.

### **Critérios de Inclusão:**

Para o grupo HPB, foram incluídos pacientes provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com o diagnóstico de HPB, volume prostático acima de 30g, que não possuíam diagnóstico de outra neoplasia concomitante e pacientes submetidos à cirurgia de HPB no HCPA. Para o grupo CaP, foram incluídos pacientes submetidos à cirurgia por CaP no HCPA, com diagnóstico comprovado por exame anatomopatológico, que não estavam fazendo quimioterapia e que não possuíam diagnóstico de outra neoplasia concomitante.

Os pacientes envolvidos nesta pesquisa foram consultados quanto à autorização da coleta e utilização do material e concordaram em participar do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1 e 2).

### **Aspectos éticos:**

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA e aprovado em seus aspectos éticos e científicos, sob o número 15-0191. O tecido prostático coletado foi proveniente de material de descarte de pacientes submetidos às cirurgias para cada diagnóstico específico. Os pacientes foram consultados antes da cirurgia e lhes foi garantido sigilo quanto às informações obtidas e seu uso foi absolutamente restrito para fins de pesquisa científica.

### **Obtenção das amostras:**

As amostras do grupo HPB foram coletadas no transoperatório, em condições estéreis, das cirurgias de prostatectomia aberta. Durante a cirurgia, após a retirada do espécime cirúrgico, pequenos fragmentos de tecido prostático foram cortados, armazenados em criotubos e congelados imediatamente em nitrogênio líquido.

As amostra do grupo CaP foram de pacientes submetidos às cirurgias de prostatectomia radical ou prostatovesiculectomia, sob as mesmas condições citadas acima. Após a localização do nódulo tumoral, o urologista cortou um fragmento deste, que foi armazenado em criotubo e congelado imediatamente em nitrogênio líquido. Após o congelamento, os criotubos foram armazenados em freezer -80°C.

### **Microdissecção:**

A técnica de microdissecção foi utilizada para a separação das células tumorais das amostras de tecido prostático. A separação destas células se faz necessária, pois células tumorais e células normais podem apresentar padrões de expressão gênica diferente, o que é possível ser detectado se as células forem separadas adequadamente. A mistura dos diferentes tipos celulares pode alterar os resultados e ocultar sinais das células relevantes para o estudo. O equipamento PALM MicroBeam consiste em um microscópio acoplado a um computador que permite a visualização da amostras, bem como a seleção das células de interesse. A separação de células e regiões de tecidos com precisão é realizada por um laser, que garante a exatidão e reprodutibilidade de seus resultados (Zeiss 2015). A identificação das regiões a serem dissecadas correspondentes a carcinoma ou hiperplasia foi realizada por um patologista.

A técnica foi realizada seguindo as orientações do fabricante do microdissector PALM MicroBeam com algumas modificações no protocolo proposto. O protocolo definido para as amostras prostáticas foi o seguinte: inicialmente, a amostra foi emblocada com Tissue-Tek O.C.T, composto por resinas e glicóis solúveis em água, que fornece uma matriz para as amostras de tecidos a fresco, facilitando a execução de cortes a temperaturas de  $-10^{\circ}\text{C}$  ou menos, em Criostato, e então, foram confeccionados lâminas com cortes de  $8\mu\text{m}$  de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, analisadas por um patologista e após confirmado a presença das células de interesse nos cortes, as lâminas foram armazenadas em tubos falcons de 50mL e mantidas em gelo seco até o momento da microdissecção.

O microdissertor possui um laser frio que permite o corte da área e o armazenamento da amostra na tampa de um microtubo de 0,6mL localizado sobre a lâmina. Para a realização desta técnica, um microtubo contendo o tampão PBS na tampa foi acoplado ao braço robô do microscópio. As lâminas foram acomodadas no microdissector e as áreas de interesse foram selecionadas. O corte e armazenamento da amostra foi então realizado. O tempo estimado entre a confecção das lâminas e a microdissecção foi de 2 horas para minimizar a degradação do RNA, sendo microdissecadas em média 3 lâminas por paciente neste período de tempo.

### **Extração de RNA total e purificação:**

A extração do RNA total foi realizada a partir dos fragmentos microdissecados, utilizando o RNAqueous®-Micro Total RNA Isolation Kit (Ambliom) conforme o protocolo do fabricante. Este kit permite a extração do RNA de amostras pequenas e livre de fenóis utilizando um método de lise e desnaturalização baseado em guanidina e tecnologia de separação com membrana de fibra de vidro. Além disso, reagentes de remoção de DNA incluídas no kit, permitiram um RNA isolado de alta qualidade.

### Quantificação do RNA

A quantificação das amostras de RNA foi realizada a partir de 1  $\mu$ L de RNA no aparelho NanoDrop. O RNA foi considerado puro quando a razão das absorvâncias 260/280 nm foi superior a 1,6 e próximo de 2, indicando a ausência de contaminação. A concentração de RNA foi calculada com a seguinte fórmula:  $[\text{RNA}] = \text{Abs}_{260} \times \text{diluição} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### Síntese de cDNA:

A síntese do cDNA foi realizada a partir reagentes específicos GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) utilizando para tanto ~100ng do RNA total. Inicialmente, foi adicionado ao RNA o Random Primer e o RNA foi desnaturado a 70°C por 5 min. Em seguida, foi adicionado a cada amostra um Mix contendo GoScript™ 5X Reaction Buffer, MgCl<sub>2</sub> 25mM, PCR Nucleotide Mix, RecombinatRNasin®, GoScrip™ Reverse Transcriptase (transcriptase reversa). Então, as amostras foram incubadas 25°C 5 min para anelamento e 42°C por 55 min para a extensão. Depois de transcorrido o tempo de incubação, as amostras foram aquecidas a 70°C por 15 min para a inativação da transcriptase reversa. Por fim, as reações foram estocadas em freezer -20°C até a utilização para a reação em cadeia da polimerase.

### Análise da expressão gênica:

A avaliação molecular da expressão de mRNA foi realizada a partir da técnica da reação quantitativa em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR). Para a realização da técnica foi utilizado o ensaio TaqMan® Array Human Androgens, onde dos 96 poços da placa, 92

apresentam genes associados a via de sinalização androgênica e 4 poços apresentam genes para o controle endógeno.

Para a realização da técnica foram utilizadas 6 placas, uma por paciente. O cDNA de cada paciente foi diluído na proporção 1:10 e foram adicionados 1uL de cDNA diluído por poço, além de 5uL da TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X) e 4uL de água livre de RNase. O equipamento utilizado foi o PCR real time StepOne Plus (AppliedBiosystems). As condições das reações foram: 50°C por 2 min para ativação da AmpErase UNG, 95°C 10 min para a ativação da enzima AmpliTaq Gold e 45 ciclos continuando a desnaturação 95°C por 15 seg, anelamento e extensão da fita a 60°C por 1 min. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar (thresholdcycle (Ct)), onde o aumento do sinal fluorescente foi associado com um aumento exponencial do produto de qPCR que pôde ser detectado.

### **Análise da expressão proteica**

A análise da expressão proteica foi realizada após analisados os resultados da expressão gênica. De acordo com os resultados, alguns dos genes foram escolhidos para a verificação da expressão proteica, através da técnica de imunohistoquímica a partir de tecido da biópsia fornecidos pelo serviço de patologia do HCPA. Os anticorpos primários escolhidos foram: AR diluição 1:400 (AR Antibody (C-19) sc-815), BRCA1 diluição 1:100 (Anti-BRCA1 (Ab-1), US1OP92-100UG, (Calbiochem®)e NKX3.1 diluição 1:50 (Nkx3.1 Monoclonal Antibody, 35-9700Thermofisher).

Inicialmente, os espécimes foram fixados em formalina e incluídos em parafina e foram submetidos ao corte histológico em micrótomo regulado para a espessura de 4 µm. Os cortes foram posicionados em lâminas previamente sinalizadas. Para proceder a técnica, as lâminas foram aquecidas em estufa a 80°C por uma hora, desparafinizadas com xilol, reidratadas em álcool etílico e posteriormente em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em

banho-maria por uma hora a 95°C no tampão citrato. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos. Os cortes foram posteriormente incubados, overnight a 4°C, com os anticorpos primários definidos. Após a incubação, foi aplicado o sistema de detecção por anticorpo secundário e a visualização da reação foi obtida com LiquidDab (DAKO, K3468), conforme recomendações do fabricante. Após a visualização, as lâminas foram contra-coradas em hematoxilina de Harris por 1 minuto, os cortes foram desidratados em álcool absoluto e colocados em xilol para a montagem das lâminas em resina do tipo Entellan. As lâminas foram analisadas por um patologista e a porcentagem de células positivas para a marcação juntamente com a intensidade de marcação (+1, +2 ou +3) foi determinada.

#### **Tamanho amostral:**

Este trabalho utilizou um método de rastreamento gênico (TaqMan® Plate Array, AppliedBiosystems), por isso, o tamanho amostral indicado pelo fabricante do ensaio foi de 3 (AppliedBiosystems, 2016). Além disso, optou-se por este tamanho amostral, pois o mesmo foi utilizado por Mitkevich e colaboradores num estudo utilizando o mesmo método de rastreamento (Mitkevich, Kretova et al. 2013).

#### **Análise estatística:**

Os resultados de expressão gênica foram avaliados quantitativamente utilizando o software DataAssist™, sendo o gene normalizador escolhido pelo programa *NormFinder*. Após foi avaliado o padrão de distribuição dos dados pelo programa SPSS (Statistical Packages for the Social Sciences), os dados foram considerados não-paramétrico. Devido ao pequeno tamanho amostral, os resultados de expressão gênica nos grupos HPB e CaP foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney, mas optamos por uma análise descritiva

através dos dados de RQ log 2. Para os resultados de imunohistoquímica realizamos uma análise descritiva através da interpretação das lâminas feita pelo patologista.

#### **Local de realização do projeto:**

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, lotado no Departamento de Fisiologia, na UFRGS, no Centro de Terapia Gênica, Patologia Experimental e Unidade de Análise Molecular e Protéica (UAMP), instalados no Centro de Pesquisa no HCPA, que dispõem da infra-estrutura para a execução dos procedimentos utilizados neste projeto.

#### **Fontes de financiamento**

Este projeto recebeu recursos financeiros das seguintes agências de fomento: FIPE-HCPA, CNPq, CAPES e FAPERGS.

#### **Descarte de resíduos:**

Após os experimentos, os resíduos foram acondicionados em sacos brancos, fechados, lacrados e identificados como resíduo biológico de tamanho adequado com todas as informações requeridas foi entregues ao serviço de coleta competente licitado pela UFRGS.

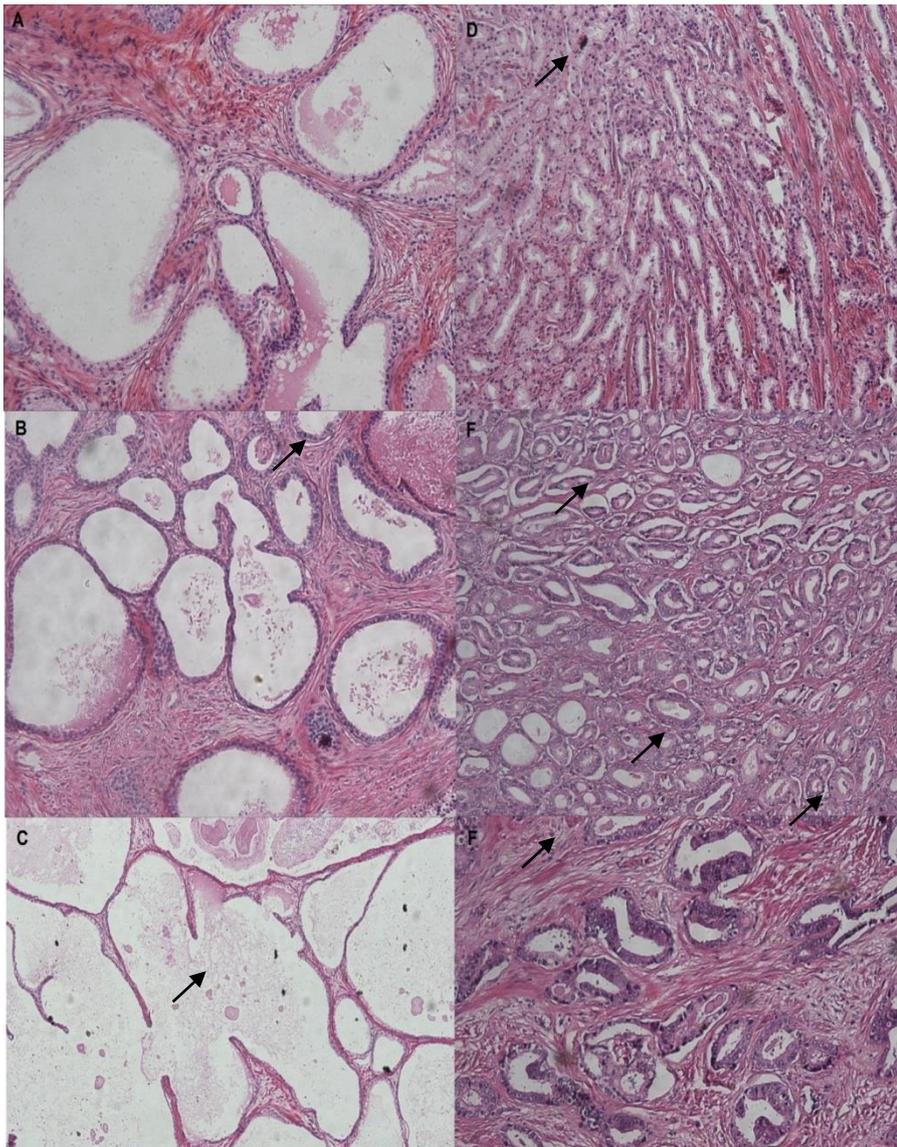
## Resultados

As características principais das amostras estudadas estão dispostas na tabela 2. A média de idade (média, desvio padrão) não foi diferente entre os grupos, 79,33 (6,42) para o grupo HPB e 71 (6,66) para o grupo CaP ( $P= 0,191$ ). A média da dosagem sérica de PSA pré-operatório foi de 25,86 (12,68)ng/dL no CaP, sendo que não foram obtidos os valores do grupo HPB e a média do peso da próstata foi obtida somente do grupo HPB, sendo esta de 135g (50). O escore de Gleason (avalia a graduação histológica das células tumorais), estadiamento tumoral (extensão do tumor) e recidiva bioquímica foram avaliadas somente no grupo CaP. Das 3 amostras de CaP, 1 (33,3%) apresentou Gleason 7 (3+4) e 2 (66,6%) amostras apresentaram o Gleason 7 (4+3). No entanto, a microdissecção foi realizada em todas as amostras em áreas em que o Gleason 3 era predominante. Quanto ao estadiamento, 2 (66,6%) amostras foram classificadas como pT3a que indica que o tumor primário se estende para além da próstata, mas não para as vesículas seminais e uma amostra (33,3%) apresentou estadiamento pT3b, ou seja, já se disseminou para a vesícula seminal. Já no que se refere à recidiva bioquímica, nenhum dos pacientes recidivaram, ou seja, apresentaram em 2 dosagens de PSA pós-operatório com valores  $\geq 0,2$  ng/dL após 6 meses da data da cirurgia.

**Tabela 2.** Características das amostras do estudo

	<b>HPB (n=3)</b>	<b>CaP (n=3)</b>	<b>Valor- P</b>
<b>Idade (média, desvio)</b>	79,33 (6,42)	71 (6,66)	0,191
<b>PSA pré-operatório</b>	-	25,86 (12,68)	-
<b>Peso da peça (g)</b>	135g (50)	-	-
<b>Score de Gleason</b>			
<b>Gleason 7 (3+4)</b>	33,3 % (n=1)	33,3 % (n=1)	-
<b>Gleason 7 (4+3)</b>		66,6% (n=2)	-
<b>Estadiamento</b>			
<b>pT3a</b>		66,6% (n=2)	-
<b>pT3b</b>		33,3 % (n=1)	-
<b>Recidiva</b>			
<b>Não</b>		100%	-

Na figura 7 são apresentadas as amostras utilizadas no estudo. Na primeira coluna, encontram-se as amostras do grupo HPB e na segunda coluna estão representadas as amostras do grupo CaP. Essas amostras foram microdissecadas sendo utilizadas no estudo somente as células epiteliais da camada luminal e basal (demarcadas pelas setas) que compõem a glândula prostática hiperplásica e as células luminiais (demarcadas pelas setas) que compõem a glândula tumoral. Foram utilizadas somente células epiteliais, pois o CaP acontece nesse tipo celular, e portanto, com a microdissecção é possível a obtenção de uma amostra homogênea e pura o que dá mais credibilidade aos resultados.



**Figura 7.** Lâminas de HE das amostras do estudo. Em A, B e C amostras de HPB e em D, E e F amostras de CaP. As setas indicam as células epiteliais que foram isolados das células estromais e utilizadas no trabalho.

Dentre os 96 genes analisados no ensaio TaqMan® ArrayHumanAndrogens, possuíamos 4 genes candidatos a normalizadores. Estes genes são assim chamados, pois tendem a apresentar expressão constante em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento, não sendo afetados por condições experimentais. O teste para identificar qual o melhor candidato a normalizador foi realizado através do algoritmo NormFinder, que calcula o valor de estabilidade para cada candidato a normalizador, testados

dados em um conjunto de amostras contendo qualquer número de amostras. A estabilidade dos genes é apresentada como valor de estabilidade e os genes que possuem menor valor são os que possuem maior estabilidade na expressão. Assim, conforme o resultado obtido em nosso estudo, o gene que apresentou a maior estabilidade na expressão foi o gene GAPDH (0,014), seguido dos genes GUSB (0,042) e 18s (0,060) (Tabela 3). Além disso, optamos por usar o gene GAPDH como normalizador, pois este é descrito por Mori e colaboradores como um bom gene de referência em estudos de expressão gênica de CaP (Mori, Wang et al. 2008). O gene HPRT não apresentou expressão em algumas amostras do estudo; portanto, foi desconsiderado para esta análise.

**Tabela 3.** Valor de estabilidade de genes candidatos a normalizadores apresentado pelo programa NormFinder.

<b>Gene</b>	<b>ID gene</b>	<b>Nome do gene</b>	<b>Valor de estabilidade</b>
<b>GAPDH</b>	2597	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	0,014
<b>GUSB</b>	2990	<i>glucuronidase beta</i>	0,042
<b>18s</b>		<i>18S ribosomal RNA</i>	0,060

Após escolhido o gene normalizador, as amostras de ambos os grupos amplificadas através da técnica de RT-qPCR foram analisadas através do software DataAssist™. Dos 92 genes analisados no ensaio, 17 apresentaram expressão somente no grupo CaP, sendo eles AIG1, APPL1, BRCA1, BRCA2, CDC25B, ESR2, HSD17B3, HSD17B8, IL8, MED17, MED24, PAK6, PIM1, POR, SHH, SOAT1, WDR19. Todos estão representados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Genes com expressão somente no grupo CaP

<b>Gene</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Nome do gene</b>
<b>AIG1</b>	51390	<i>Androgeninduced 1</i>
<b>APPL1</b>	26060	<i>Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1</i>
<b>BRCA1</b>	672	<i>BRCA1, DNA repair associated</i>
<b>BRCA2</b>	675	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>
<b>CDC25B</b>	994	<i>Cell division cycle 25B</i>
<b>ESR2</b>	2100	<i>Estrogen receptor 2</i>
<b>HSD17B3</b>	3293	<i>Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3</i>
<b>HSD17B8</b>	7923	<i>Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 8</i>
<b>IL8</b>	3576	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8</i>
<b>MED17</b>	9440	<i>Mediator complex subunit 17</i>
<b>MED24</b>	9862	<i>Mediator complex subunit 24</i>
<b>PAK6</b>	56924	<i>p21 (RAC1) activated kinase 6</i>
<b>PIM1</b>	5292	<i>Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
<b>POR</b>	5447	<i>Cytochrome p450 oxidoreductase</i>
<b>SHH</b>	6469	<i>Sonic hedgehog</i>
<b>SOAT1</b>	6646	<i>Sterol O-acyltransferase 1</i>
<b>WDR19</b>	57728	<i>WD repeat domain 19</i>

Um total de 47 genes apresentaram expressão em ambos os grupos, sendo possível a realização de uma análise comparativa da expressão gênica a partir dos valores de  $2^{-\Delta Ct}$  para obtenção do FoldChange (RQ). Destes 47 genes, 7 (MED13, SPDEF, RDH11, CALR, NKX3-1, KLK4 e PMEPA1) apresentaram expressão maior no grupo CaP quando comparado ao grupo HPB, sendo que nenhum deles apresentou diferença estatística significativa. Os outros 40 genes apresentaram expressão diminuída no grupo CaP quando comparado ao grupo HPB. Os resultados estão apresentados como RQ log 2 na Tabela 5, sendo os valores positivos indicativos da expressão elevada dos genes no grupo CaP em relação ao grupo HPB e os valores negativos da expressão reduzida dos genes no grupo CaP em relação ao grupo HPB, sendo a significância exata  $P > 0,05$  em todos os casos.

