

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

Vitória Machado Krüger

**ANÁLISE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DOS HORMÔNIOS
ESTEROIDES EM TUMORES DE PRÓSTATA**

Porto Alegre
2018

Vitória Machado Krüger

**ANÁLISE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DOS HORMÔNIOS
ESTEROIDES EM TUMORES DE PRÓSTATA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Biologia Molecular

Orientadora: Dr^a. Lolita Schneider Pizzolato
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

CIP - Catalogação na Publicação

Machado Krüger, Vitória
ANÁLISE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DOS
HORMÔNIOS ESTEROIDES EM TUMORES DE PRÓSTATA / Vitória
Machado Krüger. -- 2018.
59 f.
Orientadora: Lolita Schneider Pizzolato.

Coorientadora: Ilma Simoni Brum da Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Câncer de Próstata. 2. Hiperplasia Prostática
Benigna. 3. Esteroidogênese. 4. Androgênios. 5.
Estrogênios. I. Schneider Pizzolato, Lolita, orient.
II. Simoni Brum da Silva, Ilma, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Vitória Machado Krüger

**ANÁLISE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DOS HORMÔNIOS
ESTEROIDES EM TUMORES DE PRÓSTATA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Doutoranda Letícia Viçosa Pires - PPGGO - UFRGS

Prof^a. Dr^a. Gisele Branchini - UFCSPA

Dr^a. Lolita Schneider Pizzolato - UFRGS (orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha querida orientadora Dr^a. Lolita Schneider Pizzolato por todo auxílio e paciência durante esses 6 meses de trabalho. Tu foi essencial para o desenvolvimento desse estudo!

Agradeço a minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório, pela confiança e por todo conhecimento que adquiri no período que realizei Iniciação Científica.

Agradeço também aos colegas do laboratório, que de outras formas me auxiliaram a conduzir este projeto e estiveram sempre à disposição para esclarecer todas as minhas dúvidas.

Agradeço especialmente a minha amiga Ana Paula de Bortoli, que esteve sempre ao meu lado, me auxiliando e me tranquilizando em todos os momentos.

Por fim, agradeço a minha família e aos meus amigos que estiveram sempre presentes e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento durante esta etapa.

À minha querida mãe, um agradecimento especial pelo carinho e por toda confiança depositada em mim. Te amo!

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) e a hiperplasia prostática benigna (HPB) são as doenças prostáticas mais comuns em idosos, e ambas são caracterizadas por alterações no controle e crescimento da próstata. Os hormônios esteroides, principalmente os androgênios, desempenham um papel central na manutenção e progressão dessas doenças, atuando através da ativação de receptores intracelulares específicos. A terapia de privação androgênica é uma das opções de tratamento mais comum para CaP e, embora resulte em um período de regressão clínica, muitos pacientes evoluem para um estágio conhecido como CaP resistente à castração. Diversos mecanismos têm sido associados a esses casos de resistência, incluindo a ativação da esteroidogênese intraprostática e consequente produção de androgênios e estrogênios intratumoral. Para que esse processo ocorra, além da presença de precursores hormonais na próstata, é necessário a ativação de algumas enzimas, como a 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase tipo 1 (3 β -HSD1) e a aromatase. Essas enzimas participam de etapas chave na via de síntese dos esteroides sexuais e sua expressão pode estar alterada nas doenças prostáticas. Além do papel dos androgênios na fisiopatologia da próstata, os estrogênios também possuem funções importantes e podem estar associados a um maior risco de CaP. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a expressão dos genes HSD3B1 e CYP19A1, que codificam as enzimas 3 β -HSD1 e aromatase, respectivamente, em tumores de próstata. A avaliação da expressão gênica foi realizada através da técnica de RT-qPCR em 22 amostras de CaP primário e 22 amostras de HPB provenientes de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. De acordo com os nossos resultados, o gene HSD3B1 foi identificado tanto em CaP quanto em HPB, porém, não apresentou diferença significativa de expressão entre os grupos analisados ($P=0,25$). Já o gene CYP19A1 foi identificado em ambos os grupos e apresentou diferença significativa entre eles, sendo maior no grupo HPB em comparação com o CaP ($*P=0,029$). Esse resultado sugere uma possível participação destes genes no desenvolvimento e/ou progressão dessas doenças, principalmente através da síntese intraprostática de esteroides sexuais. Entretanto, estudos suplementares são necessários para um melhor entendimento da função exata que eles desempenham e da sua influência na proliferação tumoral.

Palavras-chave: Câncer de próstata. Hiperplasia prostática benigna. Esteroidogênese. Androgênios. Estrogênios.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are the most common prostate diseases in the elderly, and both are characterized by changes in prostate control and growth. Steroid hormones, especially androgens, play a central role in the maintenance and progression of these diseases, acting through the activation of specific intracellular receptors. Androgen deprivation therapy is one of the most common treatment options for PCa, and although it results in a period of clinical regression, many patients eventually progress to a stage known as castration-resistant PCa. Several mechanisms have been associated with these cases of resistance, including the activation of intraprostatic steroidogenesis and consequent production of intratumoral androgens and estrogens. For this process occur, in addition to the presence of hormonal precursors in the prostate, it is necessary to activate some enzymes, such as 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase / Δ 5- Δ 4 isomerase type 1 (3 β -HSD1) and aromatase. These enzymes participate in key steps in the pathway of sexual steroid synthesis and their expression may be altered in prostatic diseases. In addition to the role of androgens in the pathophysiology of the prostate, estrogens also have important functions and may be associated with an increased risk of PCa. Therefore, the aim of this study was to evaluate the expression of the HSD3B1 and CYP19A1 genes, which encode the 3 β -HSD1 and aromatase enzymes, respectively, in prostate tumors. The evaluation of the gene expression was performed through the RT-qPCR technique in 22 primary PCa samples and 22 BPH samples from patients from the Hospital de Clínicas of Porto Alegre. According to our results, the HSD3B1 gene was identified in both PCa and BPH, but did not present significant difference of expression between the analyzed groups ($P=0.25$). The CYP19A1 gene was identified in both groups and showed a significant