**Tabela 5.** Expressão gênica no tecido tumoral em relação ao tecido hiperplásico

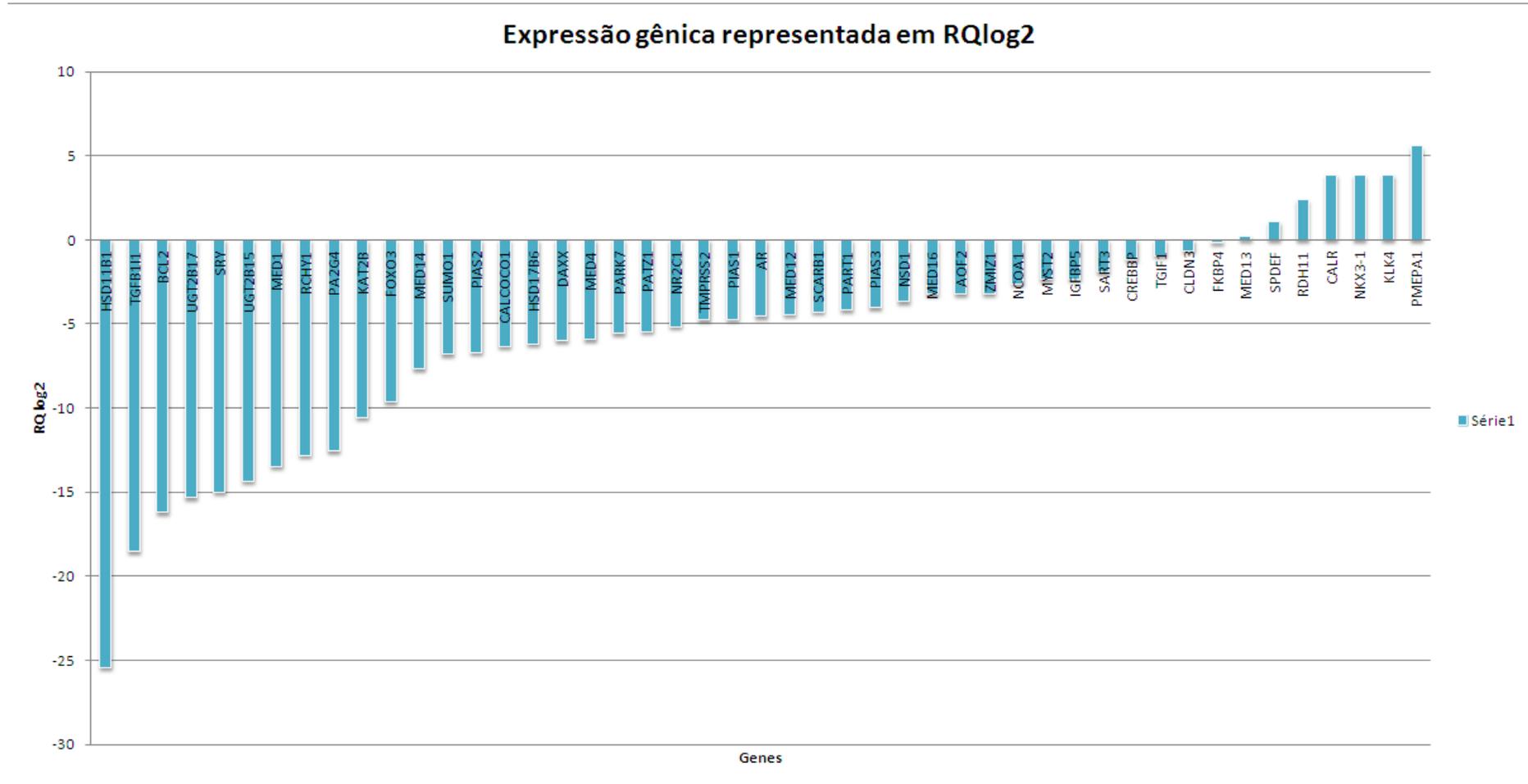
Gene	Gene ID	Nome do gene	RQ log2	P value
<b>HSD11B1</b>	3290	<i>hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1</i>	-25,4289	0,100
<b>TGFB1I1</b>	7041	<i>transforming growth factor beta 1 induced transcript 1</i>	-18,5435	0,100
<b>BCL2</b>	596	<i>BCL2, apoptosis regulator</i>	-16,2258	0,100
<b>UGT2B17</b>	7367	<i>UDP glucuronosyl transferase family 2 member B17</i>	-15,3562	0,100
<b>SRY</b>	21674	<i>sex determining region of Chr Y</i>	-15,0136	0,100
<b>UGT2B15</b>	7366	<i>UDP glucuronosyltransferase family 2 member B15</i>	-14,3647	0,100
<b>MED1</b>	5469	<i>Mediator complex subunit 1</i>	-13,4803	0,100
<b>RCHY1</b>	25898	<i>ring finger and CHY zinc finger domain containing 1</i>	-12,8341	0,100
<b>PA2G4</b>	5036	<i>proliferation-associated 2G4</i>	-12,5631	0,100
<b>KAT2B</b>	8850	<i>lysine acetyltransferase 2B</i>	-10,5624	0,100
<b>FOXO3</b>	2309	<i>forkhead box O3</i>	-9,63124	0,100
<b>MED14</b>	9282	<i>mediator complex subunit 14</i>	-7,68913	0,100
<b>SUMO1</b>	7341	<i>small ubiquitin-like modifier 1</i>	-6,82686	0,100
<b>PIAS2</b>	9063	<i>protein inhibitor of activated STAT 2</i>	-6,69756	0,100
<b>CALCOCO 1</b>	57658	<i>calcium binding and coiled-coil domain 1</i>	-6,34006	0,100
<b>HSD17B6</b>	8630	<i>hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 6</i>	-6,20473	0,400
<b>DAXX</b>	1616	<i>Death domain associated protein</i>	-6,0203	0,100
<b>MED4</b>	29079	<i>mediator complex subunit 4</i>	-5,93316	0,200
<b>PARK7</b>	11315	<i>Parkinsonism associated deglycase</i>	-5,58457	0,400
<b>PATZ1</b>	23598	<i>POZ/BTB and AT hook containing zinc finger 1</i>	-5,44871	0,400
<b>NR2C1</b>	22025	<i>nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1</i>	-5,16251	0,100
<b>TMPRSS2</b>	7113	<i>transmembrane protease, serine 2</i>	-4,76088	0,400
<b>PIAS1</b>	8554	<i>protein inhibitor of activated STAT 1</i>	-4,72213	0,400
<b>AR</b>	367	<i>androgen receptor</i>	-4,5697	0,100
<b>MED12</b>	9968	<i>mediator complex subunit 12</i>	-4,44827	0,100
<b>SCARB1</b>	20778	<i>scavenger receptor class B, member 1</i>	-4,29131	0,700
<b>PART1</b>	25859	<i>prostate androgen-regulated transcript 1</i>	-4,18247	0,400
<b>PIAS3</b>	10401	<i>protein inhibitor of activated STAT 3</i>	-4,04557	0,700
<b>NSD1</b>	64324	<i>nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>	-3,69758	1,000
<b>MED16</b>	10025	<i>mediator complex subunit 16</i>	-3,23784	0,700
<b>AOX2</b>	5724032	<i>Amine oxidoreductase</i>	-3,22591	0,700
<b>ZMIZ1</b>	57178	<i>zinc finger MIZ-type containing 1</i>	-3,21401	0,700
<b>NCOA1</b>	8648	<i>nuclear receptor coactivator 1</i>	-2,60651	1,000
<b>MYST2</b>	425530	<i>MYST histone acetyltransferase 2</i>	-2,37095	0,700
<b>IGFBP5</b>	3488	<i>insulin like growth factor binding protein 5</i>	-2,33137	0,700
<b>SART3</b>	9733	<i>squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3</i>	-1,92669	0,700
<b>CREBBP</b>	1387	<i>CREB binding protein</i>	-1,19183	0,700
<b>TGIF1</b>	7050	<i>TGFB induced factor homeobox 1</i>	-0,93649	1,000

<b>CLDN3</b>	1365	<i>claudin 3</i>	-0,64082	0,700
<b>FKBP4</b>	2288	<i>FK506 bindingprotein 4</i>	-0,19198	1,000
<b>MED13</b>	9969	<i>mediatorcomplexsubunit 13</i>	0,210882	1,000
<b>SPDEF</b>	25803	<i>SAM pointed domain containing ETS transcription factor</i>	1,072376	0,700
<b>RDH11</b>	51109	<i>retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)</i>	2,367119	1,000
<b>CALR</b>	811	<i>Calreticulin</i>	3,855246	0,400
<b>NKX3-1</b>	724098 2	<i>nkhmeobox 3</i>	3,86203	0,700
<b>KLK4</b>	9622	<i>Kallikrein related peptidase 4</i>	3,867695	1,000
<b>PMEPA1</b>	56937	<i>prostate transmembrane protein, androgen induced</i> 1	5,55736	1,000

A figura 8 mostra os mesmos resultados de expressão gênica por RG log<sub>2</sub>, sendo novamente os valores positivos considerados como expressão maior no grupo CaP em relação ao grupo HPB e os valores negativos expressão menor no grupo CaP em relação ao grupo HPB.

Dentre estes 47 genes, encontramos o AR, gene mais envolvido no desenvolvimento tumoral. Os resultados de expressão deste gene mostram a expressão diminuída deste gene no grupo CaP em relação ao grupo HPB. Mesmo esta expressão não sendo estatisticamente significativa, este resultado pode ser esperado pelo que já é descrito na literatura de mutações no AR e por mecanismos que interferem na sinalização do AR a fim de conter a progressão tumoral. Os demais genes também não apresentaram diferença significativa, o que provavelmente se dá devido ao pequeno número amostral. No entanto, foi possível ter uma ideia de como estes genes se apresentam em ambos os grupos.

**Figura 8.** Resultado da expressão gênica apresentados em RQlog2 Os valores negativos representam expressão reduzida no grupo CaP em relação ao grupo HPB e as valores positivos representam expressão aumentada no grupo CaP em relação ao grupo HPB.



Além disso, encontramos alguns genes que não apresentaram uma expressão homogênea em nenhum dos grupos, ou seja, a expressão até foi registrada; no entanto, não em todas as amostras do grupo. Assim, não foi possível analisar a expressão das mesmas. Estes genes estão identificados na tabela 6.

**Tabela 6** Genes que não foi possível realizar análise estatística

Gene	Gene ID	Nome do gene
<b>ESR1</b>	2099	<i>estrogen receptor 1</i>
<b>IL6</b>	3569	<i>interleukin 6</i>
<b>NCOA2</b>	10499	<i>nuclear receptor coactivator 2</i>
<b>NCOA4</b>	8031	<i>nuclear receptor coactivator 4</i>
<b>PDS5B</b>	23047	<i>PDS5 cohesin associated factor B</i>
<b>SRD5A1</b>	6715	<i>steroid 5 alpha-reductase 1</i>
<b>SRD5A2</b>	6716	<i>steroid 5 alpha-reductase 2</i>

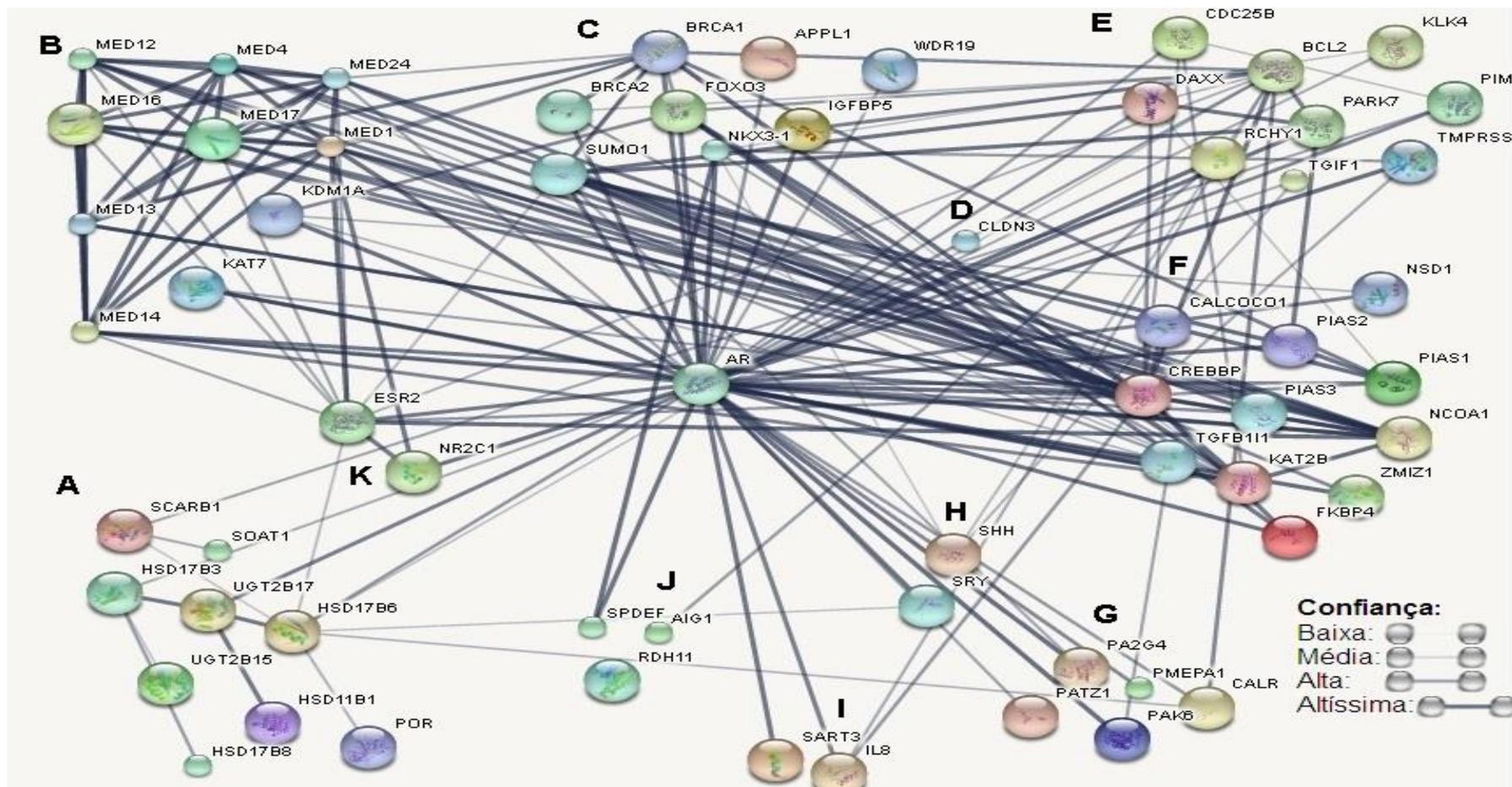
Do mesmo modo, encontramos a ausência de expressão de alguns genes nos grupos estudados, como exemplo o HSD3B1 já descrito na literatura como ausentes em tecido prostático. Além disso, é possível que alguns possam ser expressos, mas em uma quantidade tão reduzida que não foi possível fazer a amplificação gênica através da técnica. Estes genes estão descritos na tabela 7.

**Tabela 7** Genes que não apresentaram expressão em ambos os grupos

Gene	Gene ID	Nome do gene
<b>AKR1C4</b>	1109	<i>aldo-keto reductase family 1 member C4</i>
<b>BMX</b>	660	<i>BMX non-receptor tyrosine kinase</i>
<b>CRISP1</b>	167	<i>cysteine rich secretory protein 1</i>
<b>CYP11A1</b>	1583	<i>cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1</i>
<b>CYP11B1</b>	1584	<i>cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1</i>
<b>CYP19A1</b>	1588	<i>cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1</i>
<b>CYP21A1</b>		<i>cytochrome P450 family 21 subfamily A member 1</i>
<b>DHRS9</b>	10170	<i>dehydrogenase/reductase 9</i>
<b>FGF8</b>	2253	<i>fibroblast growth factor 8</i>
<b>GPX5</b>	2880	<i>glutathione peroxidase 5</i>
<b>GRP</b>	2922	<i>gastrin releasing peptide</i>
<b>HSD3B1</b>	3283	<i>hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1</i>
<b>IL4</b>	3565	<i>interleukin 4</i>

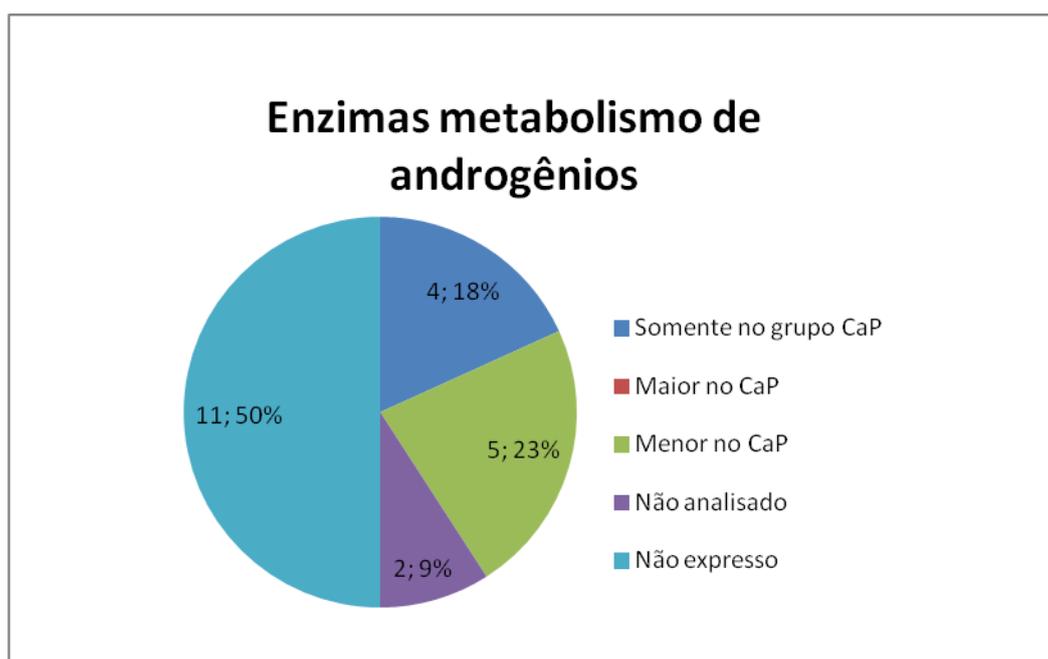
<b>INFG</b>	3458	<i>interferon gamma</i>
<b>SHBG</b>	6462	<i>sex hormone binding globulin</i>
<b>STS</b>	412	<i>steroidsulfatase (microsomal), isozyme S</i>
<b>SPAG11B</b>	10407	<i>sperm associated antigen 11B</i>
<b>TGM4</b>	7047	<i>transglutaminase 4</i>
<b>UGT1A8</b>	54576	<i>UDP glucuronosyltransferase family 1 member A8</i>
<b>UGT2A1</b>	10941	<i>UDP glucuronosyltransferase family 2 member A1 complex locus</i>
<b>UGT2B7</b>	7364	<i>UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7</i>

Dos genes que apresentaram expressão somente no grupo CaP e os que foram possíveis de serem analisados, criamos uma rede de interação proteica através do software STRING: functional protein association networks. Neste é possível a criação da rede de acordo com dados de revisões, experimentos, bancos de dados, co-expressão, vizinhança, fusão de genes e co-ocorrência arquivados no PubMed. A espessura das linhas indica a força de suporte dos dados e o score mínimo requerido de interação escolhido foi de média confiança (0.400), sendo os demais scores também presentes na rede, alta confiança (0.700) e altíssima confiança (0.900). Referente ao tamanho dos nodos representados, os nós pequenos representam proteínas que ainda não tem a estrutura 3D identificada e os nós grandes proteínas que já apresentam a estrutura 3D identificada. As interações mostradas na figura 9) estão organizadas em clusteres de acordo com as funções destes genes, em A, encontramos enzimas que participam do metabolismo dos androgênios; em B, proteínas que atuam como fatores de transcrição; em C, proteínas que atuam como reguladores negativos da proliferação celular; em D, a proteína CLDN3 que participa do processo de tumorigênese e invasão; em E, proteínas que atuam como reguladores positivos da proliferação celular; em F, coativadores do AR; em G, correpressores, em H, proteínas envolvidas na reprodução masculina, em I, mediadores da resposta imune; em J, proteínas codificadas por genes regulados pelo AR e em K, receptores hormonais.



**Figura 9.** Rede de proteínas construída pelo programa String, separados de acordo com a função. A)enzimas que participam do metabolismo dos androgênios; B) moduladores da transcrição; C,reguladores negativos da proliferação celular; D,tumorigênese e invasão;E) reguladores positivos da proliferação celular; F) coativadores do AR; G) correpressores; H)reprodução masculina; I) mediadores da resposta imune; J)genes regulados pelo AR; K) receptores hormonais. A espessura das linhas indica o nível de confiança das interações.

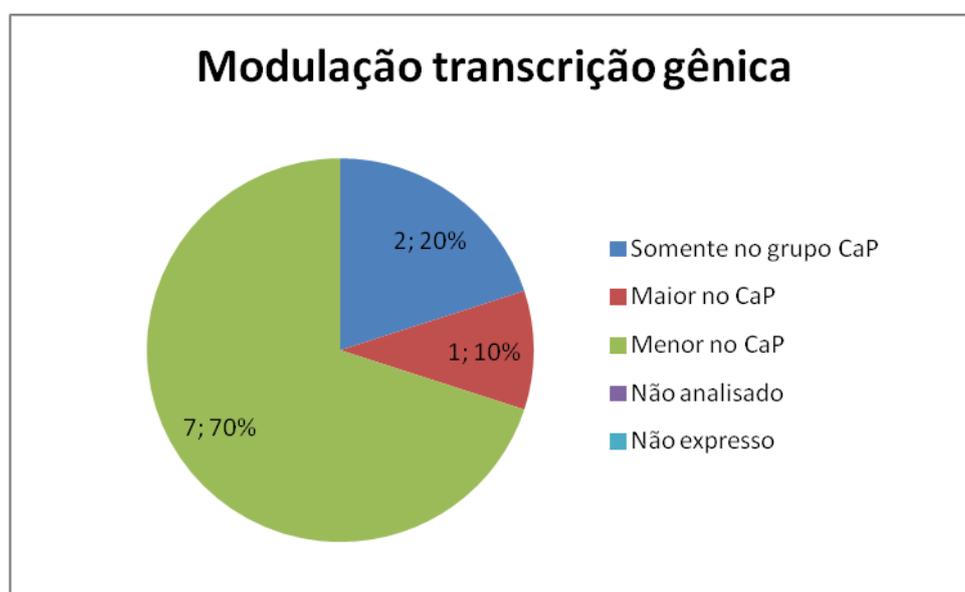
Apresentando os resultados obtidos de expressão gênica de acordo com a função dos genes demonstrada na figura 6, dos genes que codificam enzimas que participam de alguma forma no metabolismo de androgênios, 4 (18%) genes foram expressos somente no grupo CaP sendo eles POR, SOAT1, HSD17B3 e HSD17B8, 5 (23%) genes apresentaram menor expressão no grupo CaP (HSD11B1, HSD17B6, SCARB1, STS, UGT2B15 E UGT2B17), 2 (9%) genes não tiveram expressão analisada devido a ausência de expressão em todas as amostras dos grupos (SRD5A1 e SRD5A2) e 11 (50%) dos genes não apresentaram expressão em nenhum dos grupos (AKR1C4, CYP11A1, CYP11B1, CYP19A1, CYP21A2, DHRS9, HSD3B1, UGT1A8, UGT2A1 e UGT2B7) (Figura 10).



**Figura 10.** Enzimas do metabolismo de androgênios. Expressão de genes relacionados ao metabolismo de androgênios, em azul escuro genes expressos somente no grupo CaP, em verde genes com menor expressão no grupo CaP, em roxo genes não analisados e em azul claro genes não expressos em nenhum dos grupos.

Dentre os genes que participam da modulação da transcrição gênica, analisamos genes que são responsáveis no recrutamento da maquinaria da transcrição gênica, como também genes que promovem a acetilação de

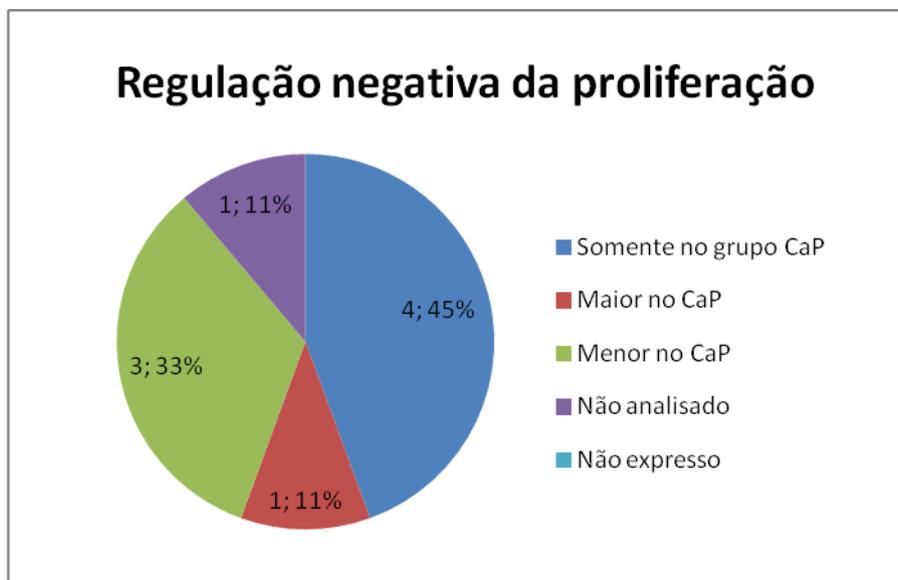
histonas. Dos 10 genes analisados, 2 (20%) apresentaram expressão somente no grupo CaP (MED17 e MED24), 1 (10%) gene apresentou expressão maior no grupo CaP (MED13) e 7 (70%) apresentaram expressão em ambos os grupos, sendo esta expressão menor no grupo CaP (AOF2, MED1, MED12, MED14, MED16, MED4 e MYST2) (Fig11).



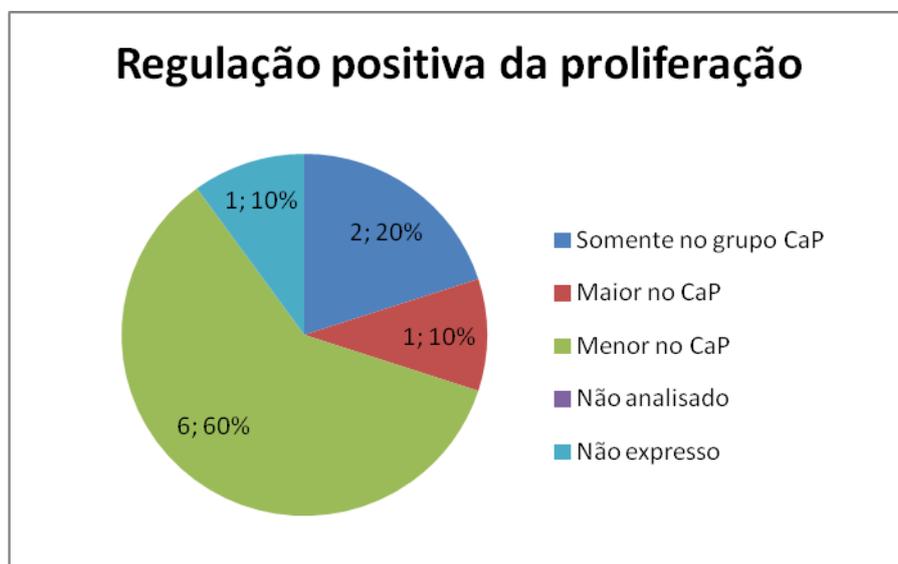
**Figura 11.** Modulação da transcrição gênica. Expressão de genes que participam da modulação da transcrição gênica. Em azul escuro genes expressos somente no grupo CaP, em vermelho genes com maior expressão no grupo CaP e em verde genes com menor expressão no grupo CaP,

Dos genes responsáveis em promover a regulação da proliferação celular analisamos genes que favorecem a proliferação (regulação positiva) e genes que controlam negativamente a proliferação celular (regulação negativa). Dentre os 9 genes que promovem a regulação negativa, 4 (45%) genes apresentaram expressão somente no grupo CaP (APPL1, BRCA1, BRCA2 e WDR19), 1 (11%) gene apresentou expressão maior no grupo CaP (NKX3-1), 3 (33%) genes apresentaram expressão menor no grupo CaP (FOXO3, IGFBP5 e SUMO1) e 1 (11%) gene não foi analisado (PDSB5) (Fig 12). Já dentre os 10 reguladores positivos da proliferação celular, 2 (20%) foram expressos somente no grupo CaP (CDC25B e PIM1), 1 (10%) teve maior expressão no grupo CaP (KLK4), 6 (60%) genes tiveram menor expressão no grupo CaP (BCL2, DAXX,

PARK7, RYCH1, TGIF E TMPRSS2) e 1 (10%) gene não teve expressão em nenhum dos grupos (GRP) (Figura 13).

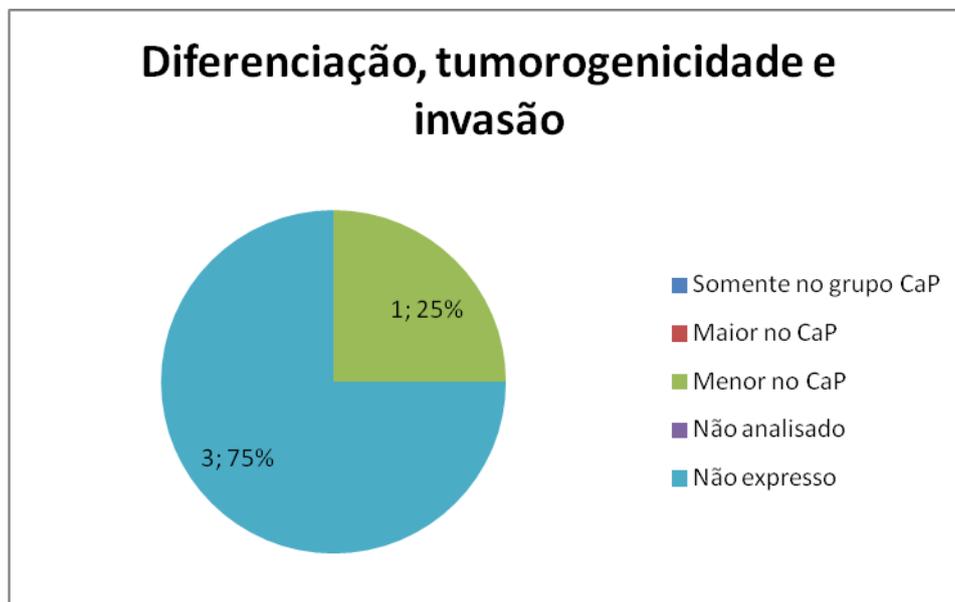


**Figura 12.** Regulação negativa da proliferação. Expressão de genes que atuam na regulação negativa da proliferação celular. Em azul escuro genes expressos somente no grupo CaP, em vermelho genes com maior expressão no grupo CaP, em verde genes com menor expressão no grupo CaP e em roxo genes não analisados.



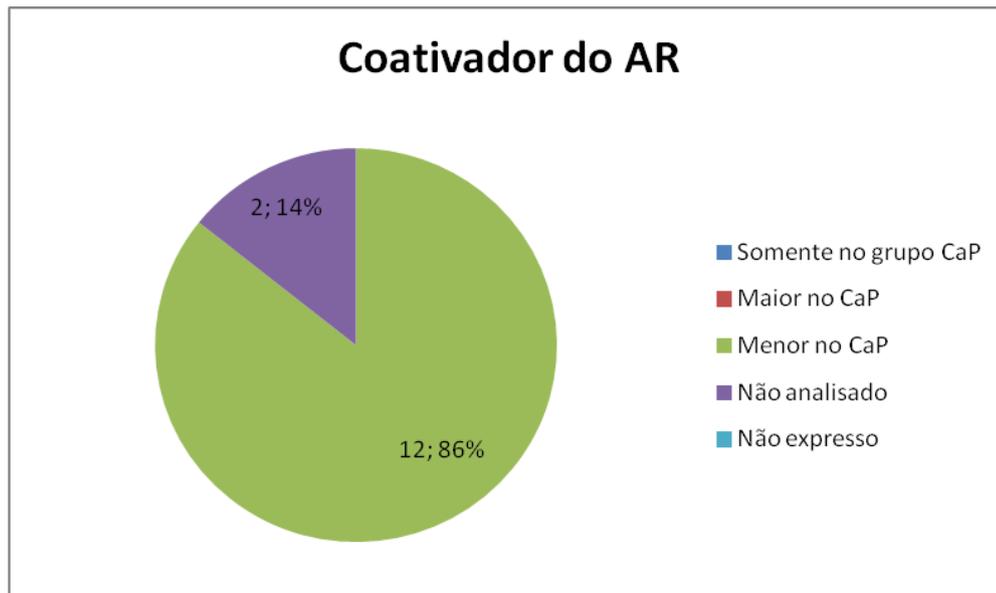
**Figura 13.** Regulação positiva da proliferação. Expressão de genes que atuam na regulação positiva da proliferação celular. Em azul escuro genes expressos somente no grupo CaP, em vermelho genes com maior expressão no grupo CaP, em verde genes com menor expressão no grupo CaP e em azul claro genes não expressos em nenhum dos grupos.

Dos genes que codificam proteínas que estão envolvidas com diferenciação, tumorigenicidade e invasão, 1(25%) teve expressão menor no grupo CaP (CLDN3) e 3 (75%) genes não foram expressos em nenhum dos grupos (BMX, FGF8 e TGM4) (Figura 14).

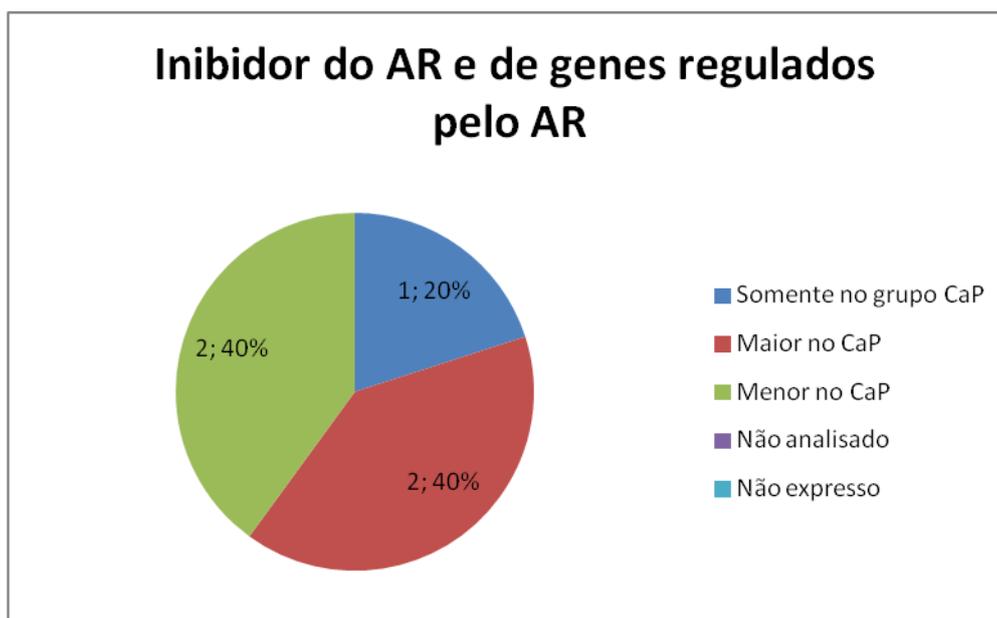


**Figura 14.** Diferenciação, tumorigenicidade e invasão. Expressão de genes que atuam na diferenciação, tumorigenicidade e invasão celular. Em verde genes com menor expressão no grupo CaP e em azul claro genes não expressos em nenhum dos grupos.

Os genes que codificam proteínas que são consideradas coativadoras do AR, 12 (86%) genes tiveram expressão menor no grupo CaP quando comparado à HPB (CALCOCO1, CREBBP, FKBP4, KAT2B, NCOA1, NCOA2, NCOA4, PIAS1, PIAS2, PIAS3, TGFB111, ZMIZ1, NSD1) e 2 (14%) dos genes não foram analisados (NCOA2, e NCOA4) (Figura 15). Dos 5 genes considerados inibidores do AR ou de genes regulados pelo AR, 1 gene (20%) apresentou expressão somente no grupo CaP (PAK6), 2 (40%) apresentaram expressão maior no grupo CaP (CALR e PMEPA) e 2 (40%) apresentaram expressão menor no grupo CaP (PA2G4 e PATZ1) (Figura 16).



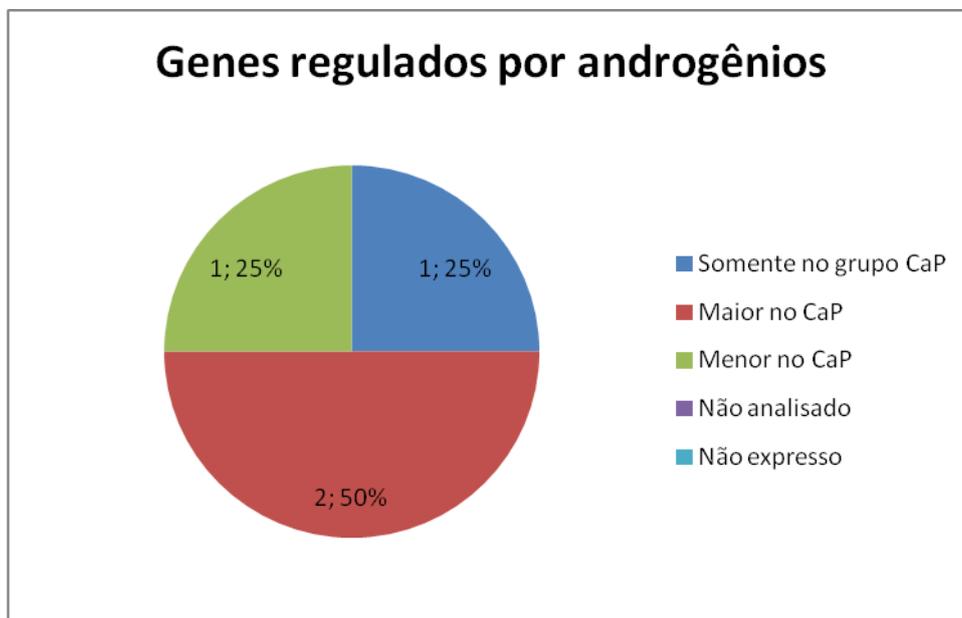
**Figura 15.**Coativadores do AR. Expressão de genes considerados coativadores do AR. Em verde genes com menor expressão no grupo CaP e em roxo genes não analisados.



**Figura 16.**Inibidores do AR e de genes regulados pelo AR. Expressão de genes inibidores do AR ou inibição de genes regulados pelo AR. Em azul escuro genes expressos somente no grupo CaP, em vermelho genes com maior expressão no grupo CaP e em verde genes com menor expressão no grupo CaP.

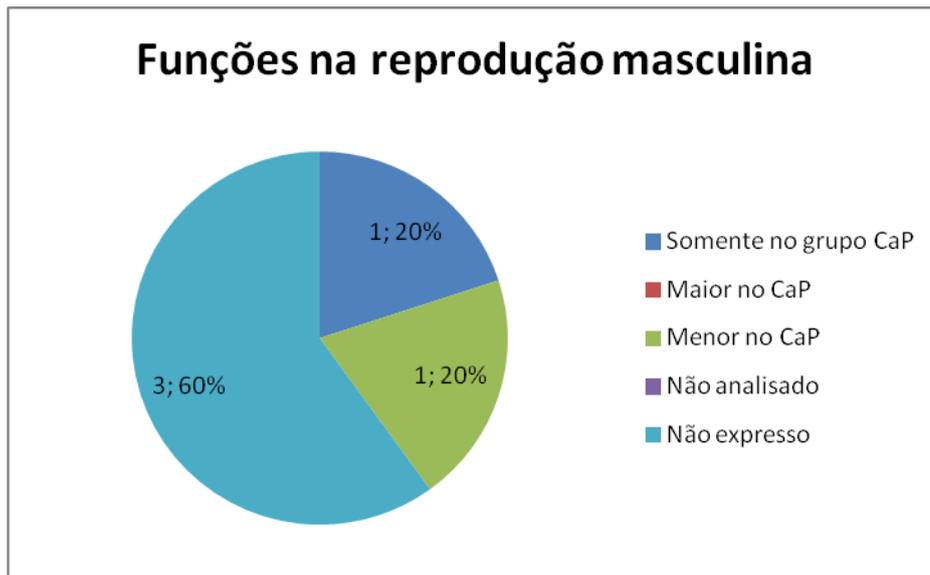
Já dos genes que apresentam expressão regulada pelo AR e androgênios, 1 gene (25%) foi expresso somente no grupo CaP (AIG1), 2

genes (50%) tiveram expressão maior no grupo CaP (RDH11 e SPDEF) e 1 (25%) gene teve expressão menor no grupo CaP (PART1) (Figura 17).



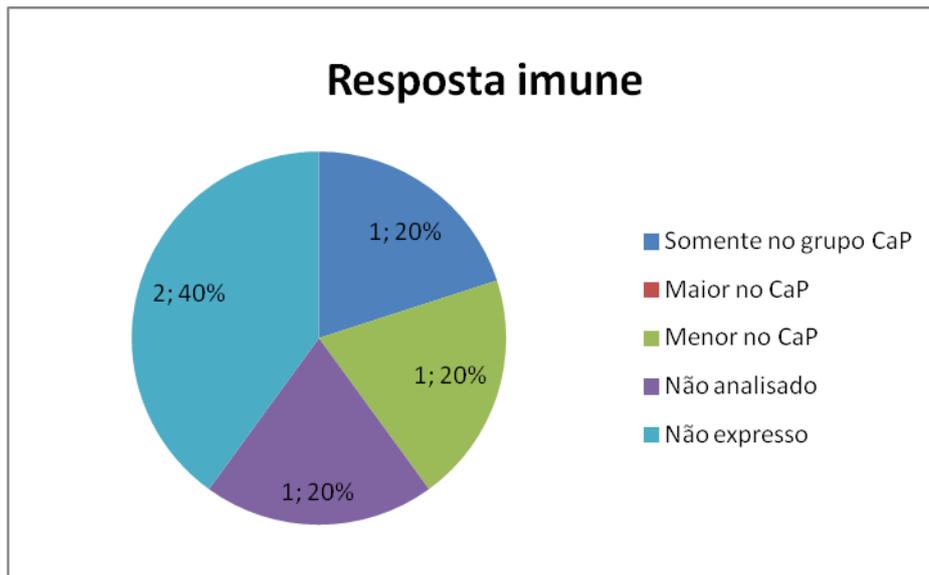
**Figura 17.** Genes regulados por androgênios. Expressão de genes regulados por androgênios. Em azul escuro genes expressos somente no grupo CaP, em vermelho genes com maior expressão no grupo CaP e em verde genes com menor expressão no grupo CaP.

No ensaio estão presentes 5 genes que são classificados por ter funções no desenvolvimento e na reprodução masculina. Destes apenas 1 (20%) gene foi expresso somente no grupo CaP (SHH), 1 gene (20%) teve expressão menor no grupo CaP (SRY) e 3 (60%) genes não foram expressos em nenhum dos grupos (CRISP1, GPX5, SPAG11B) (Figura 18).

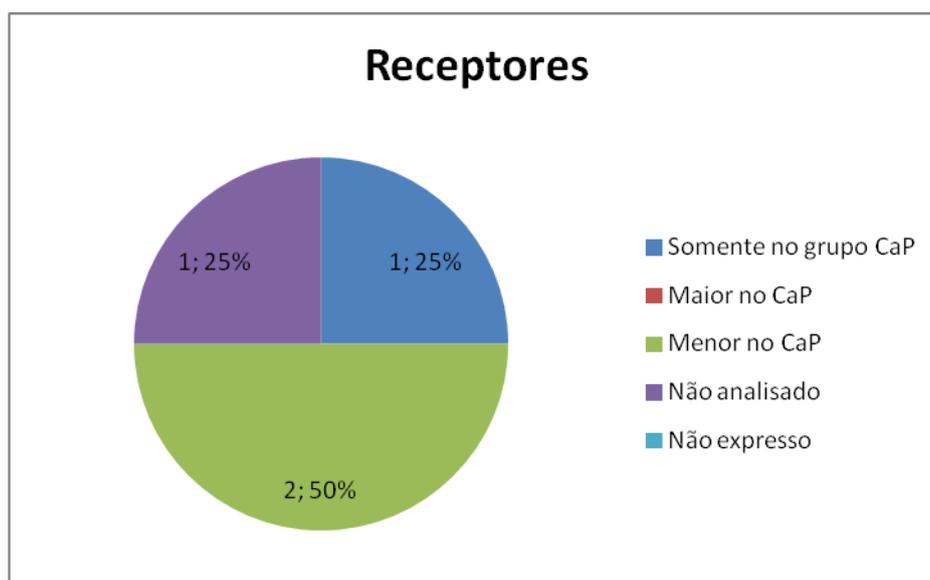


**Figura 18.** Funções na reprodução masculina. Expressão de genes com funções na reprodução masculina. Em azul escuro genes expressos somente no grupo CaP, em verde genes com menor expressão no grupo CaP, em azul claro genes não expressos em nenhum dos grupos.

Dentre os genes que tem papel na resposta imune 1(20%) gene foi expresso somente no grupo CaP (IL8), 1(20%) gene teve expressão menor no grupo CaP (SART3), 1 gene (20%) não foi analisado (IL6) e 2 (40%) genes não foram expressos (INFG e IL4) (Figura 19). Dos genes que codificam proteínas receptoras, 1 (25%) gene foi expresso somente no grupo CaP (ERS2), 2 (50%) genes tiveram menor expressão no grupo CaP (AR E NR2C1) e 1 (25%) gene não foi analisado (ERS1) (Figura 20). Por fim, o gene SHBG, proteína ligadora de hormônio presente na categoria “outra” não apresentou expressão em nenhum dos grupos.



**Figura 19.** Resposta imune. Expressão de genes envolvidos na resposta imune. Em azul escuro genes expressos somente no grupo CaP, em verde genes com menor expressão no grupo CaP, em roxo genes não analisados e em azul claro genes não expressos em nenhum dos grupos.



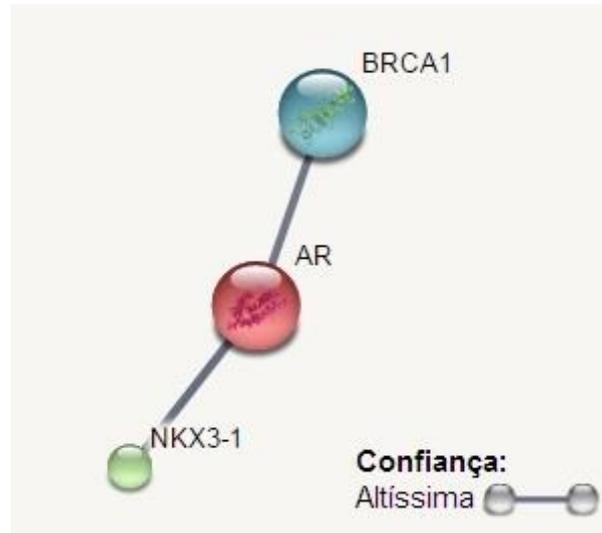
**Figura 20.** Receptores. Expressão de genes que codificam receptores. Em azul escuro genes expressos somente no grupo CaP, em verde genes com menor expressão no grupo CaP e em roxo genes não analisados

A mensuração da expressão proteica foi realizada através da técnica de imunohistoquímica para as seguintes proteínas: AR, BRCA1 e NKX3-1. A análise descritiva (Tabela 8) mostra que a 26% das células hiperplásicas do grupo HPB apresentaram positividade para o AR no núcleo com intensidade +1

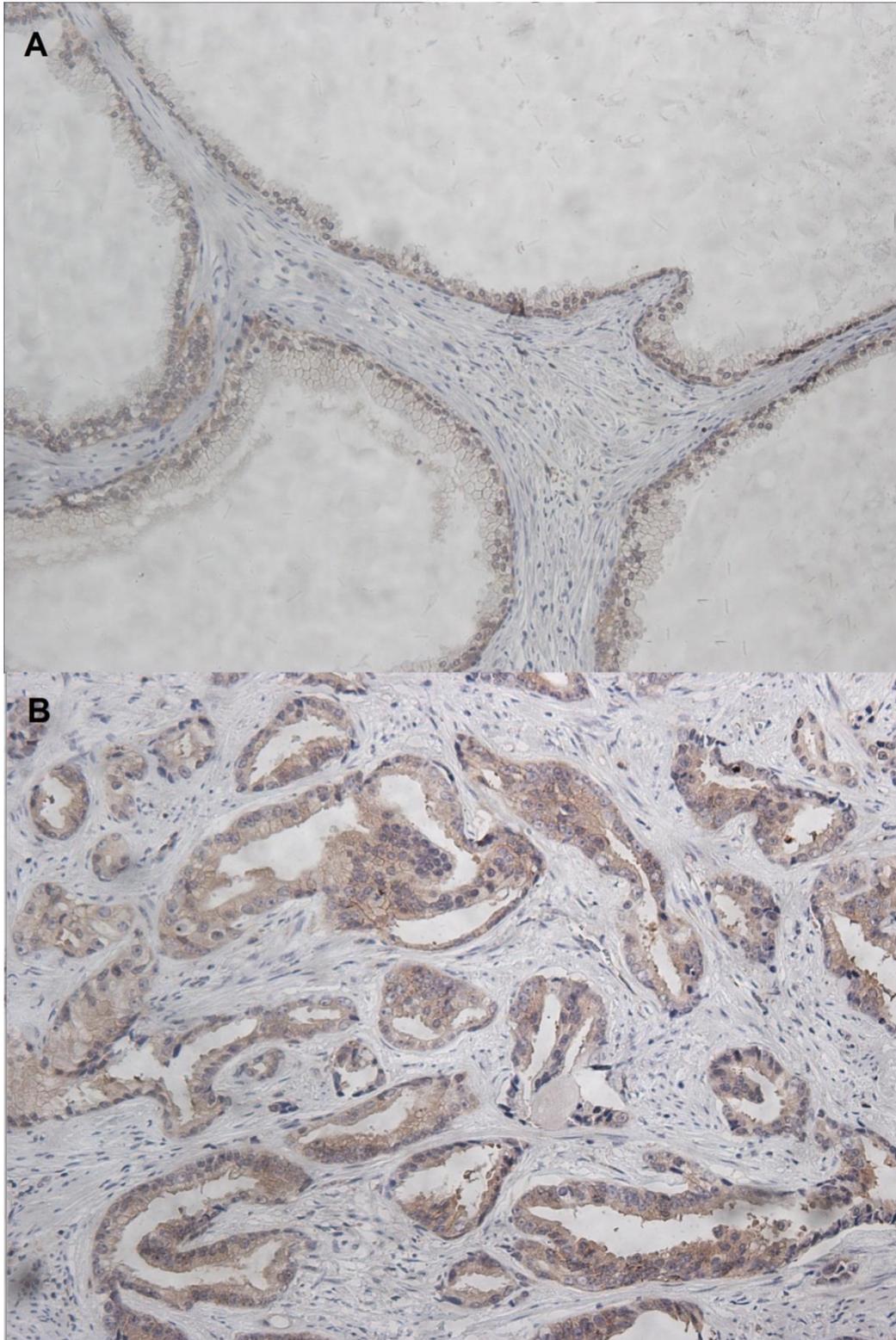
e 50% do citoplasma destas células apresentou positividade com intensidade +2. No grupo CaP, 7% das células tumorais apresentaram positividade para o AR com intensidade de +1 e 60% das células apresentavam AR no citoplasma celular com intensidade +2, ou seja a porcentagem de núcleos corados reduziu no grupo CaP em relação ao grupo HPB e a porcentagem de citoplasmas corados aumentou no grupo CaP (Figura 22). Em relação ao anticorpo BRCA1 identificamos poucas células coradas sendo 7% de células de HPB contendo o núcleo com intensidade +1 e citoplasma ausente, e 10% das células tumorais contendo coloração citoplasmática +1 e ausência de marcação nuclear (Figura 23). No caso do anticorpo NKX3-1 os resultados foram semelhantes, a porcentagem de núcleos corados com intensidade +2 em HPB foi de 70%, enquanto no CaP foi de 60%. No citoplasma, a intensidade da coloração foi de +1 em ambos o grupos sendo presente em 30% das células hiperplásicas e 76% das células tumorais (Figura 24). Além disso, foi avaliada a interação destas três proteínas através do programa String (Figura 21) e notou-se que há interação entre estas proteínas sendo o nível de confiança para estas interações altíssimo.

Tabela 8. Relação da porcentagem de células coradas no grupo HPB e CaP com a intensidade da coloração.

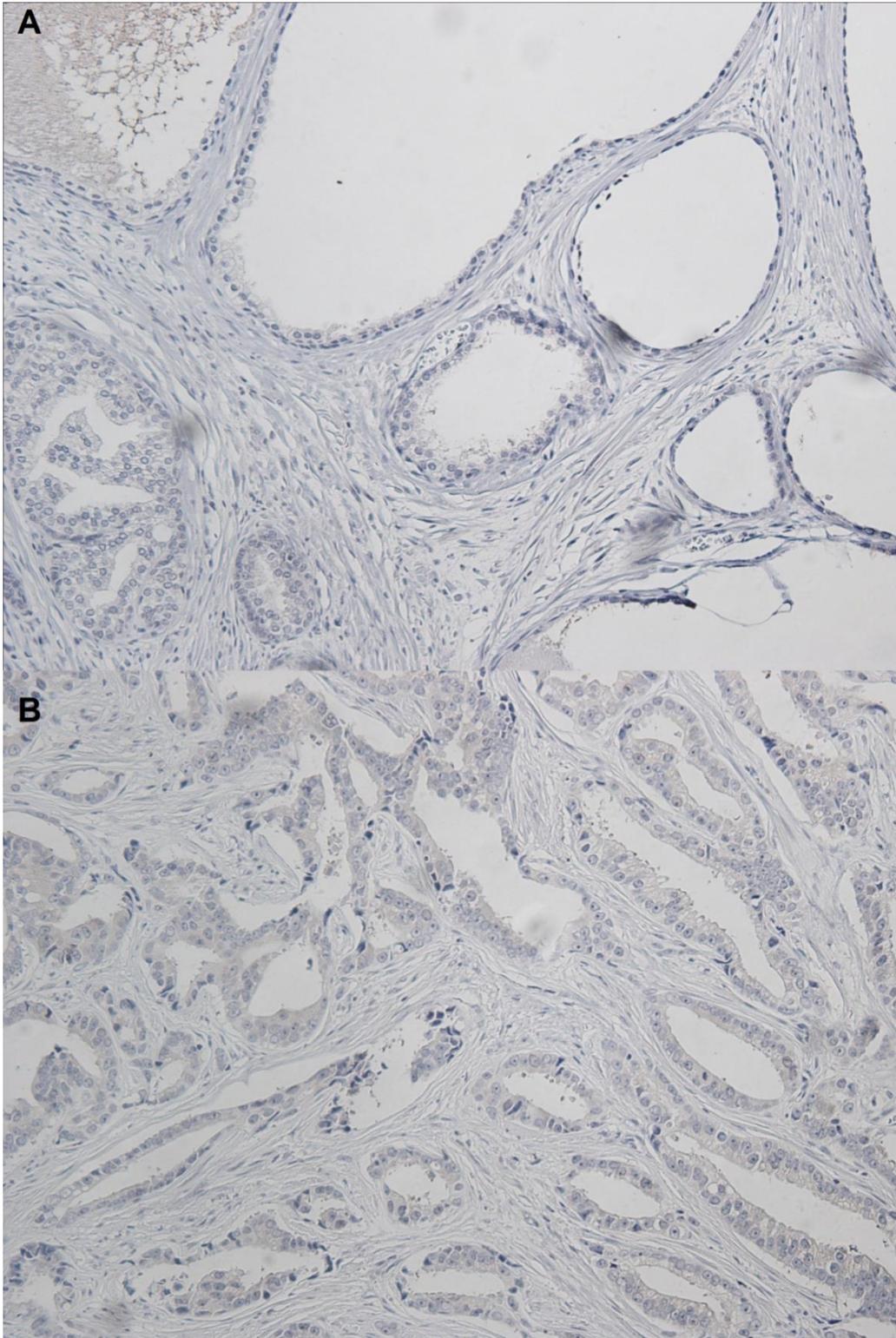
Anticorpos	HPB		CaP	
	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
AR	26% (+1)	43% (+2)	7% (+1)	60% (+2)
BRCA1	7% (+1)	Ausente	Ausente	10% (+1)
NKX3-1	77% (+2)	30% (+1)	60% (+2)	76%(+2)



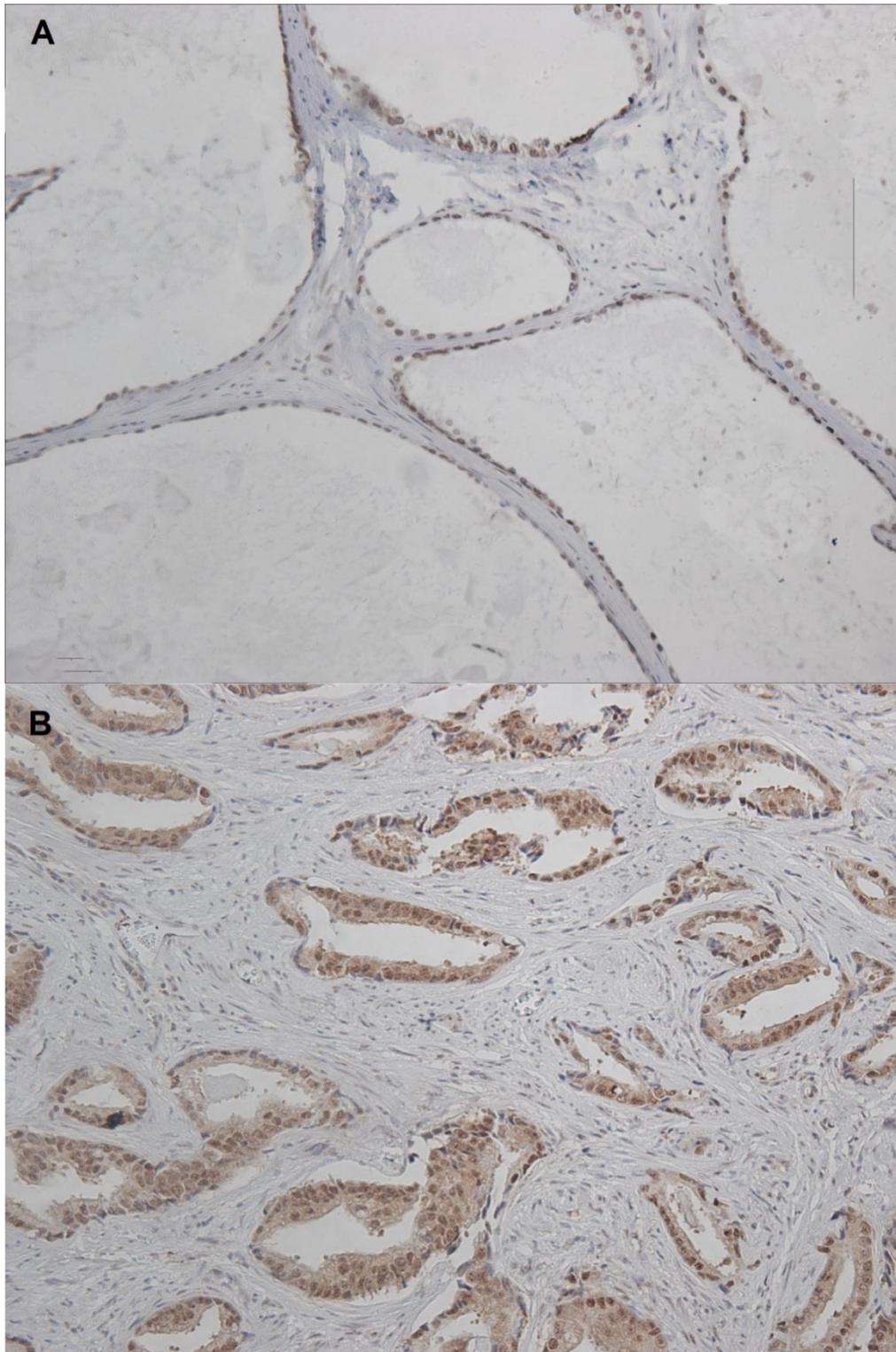
**Figura 21.** Rede das proteínas escolhidas para a mensuração da expressão proteica através de imunohistoquímica. A linha entre as proteínas indicam que estas interagem e a confiança para esta informação é altíssima.



**Figura 22.** Imunohistoquímica de AR demonstrando que o percentual nuclear positivo é maior no grupo HPB com intensidade +1(A) e percentual citoplasmático positivo com intensidade +2 é maior no grupo CaP(B).



**Figura 23.** Imunohistoquímica de BRCA1 demonstrando poucos núcleos positivos em HPB(A) e positividade citoplasmática em CaP(B).



**Figura 24.**Imunohistoquímica de NKX3-1 demonstrando que o percentual nuclear positivo é maior no grupo HPB com intensidade +2(A) e percentual citoplasmático positivo é maior no grupo CaP sendo este de intensidade +2 enquanto a intensidade de coloração em HPB é +1(B).

## Discussão

O desenvolvimento de doenças que acometem a próstata tem sido associado ao eixo de sinalização androgênica, o qual dependente do AR e dos níveis de androgênios circulantes. O mecanismo de ação dos androgênios em seus tecidos alvo é bastante complexo, no qual a ativação do receptor de androgênios induz eventos proliferativos e angiogênicos, mas por outro lado, pode induzir eventos apoptóticos. Um dos principais efeitos dos androgênios em células sensíveis ao hormônio é um aumento na atividade de cinases dependentes de ciclinas e a estimulação para as células entrarem na fase S do ciclo celular, induzindo, assim, a proliferação celular (Ntais, Polycarpou et al. 2003). Estudos envolvendo a expressão e funções do AR e seus corretores em HPB e CaP ainda são bastante controversos. A utilização de diferentes protocolos para análise das vias de sinalização do AR podem levar a essas controvérsias. Um exemplo é a utilização de amostras de tecido prostático contendo todos os tipos celulares da próstata, e áreas contendo HPB e/ou câncer, o que pode gerar resultados inespecíficos. Considerando que o carcinoma prostático é predominantemente de origem epitelial e a próstata contém diferentes tipos celulares, neste trabalho optamos por utilizar o método de microdissecção a laser, com a identificação de áreas específicas de CaP e HPB, por um patologista, para realizar um rastreamento na via de sinalização androgênica, procurando identificar com alto grau de especificidade, genes diferentemente expressos nessas doenças.

Sabe-se que no desenvolvimento normal da próstata, a ação AR é essencial para a manutenção e diferenciação; contudo, no CaP, o AR adota um papel mais mitogênico no epitélio canceroso, ativando a proliferação autóloga e prevenindo a morte celular. Estudos demonstram a associação entre diminuição de AR, a progressão da CaP e pior prognóstico (Leach, Need et al. 2014). Além disso, o aumento da atividade do AR em CaP está associado a mutações ou amplificações gênicas, mas a incidência destes processos é baixa em CaP primário. Ainda, o aumento da expressão de AR no epitélio prostático de camundongos transgênicos induz a hiperplasia epitelial e posteriormente a áreas focais de neoplasia intraepitelial (Ricciardelli, Choong et

al. 2005). Assim, acredita-se que o aumento da expressão do AR mantém a diferenciação prostática durante HPB, e por algum evento, ainda não esclarecido, ocorre uma alteração na via de sinalização do AR que favorece o crescimento neoplásico da próstata. Com o avanço da idade ocorrem alterações nos níveis hormonais de testosterona circulante e este desbalanço está associado ao desenvolvimento de doenças prostáticas (Berry, Coffey et al. 1984). Um dos tratamentos para redução na proliferação prostática é a utilização de fármacos anti-androgênicos como a finasterida que age sob enzima 5- $\alpha$ -redutase, inibindo a conversão de testosterona em DHT (Berry, Coffey et al. 1984), e conseqüentemente, desacelerando a proliferação prostática.

Os pacientes do nosso estudo que faziam parte do grupo HPB faziam o uso de finasterida. No entanto, a reduzida expressão de AR no grupo CaP em relação ao grupo HPB, explica-se devido outras vias de ativação que favorecem e mantêm a elevada a expressão deste receptor no grupo HPB, como amplificação ou mutações do gene AR, expressão de coativadores e correpressores, síntese intácrina de androgênicos e ativação alternativa por sinalização dependente de tirosina cinase (Caffo, Maines et al. 2016). Ainda, é possível verificar nos resultados de imunohistoquímica que a porcentagem de células positivas para o AR no núcleo é maior na HPB, ou seja, o receptor apresenta-se no seu estado ativo exercendo sua função no núcleo. A expressão gênica diminuída do AR encontrada em células epiteliais tumorais no nosso trabalho, também foi descrita por Hillebrand et col. (resultados não publicados) em amostra de tecido prostático contendo células epiteliais e estromais (Hillebrand 2013). Mesmo diminuída, nosso resultado de expressão gênica demonstram a presença de expressão deste receptor no grupo CaP, e os resultados de imunohistoquímica demonstram que esta proteína está localizada principalmente no citoplasma das células. A presença do AR no citoplasma é esperada na ausência de ligante, o qual é o sinal regulador para a translocação do AR para o núcleo (Sc, Jm et al. 2016), assim, o AR no grupo CaP deve estar em seu estado inativo, devido a sua localização. Acredita-se que este receptor não esteja exercendo seu papel na via de sinalização androgênica de forma tão exarcebada, o que é possível devido a algum efeito

repressor de correguladores do AR, supressores tumorais, na tentativa de reverter o processo tumoral já que estudamos CaP primário.

Agrupando os demais genes do estudo de acordo com a função, dos genes estudados que codificam enzimas que estão de alguma forma ligadas ao metabolismo de androgênios, encontramos 4 enzimas expressas somente no grupo CaP, sendo elas: HSD17B3, HSD17B8, SOAT1 e POR. A enzima citocromo redutase P450 (POR) está envolvida no metabolismo de drogas e de hormônios esteroides, ou seja, atua na metabolização de hormônios androgênicos (Burkhard, Parween et al. 2016). A ausência desta enzima no grupo HPB pode favorecer a permanência dos níveis de hormônios no tecido, enquanto a presença desta enzima somente no grupo CaP, pode, por sua vez, favorecer a metabolização dos androgênios e redução dos níveis dos mesmos no ambiente tumoral. Já HSD17B é uma enzima que catalisa a oxirredução do grupo hidroxil de androgênios e estrogênios e regula a disponibilidade intracelular de hormônios esteróides. O tipo 8, HSD17B8 converte estradiol em estrona, como também converte testosterona, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona e 5-androstene3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol no correspondente 17-ketoesteróide. A expressão de HSD17B8 já foi detectada abundantemente em próstata, placenta e rim (Rotinen, Celay et al. 2009). Já o tipo 3 (HSD17B3) catalisa a conversão da androstenediona no metabolito mais ativo testosterona que é essencial para o desenvolvimento da próstata. Assim, a elevada expressão destas enzimas POR, HSD17B3, HSD17B8 pode estar relacionada a dependência androgênica do tumor prostático e a manutenção dos níveis deste hormônio no microambiente tumoral. Quanto à isoforma HSD17B6 desta família, encontramos expressão reduzida no grupo CaP.

Outro gene expresso somente em CaP foi o gene que codifica a enzima SOAT1. Esta também tem ação sobre lipídeos, pois catalisa a formação de ésteres de colesterol e de ácidos graxos de cadeia longa, deixando-os mais solúveis para o armazenamento de colesterol no interior do citoplasma celular. Assim, SOAT1 está presente na maioria dos tecidos, sendo a principal expressão no fígado adulto (Pramfalk, Davis et al. 2005). Em células

prostáticas, a expressão o de SOAT1 é induzida por ácidos graxos e a estimulação androgênica em células de CaP está correlacionada com o acúmulo de triglicerídeos e ésteres de colesterol. Portanto, acredita-se que os androgênios possuem um papel significativo no aumento da lipogênese (Locke, Wasan et al. 2008)

Dos demais genes analisados, 5 apresentaram expressão reduzida no grupo CaP em relação ao grupo HPB, são eles HSD11B1, HSD17B6, SCARB1, UGT2B15 e UGTB17. O gene HSD11B1 codifica uma enzima que converte a cortisona inativa em cortisol. Esta é amplamente expressa e, embora bidirecional, *in vivo*, ela funciona predominantemente como uma oxirreductase, gerando o glucocorticóide ativo. Os glicocorticoides têm sido descritos como benéficos no tratamento de cânceres, embora o tratamento prolongado seja associado a outras malignidades. A exposição do CaP a glicocorticoides, como a dexametasona, induz a regulação negativa de fatores pro-angiogênicos como VEGF e IL8 (Gathercole, Lavery et al. 2013). Assim, a baixa expressão de HSD11B1, está acompanhada da expressão de IL8 exclusiva no grupo CaP e a redução desta enzima que gera glicocorticoides ativos pode, por sua vez, favorecer a promoção tumoral.

Já o gene SCARB1 tem participação no metabolismo do colesterol, precursor dos hormônios esteroides. Sabe-se que o colesterol tem participação na proliferação, migração e sobrevivência, permitindo a progressão tumoral. A enzima codificada por SCARB1 desempenha um papel essencial na regulação da via de transporte reverso do colesterol, que promove a remoção e excreção do excesso de colesterol corporal. A expressão elevada de SCARB1 em amostras de tecido prostático tumoral evidência o aumento da malignidade e crescimento tumoral independente de androgênios (Gutierrez-Pajares, Ben Hassen et al. 2016). Portanto, a reduzida expressão deste gene no grupo CaP por nós encontrada, corrobora com um estudo que descreve esta expressão reduzida na linhagem LNCaP como possível causa da redução na viabilidade celular destas células (Gutierrez-Pajares, Ben Hassen et al. 2016).

A família de enzimas UDP-glucuronosiltransferase (UGT) são proteínas chave no metabolismo (Gauthier-Landry, Belanger et al. 2015) e catalisam a reação glucoronização de uma variedade de compostos incluindo hormônios, bilirrubina e xenobióticos, prevenindo o acúmulo de possíveis componentes lipofílicos tóxicos (Bushey, Chen et al. 2011). Dentre os genes que codificam enzimas UGTs, analisamos a expressão de UGT1A8 e UGT2A1, cujas isoformas não apresentaram expressão em nenhum dos grupos, sendo a ausência de expressão de UGT2A1 já descrita em próstata por Buschey et al. (Bushey, Chen et al. 2011); já as UGT2Bs analisadas foram: UGT2B7, UGT2B17 e UGT2B15. Estas UGTs são altamente expressas em próstata e terminam a sinalização androgênica por glucoronização do  $3\alpha$ -diol. UGT2B7 é capaz de glucoronizar DHT, mas sua atividade é apenas de 1-10% da UGT2B15 e UGT2B17 e ela não é expressa em próstata, resultado também encontrado em nosso estudo. Já as isoformas UGT2B15 e UGT2B17 têm sido estudadas na linhagem LNCaP. A inibição destas enzimas inibe a glucoronização, resultando no aumento dos níveis de DHT na cultura celular e o aumento da reposta proliferativa. O aumento nas concentrações de DHT influencia a expressão de genes que são dependentes de androgênios e a proliferação celular. A reexpressão UGT2B15 e UGT2B17, resulta no aumento da glucoronização e pode contribuir para a atividade anti-tumoral destes agentes (Zhang, Zhang et al. 2016). Assim, a diminuição destas enzimas no nosso estudo pode favorecer o aumento dos níveis de DHT, justamente para auxiliar no desenvolvimento tumoral.

Os demais genes que codificam enzimas que participam do metabolismo AKR1C4, CYP11A1, CYP11B1, CYP19A1, CYP21A2, DHRS9, HSD3B1 e STS, não apresentaram expressão em nenhum dos grupos. Está ausência de expressão pode ser devida a pequena quantidade de RNA possível de ser extraída pela microdissecção ou pela amplificação tardia, não detectada pela técnica de RT-qPCR. Já os genes SRD5A1 e SRD5A2 tiveram amplificação detectada em ambos os grupos; porém, não foi possível realizar análise pelo fato da expressão ser apenas em uma amostra do grupo HPB, sendo o Ct mais precoce no grupo CaP do que no grupo HPB. Sabe-se que estas enzimas são

críticas no metabolismo dos androgênios, pois realizam a conversão da testosterona em DHT, o agonista mais potente do AR em células da próstata. SRD5A2 é descrita como predominantemente expressa em tecidos da próstata não-malignas, a expressão de SRD5A1 é relatada no CaP (Shiota, Fujimoto et al. 2015). No entanto, a possível explicação para nossos resultados é de que os pacientes do grupo HPB faziam tratamento com o fármaco finasterida, um inibidor da enzima 5- $\alpha$ -redutase, a ausência de expressão ou expressão muito tardia destas enzimas neste grupo pode ser devido a este tratamento (resultados não mostrados).

Em nosso trabalho também analisamos genes relacionados com a maquinaria da transcrição gênica (AOF2, MED1, MED12, MED13, MED14, MED16, MED17, MED24, MED4 e MYST1), a qual é conduzida em parte por fatores de transcrição (TFs) e pelo complexo mediador (MED). Uma função básica do mediador é comunicar sinais reguladores de TFs ligados ao DNA diretamente para a enzima RNA polimerase II. Os mecanismos precisos pelos quais mediador regula a atividade da RNA pol II permanecem pouco compreendidos, mas é evidente que envolve grandes interações proteína-proteína entre Mediador, pol II e TFs gerais e específicos do gene. Além disso, a atividade do complexo mediador está envolvida na regulação de processos fundamentais envolvidos na transcrição, incluindo a iniciação da transcrição, alongação da transcrição e arquitetura da cromatina (Allen and Taatjes 2015). Dentre as subunidades de MED, a subunidade MED1 ganhou reconhecimento há pouco tempo na oncogênese e progressão do câncer de próstata. MED1 é super expresso em células epiteliais de CaP e em linhagens celulares de CRPC. A super expressão de MED1 em células CRPC leva ao aumento da expressão de alvos do AR que estão envolvidos na progressão do ciclo celular, o que favorece o desenvolvimento tumoral (Liu, Sprenger et al. 2015). Já a perda de expressão de MED1 e a subunidade MED17 está relacionada com a inibição da proliferação celular de células prostáticas, a inibição da progressão do ciclo celular e o aumento da apoptose (Vijayvargia, May et al. 2007). Assim, nossos resultados de expressão diminuída de MED1 juntamente com o AR no grupo CaP, podem ser contrários a proliferação celular e a expressão de

MED17 somente no grupo CaP pode ser associada com o avanço da proliferação celular.

A subunidade MED12 está relacionada com a regulação e modulação do gene TGF $\beta$ . A sinalização por TGF $\beta$  inibe o crescimento celular prostático pela inibição da proliferação e indução da apoptose, sendo considerado um supressor tumoral em tecido prostático normal e estágios iniciais de CaP(Shaikhibrahim, Offermann et al. 2014). No entanto, encontramos a expressão de MED12 reduzida no CaP em relação a HPB, o que pode, então, favorecer o crescimento prostático. Já a subunidade MED14 está relacionada ao receptor de glicocorticoide (GR). Por exemplo, a ligação de MED14 ao GR induz uma conformação de mediação específica, que facilita a ativação transcricional de certos promotores de genes alvos do GR (Chen, Rogatsky et al. 2006). Referente às demais subunidades analisadas neste trabalho MED4, MED13, MED16 e MED24, há pouca descrição sobre suas características e funções na literatura e não foi encontrada relação com os demais genes do estudo.

Além destes genes, o gene MYST1 codifica sua proteína correspondente que tem como função acetilar as histonas nucleossômicas que são diretamente envolvidas na ativação transcricional. MYST1 possui habilidade de se ligar ao AR *in vivo* e *in vitro* e quando ligado a este, MYST1 reprime a atividade transcricional do AR. A expressão de MYST1 é descrita particularmente elevada nos tecidos dos testículos(Sharma, Zarnegar et al. 2000), mas no nosso caso, encontramos a expressão deste gene reduzida no grupo CaP quando comparado à HPB. Contudo, é possível que mesmo apresentando expressão reduzida no CaP, MYST1 seja um dos candidatos a estar reprimindo a atividade transcricional do AR, justificada pela alta presença citoplasmática deste receptor no grupo CaP.

Quanto ao gene AOF2, este apresenta um papel crucial para ativação de genes induzidos por AR por atuar como uma histona desmetilase, e complexos de AOF2 e AR têm sido relatados, sendo AOF2 considerado tanto um coativador quanto um corepressor do AR. AOF2 ainda atua na indução da

transição epitelial-mesenquimal em vários tipos de células cancerígenas, função descrita no câncer de mama, onde a ausência da expressão de AOF2 leva a uma inversão da migração celular e da capacidade de invasão impulsionada por AR em células MCF-7 e MDA-MB-231 de câncer de mama. Isto sugere que AOF2 é essencial para a transição epitelial-mesenquimal induzida por DHT em células de câncer de mama e a expressão de AR e AOF2 estão envolvidas na regulação dos genes como E-caderina e vimentina, dois genes indutores e reguladores da transição epitelial-mesenquimal. (Feng, Li et al. 2016). Portanto, com nosso trabalho não foi possível identificar se AOF2 está atuando como coativador ou corepressor do AR, mas é possível que a expressão reduzida de AOF2 no CaP possa favorecer a progressão tumoral e a promoção metastática.

A proliferação celular é um processo regulado em que proteínas podem agir como reguladores positivos ou negativos da proliferação celular. Dentre os reguladores negativos estudados neste trabalho temos: APPL1, BRCA1, BRCA2, FOXO3, IGFBP5, PDS5B, SUMO1 e WDR19. Destes genes, encontramos que APPL1, BRCA1, BRCA2 e WDR19 apresentaram expressão somente no grupo CaP. O gene APPL1 codifica a proteína que é descrita como mediadora da apoptose, da proliferação de células, bem como da localização de proteínas endossomais (Song, Mu et al. 2016). Yang et. al demonstram que APPL1 suprime a transativação de AR nas células de CaP independente de androgênios e dependentes de androgênios e este efeito supressor é em grande parte dependente da via PI3K/AKT (Yang, Lin et al. 2003). Assim, APPL1, atua bloqueando a proliferação celular e a expressão encontrada somente no grupo CaP pode estar favorecendo a repressão do AR na tentativa de contenção da proliferação tumoral.

O gene BRCA1 exerce um papel importante nos sistemas de controle celulares, tais como a resposta e reparação a danos no DNA, regulação da transcrição gênica e modelagem da cromatina. O BRCA1 também é descrito como um coregulador positivo do AR, o qual medeia a via de sinalização essencial no desenvolvimento e progressão do CaP. Contudo, a função BRCA2 parece estar limitada a processos de recombinação e reparação do DNA

(Castro and Eeles 2012; Kim, Park et al. 2016; Modena, Iacovelli et al. 2016). O gene BRCA2 atua como um supressor tumoral em tecido epitelial da próstata e a sua perda funcional predispõe a lesões pré-malignas da próstata. Entretanto, BRCA2 limita o potencial metastático das células neoplásicas através da inibição da via PI3K/AKT e ativação da via MAP/ERK, prevenindo a migração e invasão das células tumorais. Assim, a perda funcional destes genes reflete em alterações no crescimento tumoral, o que explica o fato de pacientes com mutações deletérias nos BRCA1 e BRCA2 apresentarem frequentemente envolvimento nodal e metástases à distância no momento do diagnóstico (Castro and Eeles 2012).

É descrito na literatura que BRCA1 funciona como um coregulador do AR e inicia um papel positivo na morte celular induzida por androgênios. Consistente com o papel supressor tumoral, células da linhagem DU-145 transfectadas com BRCA1 selvagem exibiram a diminuição da taxa de proliferação e aumentaram a sensibilidade à drogas quimioterápicas, aumentando a susceptibilidade a apoptose induzida por drogas e expressão de proteínas regulatórias. Também, em células epiteliais prostáticas com o AR ativo, o efeito do BRCA1 na expressão gênica de IGF-IR é mediado através do aumento da atividade transcricional do AR (Schayek, Haugk et al. 2009). Isso demonstra que existe uma interação entre BRCA1 e AR na regulação da transcrição de alguns genes, e que através desta, o BRCA1 pode favorecer a atividade transcricional do AR.

Um estudo de Kim et al. 2016 realizado com amostras de pacientes submetidos a prostatectomia mostrou que a proteína BRCA1 é expressa em 93,3% dos tecidos de CaP (Kim, Park et al. 2016). Da mesma forma, Fiorentino e colaboradores demonstraram que BRCA1 não é expresso em tecido normal, mas sim em tecido de CaP (Fiorentino, Judson et al. 2010). Em nosso estudo de imunohistoquímica para a proteína BRCA1 encontramos que no grupo HPB existe um pequeno percentual de núcleos epiteliais positivos (7%) e no grupo CaP a positividade é encontrada no citoplasma 10% das células epiteliais. Já era esperado, seguindo os resultados de expressão gênica a ausência ou

expressão reduzida desta proteína no grupo HPB, pois este gene não amplificou em nenhuma das amostras do grupo; no entanto, no grupo CaP esta expressão era esperada, já que identificamos a expressão gênica em todas as amostras do grupo. O padrão de marcação imunohistoquímica do BRCA1 é definido em mama e é diferente nos carcinomas mamários em relação ao tecido mamário normal. Em epitélio normal de mama a marcação é exclusivamente nuclear, enquanto nos carcinomas pode ser exclusivamente nuclear, predominantemente nuclear, predominantemente citoplasmática ou exclusivamente citoplasmática. O BRCA1 é sintetizado no citoplasma e transportado até o núcleo, onde desempenha seu papel regulador do ciclo celular. Acredita-se que no carcinoma ocorra um defeito nesse transporte, justificando sua expressão citoplasmática (Ribeiro-Silva.A.; B; et al. 2005). Assim, justifica-se a expressão exclusivamente citoplasmática de BRCA1 encontrada em nosso trabalho no grupo CaP, sendo que a funcionalidade desta proteína deve estar ausente já que esta exerce sua função no núcleo.

Outro gene expresso somente no grupo CaP foi o gene WDR19 que está implicado numa variedade de funções tais como a transcrição gênica, apoptose, a montagem do citoesqueleto, a formação do fuso mitótico, o desenvolvimento e a mobilidade vesicular (Lin, White et al. 2003). A expressão WDR19 parece seguir um complexo padrão durante a progressão do câncer de próstata. Observa-se que a sua expressão vai aumentando a partir de tecidos normais adjacentes aos tecidos de câncer localizados. Em tecidos de CaP localizada, a sua expressão é inversamente correlacionada com a pontuação de Gleason, mas a sua expressão aumenta novamente em CaP metastático em comparação com CaP localizados. Isto sugere que expressão WDR19 é regulada por um mecanismo complexo envolvendo a sinalização do receptor de androgênio e vias de sinalização ainda não identificadas (Lin, Utleg et al. 2008).

Somente o gene NKX3-1 apresentou expressão maior no grupo CaP dos reguladores negativos da proliferação celular. Este gene codifica um homeodominio de fator de transcrição cuja expressão é restrita à próstata e é controlada por androgênios. O gene está localizado no cromossomo 8p21 em

uma região frequentemente perdida em CaP precoce. Estudos em camundongos knockout NKX3-1 forneceram evidências de que NKX3-1 é um supressor tumoral, porque estes animais desenvolvem neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), uma lesão pré-cancerosa caracterizada pela hiperproliferação de células displásicas. A perda de NKX3-1 pode cooperar com a perda de p27 e PTEN no desenvolvimento do CaP, enquanto que a superexpressão de NKX3-1 inibe a proliferação de células epiteliais em animais com ausência de PTEN (Yang, Chung et al. 2014). O nível de expressão NKX3-1 em CaP é mais elevado do que nos tecidos normais da próstata segundo a base de dados de microarray Oncomine (<https://www.oncomine.org/>). Estas observações de elevada expressão sugerem que talvez NKX3-1 pode realmente funcionar como um oncogene em vez de um supressor de tumor da próstata. Além disso, NKX3-1 regula genes que são ativos na promoção da sobrevivência celular ou na prevenção da apoptose celular (Tan, Chang et al. 2012).

Bowen e colaboradores relataram que a perda da expressão da proteína NKX3-1 está correlacionada com a progressão do CaP, especificamente esta perda de coloração por IHQ é de 20% em PIN de alto grau, 6% em amostras em estágio T1a/b, 22% em estágio T3/4, 34% em CRPC e 78% em metástases. Por contraste, Korkmaz realizou hibridização *in situ* para a expressão de RNAm e imunohistoquímica para coloração em microarray tecidual (TMA) e reportou que a grande maioria dos CaP são positivos tanto para RNAm quanto para proteína. Aliás, a proteína NKX3-1 está presente em 66% das amostras de CaP primário, 44% de tumores metastáticos não tratados e 27.3% dos CRPC (Gurel, Ali et al. 2010). Além dos nossos resultados de expressão gênica de NKX3-1 serem elevados no grupo CaP, nossos resultados de expressão proteica demonstram elevado percentual de células com expressão desta proteína no núcleo e no citoplasma no grupo CaP e também no núcleo do grupo HPB. Levando em consideração que NKX3-1 regula diretamente os genes dependentes do AR que são superexpressos em CaP e desregulados em CaP avançado, o NKX3-1 tem um papel central na tumorigenicidade da próstata, pois também regula genes que são ativos na promoção da sobrevivência celular ou na prevenção da apoptose celular. Além

disso, NKX3-1 é um gene responsivo ao AR na presença de DHT, e NKX3-1 regula a atividade transcricional do AR ativando sua expressão através de um mecanismo constitutivo de “feed-forward” entre estes dois fatores, como também age juntamente com o AR e FOXA1 recrutando elementos genômicos específicos para a sinalização androgênica e sobrevivência do CaP (Tan, Chang et al. 2012). Portanto, a elevada expressão gênica por nós encontrada, juntamente com a expressão proteica no grupo CaP pode ocorrer devido a tentativa de NKX3-1 estimular o aumento da atividade transcricional do AR que está reduzida no CaP.

O restante dos genes que participam da regulação negativa da proliferação celular, apresentaram todos, expressão reduzida no grupo CaP em relação à HPB. Dentre eles, o gene FOXO3 apresenta ação negativa na via de sinalização PI3K/AKT, inibindo a proliferação celular. FOXO3 é também considerado um importante regulador transcricional de proteínas associadas com diversas funções celulares, como a capacidade supressora tumoral por regular a expressão de genes envolvidos com a apoptose, bloqueio do ciclo celular, resistência a estresse oxidativo e autofagia, sendo a inibição da expressão de FOXO crítica para promover a transformação celular, progressão tumoral e angiogênese (Liu, Yin et al. 2015). A expressão elevada da isoforma FOXO3A é encontrada durante os estágios iniciais do CaP. Já a redução de FOXO3A é observada em células epiteliais de CaP quando comparadas a células de epitélio prostático benigno, o que sugere que a baixa atividade transcricional de FOXO3A está associada com o CaP biologicamente mais agressivo (Shukla 2014). Também, FOXO3A pode atuar como regulador negativo da transição epitelial-mesenquimal, o que ressalta a importância desta proteína na supressão da progressão tumoral sendo considerada uma supressora de metástase tumoral (Liu, Yin et al. 2015). Da mesma forma, o gene IGFBP5 parece ter ação que conduz a um fenótipo de adesão às células epiteliais, ou seja, antimigratório e, como tal, a IGFBP5 pode desempenhar um papel chave na limitação da metástase (Sureshbabu, Tonner et al. 2011). Portanto, a redução nas expressões de ambos os genes, FOXO3A e IGFBP5, atua no sentido de favorecer a progressão do CaP para um estágio mais

avançado, juntamente com o favorecimento da formação de metástase tumoral. E por fim, o único gene que não foi possível realizar análise estatística foi o gene PDS5B, pois somente uma amostra do grupo HPB teve amplificação.

Outro gene que apresentou expressão reduzida foi SUMO1. Este gene desempenha um importante papel na regulação de muitos processos celulares, incluindo transdução de sinal, regulação da transcrição, estrutura da cromatina e shuttling nuclear / citoplásmico. Ao contrário da ubiquitinação, a modificação realizada por SUMO não é associada à degradação da proteína. Em vez disso, é semelhante aos papéis não proteolíticos da ubiquitinação incluindo a localização subcelular e a regulação da atividade transcricional (Kim, Lee et al. 2007). O efeito inibitório da SUMOilação no AR e outros fatores de transcrição se dá visto que quando a SUMOilação é baixa, existem vantagens para a progressão do câncer de próstata. Além disso, uma superexpressão da protease de SUMO, SENP1, já é descrita em estádios avançados de CaP e esta protease atua regulador positivo da atividade AR por servir como a principal protease SUMO responsável pela clivagem do SUMO de AR, e também pelo AR ser um ativador direto do gene SENP1. Assim, a perda da SUMOilação de AR conduz a uma indução de SENP1, o que por sua vez restringe ainda mais a SUMOilação de AR e mantém a atividade AR. A supressão da SUMOilação pode proporcionar vantagens para a progressão do CaP, visto que a SUMOilação aumentada é um sinal forte para a indução do bloqueio do crescimento através senescência celular (Mukherjee, Cruz-Rodriguez et al. 2012). Portanto, nosso resultado encontrado é favorável para a progressão tumoral visto que a expressão de SUMO1 foi menor no grupo CaP, mesmo a expressão do AR menor nesse grupo.

A regulação positiva do ciclo celular favorece a proliferação e muitas vezes a sobrevivência celular. Dos genes facilitadores do ciclo celular, dois genes foram expressos somente no grupo CaP, CDC25B e PIM1. O gene CDC25B codifica uma fosfatase que desempenha um papel importante na ativação das cinases dependentes de ciclinas (CdK) pela desfosforilação das

mesmas nos resíduos Thr14 e Tyr15, o que permite a progressão do ciclo celular. (Lavecchia, Coluccia et al. 2008). CDC25B é descrito como super expresso no CaP e existe uma correlação com o aumento do score de Gleason e os estágios da doença. Os mecanismos pelos quais CDC25 contribuem para a transformação neoplásica não são conhecidos, mas CDC25B tem sido reportada como coativadora do receptor de androgênios. Sugere-se que CDC25B possa estar associada ao AR aumentando a transativação do mesmo pela interação proteína-proteína e resultando na super expressão de genes-alvo, levando a proliferação celular anormal (Ngan, Hashimoto et al. 2003). Assim sendo, é possível que os efeitos de CDC25 sobre as células epiteliais tumoral se dê em maior parte pela desforforilação das Cdk do que pela transativação do AR, já que encontramos este presente na maior proporção no citoplasma das células epiteliais de CaP.

A proteína PIM1 cinase serine/treonine codificada pelo gene PIM1 pode induzir a progressão do CaP por atuar como um proto-oncogene (Xie and Bayakhmetov 2016). Um candidato a efetor do PIM1 é a glicogênio sintase-quinase 3 $\beta$  (GSK3B). GSK3B tem sido descrita por ter efeitos negativos e positivos na progressão do CaP e na mobilidade celular. PIM cinase fosforila GSK3B, o que induz sua inativação, aumentando a migração celular de células do CaP, bem como induzindo a transição epitelial-mesenquimal. GSK3B é alvo tanto da AKT como PIM cinase favorecendo a progressão tumoral (Santio, Salmela et al. 2016).

Neste trabalho encontramos a maior expressão de KLK4 no epitélio prostático tumoral em relação ao epitélio hiperplásico. KLK4 é gene regulado por androgênios e é expresso predominantemente em próstata. Estudos demonstram que KLK4 é expressa em epitélio prostático e é significativamente super expressa em CaP comparado a HPB. A elevada expressão resulta no aumento da mobilidade celular de células prostáticas e aumento da proliferação celular devido à regulação da expressão gênica de genes envolvidos no ciclo celular (Jin, Qu et al. 2013). Além disso, KLK4 apresenta um importante papel no início da progressão do CaP pelo seu envolvimento na transição epitelial-

mesenquimal, um fenótipo mais agressivo e metástases para o osso (Lose, Srinivasan et al. 2012). Assim, a elevada expressão encontrada no grupo CaP, mesmo sendo um gene regulado por androgênios deve estar favorecendo o avanço tumoral.

Já os genes BCL2, DAXX, PARK7, RCHY1, TMPRSS2 e TGIF, apresentaram expressão reduzida no grupo CaP em relação ao grupo HPB. O gene BCL2 é um dos maiores reguladores da apoptose, por ser um fator anti-apoptótico. Em HPB é descrita a expressão de BCL2 nas células basais, no entanto, devido ao estresse, a privação androgênica e a radiação, a elevada expressão de BCL2 é responsável pela sobrevivência celular, através do bloqueio da apoptose. Kyprianou investigou o papel de BCL2 em HPB e reportou que a expressão de BCL2 diminui a apoptose em relação ao epitélio prostático normal (Gandour-Edwards, Mack et al. 2004). Aliás, o gene BCL2 é comumente expresso em células tumorais prostáticas e outros cânceres primários. A expressão de BCL2 está relacionada à independência androgênica e sua elevada expressão é notável em estágios avançados da doença, o que sugere que os mecanismos de independência androgênica possam mediar efeitos pelas vias apoptóticas. Assim, pode-se explicar que a reduzida expressão de BCL2 no grupo CaP pode ser devido este ser um CaP primário (Mazaris and Tsiotras 2013).

O gene DAXX, modulador de morte celular, inicialmente identificado por codificar uma proteína pro-apoptótica funciona como um repressor transcricional. Pela capacidade de repressão de supressor tumoral e regulador da autofagia, DAXX pode induzir o crescimento tumoral e a sobrevivência do tumor (Puto, Brognard et al. 2015). Além disso, DAXX está envolvido na regulação da atividade transcricional do AR em linhagens celulares de CaP. A expressão elevada de DAXX reprime a transcrição mediada pelo AR na linhagem LNCaP e a depleção de DAXX resulta no aumento da expressão do gene PSA, gene alvo do AR (Lin, Fang et al. 2004). Deste modo, nosso resultado de expressão reduzida de DAXX no tecido tumoral, possa estar favorecendo a atividade do AR, já que uma pequena porção das células

apresenta positividade para o AR no núcleo celular. Já o gene PARK, também conhecido como DJ-1, foi inicialmente descrito por Nagakubo et al que determinou o aumento da expressão de PARK7 com propriedades oncogênicas(Nagakubo, Taira et al. 1997). PARK7 é predominantemente expresso em células epiteliais luminais e sua localização subcelular é regulada por androgênios e anti-androgênios. A expressão citoplasmática de PARK7 demonstrada no estudo de Osman et al é menor em epitélio não neoplásico quando comparado ao epitélio de CaP, sugerindo que o aumento citoplasmático de PARK7 pode ser importante na transformação neoplásica da próstata. A provável função de PARK7 na promoção da carcinogênese pela inibição de PTEN, um potente supressor tumoral que inibe a via AKT (Osman, Abd El Atti et al. 2013). Contudo, em nosso trabalho não encontramos esta expressão aumentada no tecido tumoral, o que deve manter a atividade de PTEN e ser contrário a proliferação tumoral.

O gene RCHY1, uma ubiquitina ligase E3, foi inicialmente identificada como uma proteína que interage com o receptor de androgênio (Halaby, Hakem et al. 2013). Além disso, RCHY1 participa da ubiquitinação e degradação de várias proteínas chaves envolvidas na regulação do ciclo celular, na morte celular, na proliferação, tais como p73, p63, p27kip1 e c-Myc. A superexpressão de RCHY1 leva a uma diminuição das funções mediadas por p53, incluindo apoptose e bloqueio do ciclo celular e esta elevada expressão é descrita em CaP e se correlaciona com a progressão da doença. Assim, esta ligase E3 pode desempenhar diferentes papéis na progressão e tumorigênese do câncer, porque seus alvos incluem os supressores de tumor(por exemplo, p53) e oncogenes (por exemplo, c-Myc) (Halaby, Hakem et al. 2013). Diferentemente do que é encontrado na literatura, em nosso trabalho encontramos a redução da expressão de RCHY1 no grupo CaP.

Recentemente o gene TMPRSS2, gene regulado por androgênios, tem sido descrito como um marcador promissor para o CaP. Este gene é geralmente encontrado fusionado com o gene ERG (ETS transcriptionfactor), o qual é considerado um oncogene. A fusão de genes TMPRSS2: ERG é importante não só pela sua elevada prevalência (ou combinação com outros

biomarcadores), sensibilidade e especificidade no diagnóstico precoce da CaP, mas também na predição da fase, agressividade e do potencial metastático do tumor (Krstanoski, Vokac et al. 2016). No entanto, em nosso trabalho só analisamos a expressão gênica do gene TMPRSS2, que se apresenta reduzida em relação ao grupo HPB, mas o fato deste gene não estar mais expresso não significa que ele não esteja favorecendo a agressividade tumoral. Portanto, seria interessante averiguar se este gene está fusionado com o gene ERG nos dois grupos, pois o papel de TMPRSS2 no tumor é associado a fusão dos genes, ou seja, mesmo estando menos expresso em CaP, pode ser que ele esteja fusionado somente nesse grupo.

Outro gene, TGIF é relatado em alguns tumores como câncer de pulmão de não pequenas células (CPPC). A expressão de TGIF1 contribui para a progressão do câncer CPPC por regular o crescimento celular e a migração, e a ausência desta expressão previne a metástase, o que sugere que TGIF1 tem um papel importante na progressão tumoral. A elevada expressão também está descrita em carcinoma urotelial do trato superior e está correlacionada com o pior prognóstico (Xiang, Yi et al. 2015). Assim, a reduzida expressão encontrada em nosso estudo no grupo CaP, pode estar favorecendo a não progressão tumoral. Por fim, o gene GRP não apresentou expressão em nenhum dos grupos, este gene codifica um peptídeo neuroendócrino descrito em alguns tumores como mitogênico, morfogênico e pro-angiogênico. O desenvolvimento da diferenciação neuroendócrina em CaP e a produção de neuropeptídeos, como GRP, estão associados com mecanismos de resistência ao tratamento antiandrogênico (Ischia, Patel et al. 2014).

Quanto aos genes que participam da diferenciação e tumorigênese, apenas o gene CLDN3 apresentou expressão, sendo está ainda reduzida no CaP. Este gene codifica uma claudina, proteína essencial para a formação das *tight junctions* em células epiteliais e endoteliais, sendo a perda destas proteínas associadas com a tumorigênese. Contudo, a expressão aumentada de CLDN3 em CaP é descrita na literatura e está correlacionada com estágios avançados do tumor e CaP recorrente (Bartholow, Chandran et al. 2011).

Porém, faz sentido o resultado de baixa expressão no grupo CaP pelo papel funcional desta proteína na tumorigênese, mesmo se tratando de CaP primário.

Dos demais genes que participam na tumorigênese e diferenciação, FGF8, TGM4 e BMX não apresentaram amplificação em nenhum dos grupos estudados. O gene FGF8, fator de crescimento fibroblástico, é descrito em linhagens de CaP como superexpresso e atua como um fator de crescimento autócrino em células responsivas a hormônios (Dorkin, Robinson et al. 1999). O gene TGM4 é descrito como amplamente expresso em próstata e apresenta impacto no crescimento, migração e invasão de células de CaP por estar envolvido na interação epitélio-endotélio e transição epitelial-mesênquimal (Jiang and Ablin 2011). Já BMX, um gene expresso em células epiteliais e endoteliais, está associado a migração celular e sobrevivência, tendo papel na progressão do CaP (Paavonen, Ekman et al. 2004). Assim, como estes três genes são descritos na literatura como expressos em próstata e não encontramos expressão, é possível que a expressão seja baixa e não foi detectada através da reação de RT-qPCR, já que a expressão descrita é em célula epitelial como em nosso trabalho.

Dos genes que atuam como coativadores do AR encontramos que todos os genes analisados apresentam menor expressão no grupo CaP em relação a HPB, o que acompanha a menor expressão deste receptor no grupo CaP. Coativadores deste receptor podem aumentar sua habilidade transcricional e favorecer o desenvolvimento do CaP, visto a função deste receptor nesta doença. Dentre os genes, o gene CALCOCO1 codifica o transcrito CoCoA funciona como um coativador secundário de receptores nucleares, pois CoCoA pode se ligar a  $\beta$ -catenina, a qual é considerada um coativador do receptor de androgênios. Juntas a  $\beta$ -catenina e CoCoA aumentam sinergicamente a ativação transcricional mediada por AR (Yang, Kim et al. 2006). Já o gene CREBPP codifica uma proteína que facilita a transcrição através da acetilação de histonas, fatores de transcrição e autoacetilação de CREBPP e regula processos biológicos como proliferação, ciclo celular, diferenciação celular e repostas a danos do DNA. CREBPP regula a progressão do ciclo celular devido a sua influência na transcrição por estar recrutando fatores de transcrição para

a região regulatória de genes como o AR (Attar and Kurdistani 2016). Outro gene que codifica proteína com função de acetilação é o gene KAT2B. Este atua como um coativador para regular a transcrição de alguns genes, incluindo potencialmente a atividade transcricional regulada por AR nas células de CaP. Assim, KAT2B permite que a cromatina fique mais acessível para a maquinaria transcricional e além de acetilar de histonas, KAT2B também pode acetilar o AR e promover o aumento da atividade transcricional do AR estimulada por DHT para o crescimento celular (Gong, Eischeid et al. 2012). Diferentemente, o gene NSD1 é classificado como uma histona metiltransferase. A amplificação de NSD1 é encontrada em mieloma múltiplo, câncer de pulmão, neuroblastomas e glioblastomas e está relacionada com a transformação celular na formação do câncer. O membro NSD2 da família NDS está associado com agressividade ou prognóstico tumoral no CaP e a sua superexpressão em CaP causa aberrações na transcrição gênica, levando a um fenótipo metastático (di Luccio 2015). Mesmo não sendo descrita a ação de NSD1 em CaP, é possível que esta tenha ação similar ao outro membro da família NSD2. Já a proteína codificada pelo gene FKPB4 (FK506 binding protein 4) é um regulador positivo do AR e é descrita pela potencialização da sinalização AR em CRPC, onde os níveis de androgênio são reduzidos (De Leon, Iwai et al. 2011).

Todos os genes da PIAS, PIAS1, PIAS2 e PIAS3 também apresentaram expressão diminuída no CaP quando comparado ao tecido hiperplásico. Esta família de inibidores de proteína transdutoras de sinal ativado e ativadores de transcrição possuem capacidade de se ligar ao DNA e modular várias cascatas de sinalização e diversas proteínas. PIAS1, 2 e 3 foram inicialmente descritas como inibidores de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) 1, 2 e 3, respectivamente. Além da inibição de JAK / STAT, as proteínas PIAS também têm sido descritas como reguladores do fator nuclear (NF), de SMAD e da sinalização pelo AR. No entanto, o papel dessas proteínas em tumores ainda está sendo estudado. A perda de PIAS3 é descrita em glioblastoma por aumentar a proliferação celular e a redução de PIAS1 está relacionada com o desenvolvimento de câncer de cólon (Hoefler, Schafer et al. 2012). Gross et al

descreveram o papel de PIAS1 como coativador do AR, que por sua vez, contribui para o aumento da proliferação e a redução da apoptose pelo aumento da atividade do AR em células (Gross, Liu et al. 2001). Hoefler et al, mostraram que a expressão reduzida de PIAS 1 diminui a proliferação e a capacidade de formação de colônias em linhagem celular de CaP, o que pode ser devida ao bloqueio no ciclo celular induzida pela proteína p21 (Hoefler, Schafer et al. 2012).

O gene TGF $\beta$ 111 também teve expressão reduzida no CaP em relação a HPB. Este gene é um coregulador do AR e é descrito ser expresso predominantemente em fibroblastos presentes na próstata. TGF $\beta$ 111 liga-se ao AR e melhora a transcrição gênica mediada por AR. A expressão de TGF $\beta$ 111 raramente é encontrada em epitélio prostático tumoral; no entanto, acredita-se que TGF $\beta$ 111 desempenhe papel na diferenciação do músculo liso estromal ou na transição epitélio-mesênquima que já é observada na progressão do câncer de mama. Além disso, a superexpressão deste gene em células epiteliais de câncer de mama promove a degradação da matriz e a invasão (Leach, Need et al. 2014). Assim, nosso resultado de diminuição de expressão não contribui para o aumento da atividade do AR em CaP e de acordo com o que é descrito em mama previne a invasão. Já o gene ZMIZ1 possui a interação com o gene AR através da região NTD do AR e uma região central de ZMIZ1 já identificada (Li, Zhu et al. 2011). Ambas as proteínas AR e ZMIZ1 são colocalizadas no núcleo de células epiteliais prostáticas em amostras de tecidos. ZMIZ1 é capaz de aumentar a sumolização e o aumento da atividade do AR pelo ZMIZ1 é dependente da sumolização do receptor (Sharma, Li et al. 2003).

Dentre a família dos coativadores de receptor nuclear NCOA, sendo os componentes do nosso estudo NCOA1, NCOA2 e NCOA4, encontramos também a função de coativação de receptores e aumento sua atividade transcricional (Luef, Handle et al. 2016). Infelizmente, não foi possível analisar as isoformas NCOA2 e NCOA4 no nosso estudo devido a expressão em apenas uma amostra de cada grupo. No entanto, encontramos que NCOA1 apresentou expressão reduzida no CaP em relação a HPB. A ausência da

expressão de NCOA1 é descrita em um estudo de Luef et al (Luef, Handle et al. 2016), no qual o autor mostra que a baixa expressão está associada à redução da proliferação de células tumorais, à redução da atividade transcricional do AR e à diminuição da capacidade de invasão e migração (Luef, Handle et al. 2016). Assim, a expressão de NCOA1, juntamente com a expressão do AR, é responsável pela estimulação da migração em células prostáticas e os resultados encontrados para esta família de genes e com os demais genes descritos como coativadores do AR não estão favorecendo o aumento da sinalização androgênica, que pode estar favorecendo a diminuição da proliferação tumoral.

Entre os genes que atuam inibindo o AR ou os genes regulados pelo AR encontramos dois genes com expressão aumentada e dois genes com expressão reduzida e um gene expresso somente no grupo CaP. CALR, a calreticulina, um gene responsivo a androgênios e apresenta uma variedade de funções nas células. A proteína calreticulina é encontrada no retículo endoplasmático, mas pode ser encontrada na superfície celular. Ela é conhecida por modular a homeostase do  $\text{Ca}^{+2}$  por sua capacidade de se ligar ao cálcio com alta afinidade (Alur, Nguyen et al. 2009). Estudos tem relacionado a elevada expressão de CALR no avanço de estágios clínicos e metástase em linfonodo em câncer de mama. Além disso, é descrita a elevada expressão em CaP (Lu, Weng et al. 2015). Um estudo de Alur et al sugere que a calreticulina contribui para a supressão do CaP, pois a introdução de calreticulina exógena inibiu a formação de colônias nas linhagens LNCaP e PC3. A superexpressão de calreticulina também inibiu o crescimento tumoral num modelo de tumor de xenoenxerto PC3 ortotópico *in vivo*. A calreticulina também é descrita por aumentar a adesão célula-célula e célula-substrato, o que sugere o potencial da calreticulina na supressão de metástases, sendo a superexpressão capaz inibir a metástase pulmonar da linhagem tumoral Dunning AT3.1 quando transfectadas em ratos (Alur, Nguyen et al. 2009). Portanto, como encontramos esse gene com expressão aumentada no grupo CaP e a expressão do AR diminuída neste grupo, é possível que a calreticulina seja um potente inibidor da atividade transcricional do AR, fazendo com que

este permaneça no citoplasma das células, diminuindo a sinalização mediada por este receptor.

Outro gene que apresentou expressão elevada foi o gene PMEPA1. Este gene apresenta expressão abundante na próstata e é considerado um gene alvo do AR em CaP. Sabe-se que PMEPA1 realiza um feedback negativo na regulação dos níveis de AR nas células tumorais, colaborando com nosso resultado de expressão diminuída de AR. Da mesma forma que nosso estudo, a alta expressão de PMEPA1 tem sido encontrada em múltiplos tumores sólidos e a sua expressão pode ser também induzida pelo TGF $\beta$ . Estudos têm identificado que PMEPA1 inibe o receptor TGF $\beta$  1 por um feedback negativo inibindo a sinalização por TGF $\beta$ , o que é descrito em câncer de mama. PMEPA1 também tem sido reportado como promotor da proliferação em células de CaP que não possuem o AR, como a linhagem PC3. Assim, tanto a redução como o aumento da expressão de PMEPA1 pode promover a tumorigênese através de distintas vias de sinalização (Li, Mohamed et al. 2015).

Já os genes que tiveram expressão reduzida e são considerados inibidores do AR ou de genes regulados pelo AR, o gene PA2G4 codifica a proteína Ebp1, proteína homóloga a proteína reguladora do ciclo celular p38. Ebp1 é um regulador negativo de transdução de sinal de ErbB. A expressão alta de ErbB3 é positivamente associada com metástase, grau histológico, tamanho e recorrência do câncer de mama. A super-expressão de Ebp1 em células de câncer de mama ErbB2/3 positivas inibiu o crescimento celular, ao promover parada do ciclo celular em G2 / M do ciclo celular e bloqueio na diferenciação celular (Hamburger 2008). Este gene não apresenta descrição no CaP, mas devido a sua ação, pode-se esperar que a expressão reduzida esteja favorecendo a proliferação e a perpetuação do ciclo celular. O gene PATZ1 (POZ/BTB and AT-hook-containing zincfingerprotein 1) é um fator regulador transcricional. PATZ1 tem sido descrito como regulador positivo e negativo de diferentes genes dependendo do contexto celular. Estudos sugerem o papel de PATZ1 em câncer como um oncogene ou supressor tumoral. A possibilidade de ser um oncogene é devido a superexpressão em neoplasias malignas incluindo câncer de colón e mama, pois a regulação negativa por siRNA

bloqueia o crescimento celular e induz apoptose em células de linhagens celulares derivadas de câncer de colon-retal e glioma, respectivamente. Já a função de supressor tumoral é devido a inibição da transição epitelial mesenquimal e migração celular (Chiappetta, Valentino et al. 2015). Assim, nosso resultado de diminuição da expressão de PATZ1 pode ter ambos os sentidos, sendo que não foram encontrados resultados na literatura da expressão deste gene em próstata.

O gene que teve expressão somente no grupo CaP foi o gene PAK6 que é considerado um supressor de tumor. A sua expressão é encontrada aumentada em epitélio de CaP primário e metastático, em comparação com o epitélio normal da próstata (Liu, Li et al. 2013). PAK6 inibe o crescimento do CaP pela regulação da proteólise AR diminuindo a expressão excessiva do AR juntamente com a diminuição da agressividade do tumor, explicando o porquê da elevada expressão de PAK6 em CaP (Liu, Li et al. 2013). Deste modo, PAK6 sendo expresso somente no CaP pode estar atuando fortemente na degradação do AR, favorecendo a inibição da sinalização androgênica.

Dentre os genes estudados que apresentam papel na reprodução ou desenvolvimento sexual masculino, o gene SHH foi identificado somente no grupo CaP; este gene está envolvido na regulação do desenvolvimento dos órgãos, da proliferação celular e na diferenciação dos tecidos (Statkiewicz, Maryan et al. 2014). Tem sido demonstrado que a via de SHH desempenha um papel significativo na promoção do crescimento e desenvolvimento de células cancerosas. A sua atividade aumentada estimula a proliferação celular, promove a metástase e suporta a formação de novos vasos sanguíneos em tumores. A sinalização por SHH também está envolvido em processos responsáveis pela resistência à quimioterapia (Statkiewicz, Maryan et al. 2014). Já o gene SRY apresentou expressão reduzida no grupo CaP. o SRY é o membro fundador da família de genes SOX que codificam os fatores de transcrição SOX contendo um domínio HMG (grupo de alta mobilidade) que é capaz de se ligar ao DNA e o curvar. A proteína SRY consiste de um domínio N-terminal (NTD), um domínio HMG de 79 aminoácidos evolutivamente conservada e um domínio C-terminal (CTD). O domínio de HMG se liga a

sequencia (T/A)ACAA(T/A) do DNA na alça menor do DNA, e, por conseguinte, leva a uma flexão de 60-85°(She and Yang 2016). Estudos iniciais sugeriram que SRY funcionava na determinação do sexo masculino, estimulando diretamente a expressão de substância inibidora de Muller (MIS), mas estudos posteriores indicaram que SRY pode não ativar diretamente o gene MIS, mas em vez disso, induz a expressão de outros fatores de transcrição que regulam MIS. A expressão de SRY também tem sido reportada em tecidos humanos fora do testículo, incluindo próstata e CaP. A perda de SRY e outros genes codificados pelo cromossomo Y são frequentemente presentes em CaP (Yuan, Lu et al. 2001), o que corrobora com a baixa expressão encontrada neste trabalho. Os genes CRISP1,GPX5 e SPAG11B não apresentaram expressão em nenhum dos grupos.

Dos genes que codificam receptores encontramos a expressão diferencial do receptor de estrogênio ERS2 somente no grupo CaP. Sabe-se que os estrogênios têm influencia no crescimento prostático indiretamente através dos efeitos hipotalâmicos e hipofisários, reduzindo a secreção de gonadotrofinas e aumentando a síntese testicular de testosterona. Na próstata, ER2 é preferencialmente expresso em células epiteliais e ER1 é encontrado em células estromais e basais, e existem evidências que ocorra o aumento da expressão de ER em CaP (Asgari and Morakabati 2011). O papel do ER2 na patogênese ou prognóstico do CaP ainda é incerto. Ele está relacionado com o controle da proliferação e a prevenção da hiperplasia em próstata de roedores, visto que na sua ausência, é desenvolvida HPB ao longo do tempo (Asgari and Morakabati 2011). Estudos demonstram que a expressão de ER2 nas células epiteliais da próstata diminui à medida que se desenvolve o CaP e progride para um grau superior (Leung, Lam et al. 2010), sugerindo o papel de ER2 na manutenção do epitélio normal (Nicolaiew, Cancel-Tassin et al. 2009), mas esta expressão aumenta novamente em metástase em linfonodos e óssea. Assim, ER2 pode ter papel protetor durante os estágios iniciais da doença, mas pode promover a metástase ou a sobrevivência das células tumorais em sítios distantes, pois a imunopositividade em CaP avançado está relacionada com pouco tempo de sobrevida livre de recidiva (Leung, Lam et al. 2010). A análise

de ER1 não foi possível devida a expressão não homogênea nos grupos, mas esta expressão é notada pelo fato deste receptor ser expresso em células basais epiteliais que foram obtidas por microdissecção.

Outro gene que codifica um receptor, o gene NR2C1 (ou TR2), é abundantemente expresso em próstata sensível a androgênios e vesículas seminais de ratos. Acredita-se que NR2C1 tenha um papel regulatório no sistema reprodutor masculino, mas a contribuição deste gene em tumores ainda não é clara. A superexpressão deste gene em células de câncer de mama inibe o crescimento celular estimulado por estrogênios por promover o bloqueio do ciclo celular. Na próstata NR2C1 pode modular as ações de androgênios via supressão da transativação mediada por AR. Assim, NR2C1 pode ter efeitos antiproliferativos em células de próstata e mama sensíveis a hormônios via repressão da sinalização de AR e ER, respectivamente (Wu, Cheung et al. 2016). Contudo, encontramos uma expressão reduzida deste receptor no grupo CaP em relação ao grupo HPB.

Dentre os genes que participam da resposta imune, a interleucina 8 (IL8) foi o único gene expresso somente no grupo CaP. IL8 é um mediador da resposta imune inata secretada por leucócitos e células tumorais e está relacionada com diversos fatores celulares incluindo a vigilância imune, inflamação e a angiogênese. Em tumores, a IL8 aumenta a angiogênese pela modulação da proliferação e migração endotelial via aumento da secreção de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)(Araki, Omori et al. 2007). Os níveis circulantes de IL8 são encontrados aumentados no CaP avançado, no momento em que as células não respondem mais ao tratamento com antiandrogênios, pois recentemente foi descrito que a IL8 aumenta a atividade transcricional do AR em linhagens de CaP, indicando o papel desta citocina na modulação da transição do CaP para um estado independente de androgênio (Waugh and Wilson 2008). Em células de CaP independentes de androgênios, a expressão aumentada de IL8 está relacionada com o aumento da tumorigenicidade e a metástase. No entanto, é desconhecida se a IL8 é uma causa ou consequência da independência de androgênio e a progressão do tumor metastático. Além disso, o envolvimento da IL8 no crescimento e

metástase de células de CaP ainda não foi esclarecido (Araki, Omori et al. 2007). Quanto às demais interleucinas analisadas, IL4 não apresentou expressão em nenhum dos grupos e IL6 não teve expressão homogênea para análise.

Outro gene com função na resposta imune, o gene SART3 é um gene antigênico de rejeição de tumor com a capacidade de induzir linfócitos T citotóxicos. SART3 é amplamente expresso em vários tipos de cânceres epiteliais e neoplasias malignas hematológicas. Um estudo demonstrou que o peptídeo codificado por SART3 foi significativamente mais alto em pacientes com CaP do que pacientes sem o tumor. Este peptídeo é capaz de induzir os linfócitos T citotóxicos ficarem reativos a células cancerígenas a partir de células mononucleares de sangue periférico em pessoas com os alelos HLA-A11, HLA-A31 e HLA-A33, mas não com HLA-A2. Assim, o peptídeo pode ser aplicável como uma vacina contra o CaP (Mohamed, Naito et al. 2009). No entanto, a expressão gênica deste gene foi reduzida no CaP em relação à HPB, mas não quer dizer que o nível do peptídeo circulante esteja reduzido.

Dos genes que são regulados por androgênios, encontramos o gene induzido por androgênio 1 (AIG1) expresso somente no grupo CaP. Este é descrito como ativador do fator nuclear das células T ativadas (NFAT), sugerindo um mecanismo de ação envolvido na modificação intracelular da homeostase do  $Ca^{+2}$  (Nickel, Cleven et al. 2016). Já o gene SPDEF apresentou expressão maior no grupo CaP. A expressão deste gene é limitada às células epiteliais de próstata, mama, pulmão, ovário e cólon. O papel de SPDEF na tumorigênese é incerto, pois estudos relatam este gene tanto como promotor quanto como supressor tumoral (Steffan, Koul et al. 2012). Um estudo de Turner et al. demonstra a redução da capacidade de invasão em células de câncer de mama quando SPDEF é introduzido e aumento da migração quando ele é removido (Turner, Moussa et al. 2007). Além disso, SPDEF tem sido mostrado como regulador de processos envolvendo a mobilidade e a invasão celular em tumores de próstata e a perda da expressão durante a progressão tumoral, juntamente com o aumento da expressão de

matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) é capaz de promover a invasão tumoral (Kim, Kang et al. 2014). Stefan et al. encontraram que a expressão de SPDEF é reduzida ou perdida em estágios avançados de CaP e sugerem que a expressão de SPDEF suprime um fenótipo agressivo do CaP. Assim, a expressão de SPDEF estaria associada a um prognóstico favorável de CaP localizado, o que, por sua vez, corrobora com nosso estudo em que encontramos elevada expressão de SPDEF em relação ao tecido hiperplásico pelo fato de estudarmos CaP primário.

Outro gene que apresentou expressão elevada no grupo CaP foi o gene RDH11. Este codifica uma enzima microssomal com atividade retinal desidrogenase/redutase (Kedishvili, Chumakova et al. 2002). A expressão desse gene é localizada principalmente no epitélio prostático e regulado por androgênios na linhagem celular LNCaP (Moore, Pritchard et al. 2002). Esta enzima pode produzir retinol a partir de retinaldeído e sabe-se que o ácido retinóico desempenha um papel importante na ativação do receptor de ácido retinóico que é requerido para a diferenciação normal do epitélio prostático. Os níveis celulares de ácido retinóico são altamente controlados em vários níveis do metabolismo: biossíntese, degradação e armazenamento. Alterações na sinalização do ácido retinóico são eventos iniciais na carcinogênese e a deficiência de vitamina A tem sido associada a uma maior incidência de CaP, sendo demonstrado que os níveis de ácido retinóico são de cinco a oito vezes menores no câncer de próstata humano do que nas células normais da próstata (Kedishvili, Chumakova et al. 2002). Assim, tendo encontrado a expressão elevada de RNAm deste gene, é possível que os níveis de ácido retinóico ainda não estejam diminuídos, e isso, é um fator contrário a progressão tumoral.

O gene PART1 apresentou expressão reduzida no grupo CaP. Este é descrito como expresso principalmente em tecido prostático e glândulas salivares. A proteína codificada por este gene esta frequentemente presente em níveis mais altos em CaP do que HPB, o que sugere que a expressão de PART1 é alterada durante o câncer. Assim, a expressão de PART1 indica que

esta pode ter valor como biomarcador circulante adicional do CaP. Além disso, a elevada expressão de PART1 é notada em células de câncer de próstata sensíveis aos androgênios, mas não em células de câncer de próstata andrógeno-independentes (Yu, Blackburn et al. 2003). Levando em consideração estes dados, o resultado encontrado em nosso trabalho de expressão reduzida de PART1 acompanha a expressão reduzida de AR, e como PART1 é um gene regulado por AR, pode ser devido a isso a expressão reduzida.

Por fim, o gene que codifica a globulina ligadora de hormônio esteroide SHBG não teve expressão identificada em nenhum dos grupos. Sabe-se que esta proteína é sintetizada no fígado, mas a expressão de RNAm em próstata já foi identificada em células de linhagens de CaP (LNCaP, DU145 e PC3)(Hryb, Nakhla et al. 2002). No entanto, o gene SHBG está localizado no cromossomo 17p13.1, apenas 30 kb de distância gene supressor tumoral p53 e dentro de uma região conhecida por sofrer deleções e mutações em uma grande variedade de tumores, incluindo o CaP. Assim, os eventos genômicos que alteram este locus também podem alterar a expressão deste gene (Kahn, Hryb et al. 2002).

Devido a grande quantidade de genes analisados e as mais variadas funções descritas, o nosso estudo demonstra a grande heterogeneidade de um tumor. Ao mesmo tempo que temos a expressão de genes que codificam proteínas que atuam no sentido de combater a progressão tumoral, temos genes que atuam como facilitadores desta progressão. Contudo, os resultados apresentam uma tendência mostrando que além da diminuição da expressão gênica de AR, temos a localização predominantemente citoplasmática desse receptor, a expressão da maioria dos reguladores negativos do AR aumentada ou expressa somente no grupo CaP e dos reguladores negativos reduzida no grupo CaP, dos reguladores positivos da proliferação diminuídos no grupo CaP e dos reguladores negativos da proliferação aumentados no CaP. Como estudamos um câncer primário, acredita-se que essa heterogeneidade de

expressão ainda seja na tentativa de reverter o processo tumoral. Portanto, a partir deste trabalho, abrem-se portas para estudos específicos da regulação de genes com o AR e o ciclo celular, para o melhor entendimento acerca do microambiente tumoral.

## Conclusão

- Os genes analisados através do ensaio HumanAndrogenTaqman Plate Array apresentam expressão diferencial em amostras microdissecadas do grupo HPB e CaP.
- 7 genes apresentaram maior expressão no grupo CaP em relação ao grupo HPB, 40 genes apresentaram menor expressão no grupo CaP em relação ao grupo HPB, 17 genes foram expressos somente no grupo CaP, 21 genes não foram expressos em nenhum dos grupos e 7 genes apresentaram expressão em ambos os grupos, mas não foi possível realizar análise entre os mesmos.
- A expressão proteica do AR foi predominantemente nuclear em HPB e citoplasmática em CaP evidenciando que este está em maior parte em sua conformação inativa no grupo CaP. A expressão de BRCA1 demonstrou uma fraca marcação em núcleos de HPB e no citoplasma do CaP, o que é associado a problemas no transporte deste receptor e a proteína NKX3-1 apresentou intensa coloração tanto no núcleo quanto no citoplasma do CaP, sendo a porcentagem maior do que no citoplasma e núcleo do grupo HPB.
- Acredita-se que devido à reduzida expressão gênica do AR e a expressão predominantemente citoplasmática deste receptor, a sinalização androgênica mediada pelo AR não está ocorrendo de forma tão intensa. Além disso, a maioria dos genes que favorecem a proliferação e aumento da atividade transcricional do AR estão com expressão reduzida no CaP, e a maioria dos genes que são reguladores negativos da proliferação e da atividade do AR são expressos somente no CaP ou apresentam expressão aumentada no CaP. Portanto, por se tratar de um CaP primário, é possível que vias regulatórias ainda estejam ativadas visando a contenção tumoral.

## Referências:

- ACS. (2016). "American Cancer Society: What are the key statistics about prostate cancer?" Retrieved 17/10/2016
- 2016.
- Allen, B. L. and D. J. Taatjes (2015). "The Mediator complex: a central integrator of transcription." *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**(3): 155-166.
- Alur, M., M. M. Nguyen, et al. (2009). "Suppressive roles of calreticulin in prostate cancer growth and metastasis." *Am J Pathol* **175**(2): 882-890.
- Araki, S., Y. Omori, et al. (2007). "Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer." *Cancer Res* **67**(14): 6854-6862.
- Asgari, M. and A. Morakabati (2011). "Estrogen receptor beta expression in prostate adenocarcinoma." *Diagn Pathol* **6**: 61.
- Attar, N. and S. K. Kurdistani (2016). "Exploitation of EP300 and CREBBP Lysine Acetyltransferases by Cancer." *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- Bartholow, T. L., U. R. Chandran, et al. (2011). "Immunohistochemical profiles of claudin-3 in primary and metastatic prostatic adenocarcinoma." *Diagn Pathol* **6**: 12.
- Berry, S. J., D. S. Coffey, et al. (1984). "The development of human benign prostatic hyperplasia with age." *J Urol* **132**(3): 474-479.
- Burkhard, F. Z., S. Parween, et al. (2016). "P450 Oxidoreductase deficiency: Analysis of mutations and polymorphisms." *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Bushey, R. T., G. Chen, et al. (2011). "Characterization of UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (UGT2A1) variants and their potential role in tobacco carcinogenesis." *Pharmacogenet Genomics* **21**(2): 55-65.
- Caffo, O., F. Maines, et al. (2016). "Splice Variants of Androgen Receptor and Prostate Cancer." *Oncol Rev* **10**(1): 297.
- Carson, C., 3rd and R. Rittmaster (2003). "The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia." *Urology* **61**(4 Suppl 1): 2-7.
- Castro, E. and R. Eeles (2012). "The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer." *Asian J Androl* **14**(3): 409-414.
- Chen, W., I. Rogatsky, et al. (2006). "MED14 and MED1 differentially regulate target-specific gene activation by the glucocorticoid receptor." *Mol Endocrinol* **20**(3): 560-572.
- Chiappetta, G., T. Valentino, et al. (2015). "PATZ1 acts as a tumor suppressor in thyroid cancer via targeting p53-dependent genes involved in EMT and cell migration." *Oncotarget* **6**(7): 5310-5323.
- De Leon, J. T., A. Iwai, et al. (2011). "Targeting the regulation of androgen receptor signaling by the heat shock protein 90 cochaperone FKBP52 in prostate cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(29): 11878-11883.
- Dean, J. L. and K. E. Knudsen (2013). "The role of tumor suppressor dysregulation in prostate cancer progression." *Curr Drug Targets* **14**(4): 460-471.
- di Luccio, E. (2015). "Inhibition of Nuclear Receptor Binding SET Domain 2/Multiple Myeloma SET Domain by LEM-06 Implication for Epigenetic Cancer Therapies." *J Cancer Prev* **20**(2): 113-120.
- Dorkin, T. J., M. C. Robinson, et al. (1999). "FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease." *Oncogene* **18**(17): 2755-2761.
- Feng, J., L. Li, et al. (2016). "Androgen and AR contribute to breast cancer development and metastasis: an insight of mechanisms." *Oncogene*.

- Fiorentino, M., G. Judson, et al. (2010). "Immunohistochemical expression of BRCA1 and lethal prostate cancer." *Cancer Res* **70**(8): 3136-3139.
- Gandour-Edwards, R., P. C. Mack, et al. (2004). "Abnormalities of apoptotic and cell cycle regulatory proteins in distinct histopathologic components of benign prostatic hyperplasia." *Prostate Cancer Prostatic Dis* **7**(4): 321-326.
- Garraway, W. M., G. N. Collins, et al. (1991). "High prevalence of benign prostatic hypertrophy in the community." *Lancet* **338**(8765): 469-471.
- Gathercole, L. L., G. G. Lavery, et al. (2013). "11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1: translational and therapeutic aspects." *Endocr Rev* **34**(4): 525-555.
- Gauthier-Landry, L., A. Belanger, et al. (2015). "Multiple roles for UDP-glucuronosyltransferase (UGT)2B15 and UGT2B17 enzymes in androgen metabolism and prostate cancer evolution." *J Steroid Biochem Mol Biol* **145**: 187-192.
- Gong, A. Y., A. N. Eischeid, et al. (2012). "miR-17-5p targets the p300/CBP-associated factor and modulates androgen receptor transcriptional activity in cultured prostate cancer cells." *BMC Cancer* **12**: 492.
- Gross, M., B. Liu, et al. (2001). "Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells." *Oncogene* **20**(29): 3880-3887.
- Guo, Z., X. Yang, et al. (2009). "A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth." *Cancer Res* **69**(6): 2305-2313.
- Gurel, B., T. Z. Ali, et al. (2010). "NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors." *Am J Surg Pathol* **34**(8): 1097-1105.
- Gutierrez-Pajares, J. L., C. Ben Hassen, et al. (2016). "SR-BI: Linking Cholesterol and Lipoprotein Metabolism with Breast and Prostate Cancer." *Front Pharmacol* **7**: 338.
- Halaby, M. J., R. Hakem, et al. (2013). "Pirh2: an E3 ligase with central roles in the regulation of cell cycle, DNA damage response, and differentiation." *Cell Cycle* **12**(17): 2733-2737.
- Hamburger, A. W. (2008). "The role of ErbB3 and its binding partners in breast cancer progression and resistance to hormone and tyrosine kinase directed therapies." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **13**(2): 225-233.
- Hillebrand, A. C. (2013). Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata e a sua possível associação com a agressividade do tumor. *Fisiologia*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia.
- Hoang, D. T., K. A. Iczkowski, et al. (2016). "Androgen receptor-dependent and -independent mechanisms driving prostate cancer progression: Opportunities for therapeutic targeting from multiple angles." *Oncotarget*.
- Hoefler, J., G. Schafer, et al. (2012). "PIAS1 is increased in human prostate cancer and enhances proliferation through inhibition of p21." *Am J Pathol* **180**(5): 2097-2107.
- Hryb, D. J., A. M. Nakhla, et al. (2002). "Sex hormone-binding globulin in the human prostate is locally synthesized and may act as an autocrine/paracrine effector." *J Biol Chem* **277**(29): 26618-26622.
- Hu, R., T. A. Dunn, et al. (2009). "Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer." *Cancer Res* **69**(1): 16-22.
- Ilic, D. and M. Misso (2012). "Lycopene for the prevention and treatment of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: a systematic review." *Maturitas* **72**(4): 269-276.
- INCA. (2016). "PROSTATE." Retrieved 17/10/2016, 2016.
- Ischia, J., O. Patel, et al. (2014). "Expression and function of gastrin-releasing peptide (GRP) in normal and cancerous urological tissues." *BJU Int* **113** Suppl 2: 40-47.

- Jiang, W. G. and R. J. Ablin (2011). "Prostate transglutaminase: a unique transglutaminase and its role in prostate cancer." *Biomark Med* **5**(3): 285-291.
- Jin, Y., S. Qu, et al. (2013). "Molecular circuit involving KLK4 integrates androgen and mTOR signaling in prostate cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(28): E2572-2581.
- Kaarbo, M., T. I. Klock, et al. (2007). "Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer." *Bioessays* **29**(12): 1227-1238.
- Kahn, S. M., D. J. Hryb, et al. (2002). "Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells." *J Endocrinol* **175**(1): 113-120.
- Kai H. Hammerich, G. E. A., and Thomas M. Wheeler (2009). "Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer." *Cambridge University Press*.
- Kedishvili, N. Y., O. V. Chumakova, et al. (2002). "Evidence that the human gene for prostate short-chain dehydrogenase/reductase (PSDR1) encodes a novel retinal reductase (RalR1)." *J Biol Chem* **277**(32): 28909-28915.
- Kgatle, M. M., A. A. Kalla, et al. (2016). "Prostate Cancer: Epigenetic Alterations, Risk Factors, and Therapy." *Prostate Cancer* **2016**: 5653862.
- Kim, I. J., T. W. Kang, et al. (2014). "HOXB13 regulates the prostate-derived Ets factor: implications for prostate cancer cell invasion." *Int J Oncol* **45**(2): 869-876.
- Kim, J. H., J. M. Lee, et al. (2007). "SUMOylation of pontin chromatin-remodeling complex reveals a signal integration code in prostate cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(52): 20793-20798.
- Kim, S. H., W. S. Park, et al. (2016). "Overexpression of BRCA1 or BRCA2 in prostatectomy specimens is predictive of biochemical recurrence after radical prostatectomy." *Histopathology* **68**(5): 673-679.
- Krstanoski, Z., N. K. Vokac, et al. (2016). "TMPRSS2:ERG gene aberrations may provide insight into pT stage in prostate cancer." *BMC Urol* **16**(1): 35.
- Labrie, F., A. Belanger, et al. (2005). "Gonadotropin-releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer." *Endocr Rev* **26**(3): 361-379.
- Lavecchia, A., A. Coluccia, et al. (2008). "Cdc25B phosphatase inhibitors in cancer therapy: latest developments, trends and medicinal chemistry perspective." *Anticancer Agents Med Chem* **8**(8): 843-856.
- Leach, D. A., E. F. Need, et al. (2014). "Hic-5 influences genomic and non-genomic actions of the androgen receptor in prostate myofibroblasts." *Mol Cell Endocrinol* **384**(1-2): 185-199.
- Leung, Y. K., H. M. Lam, et al. (2010). "Estrogen receptor beta2 and beta5 are associated with poor prognosis in prostate cancer, and promote cancer cell migration and invasion." *Endocr Relat Cancer* **17**(3): 675-689.
- Li, H., A. A. Mohamed, et al. (2015). "Silencing of PMEPA1 accelerates the growth of prostate cancer cells through AR, NEDD4 and PTEN." *Oncotarget* **6**(17): 15137-15149.
- Li, X., C. Zhu, et al. (2011). "ZMIZ1 preferably enhances the transcriptional activity of androgen receptor with short polyglutamine tract." *PLoS One* **6**(9): e25040.
- Lin, B., A. G. Utleg, et al. (2008). "WDR19 expression is increased in prostate cancer compared with normal cells, but low-intensity expression in cancers is associated with shorter time to biochemical failures and local recurrence." *Clin Cancer Res* **14**(5): 1397-1406.
- Lin, B., J. T. White, et al. (2003). "Isolation and characterization of human and mouse WDR19, a novel WD-repeat protein exhibiting androgen-regulated expression in prostate epithelium." *Genomics* **82**(3): 331-342.
- Lin, D. Y., H. I. Fang, et al. (2004). "Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx." *Mol Cell Biol* **24**(24): 10529-10541.
- Liu, G., C. Sprenger, et al. (2015). "MED1 mediates androgen receptor splice variant induced gene expression in the absence of ligand." *Oncotarget* **6**(1): 288-304.

- Liu, H., J. Yin, et al. (2015). "FOXO3a modulates WNT/beta-catenin signaling and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells." *Cell Signal* **27**(3): 510-518.
- Liu, T., Y. Li, et al. (2013). "p21-Activated kinase 6 (PAK6) inhibits prostate cancer growth via phosphorylation of androgen receptor and tumorigenic E3 ligase murine double minute-2 (Mdm2)." *J Biol Chem* **288**(5): 3359-3369.
- Lose, F., S. Srinivasan, et al. (2012). "Genetic association of the KLK4 locus with risk of prostate cancer." *PLoS One* **7**(9): e44520.
- Lu, Y. C., W. C. Weng, et al. (2015). "Functional roles of calreticulin in cancer biology." *Biomed Res Int* **2015**: 526524.
- Luef, B., F. Handle, et al. (2016). "The AR/NCOA1 axis regulates prostate cancer migration by involvement of PRKD1." *Endocr Relat Cancer* **23**(6): 495-508.
- Mazaris, E. and A. Tsiotras (2013). "Molecular pathways in prostate cancer." *Nephrourol Mon* **5**(3): 792-800.
- McDougal, W. S., A. J. Wein, et al. (2011). *Campbell-Walsh Urology*.
- Minutoli, L., M. Rinaldi, et al. (2016). "Apoptotic Pathways Linked to Endocrine System as Potential Therapeutic Targets for Benign Prostatic Hyperplasia." *Int J Mol Sci* **17**(8).
- Mitkevich, V. A., O. V. Kretova, et al. (2013). "Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells." *Biochimie* **95**(6): 1344-1349.
- Modena, A., R. Iacovelli, et al. (2016). "Investigating BRCA Mutations: A Breakthrough in Precision Medicine of Castration-Resistant Prostate Cancer." *Target Oncol*.
- Mohamed, E. R., M. Naito, et al. (2009). "Capability of SART3(109-118) peptide to induce cytotoxic T lymphocytes from prostate cancer patients with HLA class I-A11, -A31 and -A33 alleles." *Int J Oncol* **34**(2): 529-536.
- Moore, S., C. Pritchard, et al. (2002). "Isolation and characterization of the murine prostate short-chain dehydrogenase/reductase 1 (Psdr1) gene, a new member of the short-chain steroid dehydrogenase/reductase family." *Gene* **293**(1-2): 149-160.
- Mori, R., Q. Wang, et al. (2008). "Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer." *Prostate* **68**(14): 1555-1560.
- Mukherjee, S., O. Cruz-Rodriguez, et al. (2012). "The in vivo role of androgen receptor SUMOylation as revealed by androgen insensitivity syndrome and prostate cancer mutations targeting the proline/glycine residues of synergy control motifs." *J Biol Chem* **287**(37): 31195-31206.
- Nagakubo, D., T. Taira, et al. (1997). "DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras." *Biochem Biophys Res Commun* **231**(2): 509-513.
- Nebert, D. W. and T. P. Dalton (2006). "The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* **6**(12): 947-960.
- Ngan, E. S., Y. Hashimoto, et al. (2003). "Overexpression of Cdc25B, an androgen receptor coactivator, in prostate cancer." *Oncogene* **22**(5): 734-739.
- Nickel, N., A. Cleven, et al. (2016). "Androgen-inducible gene 1 increases the ER Ca(2+) content and cell death susceptibility against oxidative stress." *Gene* **586**(1): 62-68.
- Nicolaiew, N., G. Cancel-Tassin, et al. (2009). "Association between estrogen and androgen receptor genes and prostate cancer risk." *Eur J Endocrinol* **160**(1): 101-106.
- Niu, Y. N. and S. J. Xia (2009). "Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer." *Asian J Androl* **11**(1): 28-35.
- Ntais, C., A. Polycarpou, et al. (2003). "Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes." *Eur J Endocrinol* **149**(6): 469-477.

- Osman, W. M., R. M. Abd El Atti, et al. (2013). "DJ-1 and androgen receptor immunohistochemical expression in prostatic carcinoma: a possible role in carcinogenesis." *J Egypt Natl Canc Inst* **25**(4): 223-230.
- Paavonen, K., N. Ekman, et al. (2004). "Bmx tyrosine kinase transgene induces skin hyperplasia, inflammatory angiogenesis, and accelerated wound healing." *Mol Biol Cell* **15**(9): 4226-4233.
- Puto, L. A., J. Brognard, et al. (2015). "Transcriptional Repressor DAXX Promotes Prostate Cancer Tumorigenicity via Suppression of Autophagy." *J Biol Chem* **290**(25): 15406-15420.
- Ribeiro-Silva, A.; G. S. B.; et al. (2005). "Prognostic impact of BRCA1 immunohistochemistry expression in sporadic breast carcinomas." *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **v. 41 • n. 3 • p. 197-203**.
- Ricciardelli, C., C. S. Choong, et al. (2005). "Androgen receptor levels in prostate cancer epithelial and peritumoral stromal cells identify non-organ confined disease." *Prostate* **63**(1): 19-28.
- Rotinen, M., J. Celay, et al. (2009). "Estradiol induces type 8 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression: crosstalk between estrogen receptor alpha and C/EBPbeta." *J Endocrinol* **200**(1): 85-92.
- Santio, N. M., M. Salmela, et al. (2016). "The PIM1 kinase promotes prostate cancer cell migration and adhesion via multiple signalling pathways." *Exp Cell Res* **342**(2): 113-124.
- Sc, P., W. Jm, et al. (2016). "Androgen receptor phosphorylation status at serine 578 predicts poor outcome in prostate cancer patients." *Oncotarget*.
- Schayek, H., K. Haugk, et al. (2009). "Tumor suppressor BRCA1 is expressed in prostate cancer and controls insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) gene transcription in an androgen receptor-dependent manner." *Clin Cancer Res* **15**(5): 1558-1565.
- Shaikhibrahim, Z., A. Offermann, et al. (2014). "MED12 overexpression is a frequent event in castration-resistant prostate cancer." *Endocr Relat Cancer* **21**(4): 663-675.
- Sharma, M., X. Li, et al. (2003). "hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci." *EMBO J* **22**(22): 6101-6114.
- Sharma, M., M. Zarnegar, et al. (2000). "Androgen receptor interacts with a novel MYST protein, HBO1." *J Biol Chem* **275**(45): 35200-35208.
- She, Z. Y. and W. X. Yang (2016). "Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development?" *Semin Cell Dev Biol*.
- Shiota, M., N. Fujimoto, et al. (2015). "SRD5A gene polymorphism in Japanese men predicts prognosis of metastatic prostate cancer with androgen-deprivation therapy." *Eur J Cancer* **51**(14): 1962-1969.
- Shukla, S. (2014). "FOXO3a: A Potential Target in Prostate Cancer." *Austin J Urol* **1**(1).
- Song, J., Y. Mu, et al. (2016). "APPL proteins promote TGFbeta-induced nuclear transport of the TGFbeta type I receptor intracellular domain." *Oncotarget* **7**(1): 279-292.
- Statkiewicz, M., N. Maryan, et al. (2014). "The role of the SHH gene in prostate cancer cell resistance to paclitaxel." *Prostate* **74**(11): 1142-1152.
- Steffan, J. J., S. Koul, et al. (2012). "The transcription factor SPDEF suppresses prostate tumor metastasis." *J Biol Chem* **287**(35): 29968-29978.
- Sureshbabu, A., E. Tonner, et al. (2011). "Insulin-like growth factor binding proteins and mammary gland development." *Int J Dev Biol* **55**(7-9): 781-789.
- Tan, P. Y., C. W. Chang, et al. (2012). "Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival." *Mol Cell Biol* **32**(2): 399-414.

- Turner, D. P., O. Moussa, et al. (2007). "Prostate-derived ETS factor is a mediator of metastatic potential through the inhibition of migration and invasion in breast cancer." Cancer Res **67**(4): 1618-1625.
- Udensi, U. K. and P. B. Tchounwou (2016). "Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis." J Exp Clin Cancer Res **35**(1): 139.
- Vijayvargia, R., M. S. May, et al. (2007). "A coregulatory role for the mediator complex in prostate cancer cell proliferation and gene expression." Cancer Res **67**(9): 4034-4041.
- Wadhwa, B. and R. Dumbre (2016). "Achieving resistance specificity in prostate cancer." Chem Biol Interact.
- Waugh, D. J. and C. Wilson (2008). "The interleukin-8 pathway in cancer." Clin Cancer Res **14**(21): 6735-6741.
- Wu, D., A. Cheung, et al. (2016). "The emerging roles of orphan nuclear receptors in prostate cancer." Biochim Biophys Acta **1866**(1): 23-36.
- Xiang, G., Y. Yi, et al. (2015). "TGIF1 promoted the growth and migration of cancer cells in nonsmall cell lung cancer." Tumour Biol **36**(12): 9303-9310.
- Xie, Y. and S. Bayakhmetov (2016). "PIM1 kinase as a promise of targeted therapy in prostate cancer stem cells." Mol Clin Oncol **4**(1): 13-17.
- Yang, C. C., A. Chung, et al. (2014). "Systems analysis of the prostate tumor suppressor NKX3.1 supports roles in DNA repair and luminal cell differentiation." F1000Res **3**: 115.
- Yang, C. K., J. H. Kim, et al. (2006). "Differential use of functional domains by coiled-coil coactivator in its synergistic coactivator function with beta-catenin or GRIP1." J Biol Chem **281**(6): 3389-3397.
- Yang, L., H. K. Lin, et al. (2003). "APPL suppresses androgen receptor transactivation via potentiating Akt activity." J Biol Chem **278**(19): 16820-16827.
- Yu, L., G. L. Blackburn, et al. (2003). "Genistein and daidzein downregulate prostate androgen-regulated transcript-1 (PART-1) gene expression induced by dihydrotestosterone in human prostate LNCaP cancer cells." J Nutr **133**(2): 389-392.
- Yuan, X., M. L. Lu, et al. (2001). "SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity." J Biol Chem **276**(49): 46647-46654.
- Zeiss. (2015). "Microdissecção a laser para isolar tecido de alta pureza", from [http://www.zeiss.com.br/microscopy/pt\\_br/produtos/microdisseccao-a-laser/microbeam.html](http://www.zeiss.com.br/microscopy/pt_br/produtos/microdisseccao-a-laser/microbeam.html).
- Zhang, A., J. Zhang, et al. (2016). "Classical and Non-Classical Roles for Pre-Receptor Control of DHT Metabolism in Prostate Cancer Progression." Horm Cancer **7**(2): 104-113.

## Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com HPB

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

#### Sinalização androgênica em tumores de próstata

Prezado Senhor \_\_\_\_\_

Estamos conduzindo um estudo para identificar genes relacionados com a formação de tumores prostáticos. Dentre estes, a hiperplasia prostática benigna consiste em uma alteração proliferativa que causa um crescimento benigno da glândula prostática, sendo considerada a doença mais prevalente da próstata.

Como o senhor tem o diagnóstico de hiperplasia prostática benigna e lhe foi recomendada cirurgia para a retirada da glândula, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que tenhamos acesso ao seu prontuário para obtenção de informações necessárias para a pesquisa e que após a retirada da peça cirúrgica, dois pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético (análise da expressão de genes e proteínas). O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia, e este procedimento não apresenta risco adicional conhecido para sua saúde, limitando-se aos procedimentos que já serão usados em sua cirurgia.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras de tecido por 5 anos em nosso biorrepositório de pesquisa para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (neste caso, a cada nova pesquisa realizada o Sr. será contatado para que assine um novo Termo de Consentimento caso deseje participar e estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação de características genéticas específicas de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

- ( ) Aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.
- ( ) Não aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em prejuízo a seu atendimento neste Hospital. Não haverá despesa para sua participação neste projeto. O senhor receberá uma via deste termo de consentimento, sendo que a qualquer momento o seu consentimento em participar deste estudo

poderá ser retirado. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

A pesquisadora responsável por este projeto é a Prof<sup>a</sup>. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, UFRGS, telefone 51 33083559). Caso o senhor tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar no telefone indicado acima. Outras dúvidas podem também ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h no HCPA, telefone 51 33598304.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi uma via deste termo de consentimento e também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data: \_\_\_\_\_

Paciente ou responsável (nome legível): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com CaP

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

#### Sinalização androgênica em tumores de próstata

Prezado Senhor \_\_\_\_\_

Estamos conduzindo um estudo para identificar genes relacionados com a formação de tumores prostáticos. Dentre as doenças prostáticas, o câncer de próstata apresenta alta incidência na população e a expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar à formação tumoral.

Como o senhor tem o diagnóstico de câncer de próstata e lhe foi recomendada cirurgia para a retirada da glândula, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que tenhamos acesso ao seu prontuário para obtenção de informações necessárias para a pesquisa e que após a retirada da peça cirúrgica, três pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético (análise da expressão de genes e proteínas). O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia, e este procedimento não apresenta risco adicional conhecido para sua saúde, limitando-se aos procedimentos que já serão usados em sua cirurgia.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras de tecido por 5 anos em nosso biorrepositório de pesquisa para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (neste caso, a cada nova pesquisa realizada o Sr. será contatado para que assine um novo Termo de Consentimento caso deseje participar e estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação de características genéticas específicas de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

- ( ) Aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.
- ( ) Não aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para investigações futuras.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em prejuízo a seu atendimento neste Hospital. Não haverá despesa para sua

participação neste projeto. O senhor receberá uma via deste termo de consentimento, sendo que a qualquer momento o seu consentimento em participar deste estudo poderá ser retirado. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

A pesquisadora responsável por este projeto é a Prof<sup>a</sup>. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, UFRGS, telefone 51 33083559). Caso o senhor tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar no telefone indicado acima. Outras dúvidas podem também ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), de segunda à sexta-feira, das 8h às 17h no HCPA, telefone 51 33598304.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi uma via deste termo de consentimento e também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data: \_\_\_\_\_

Paciente ou responsável (nome legível): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_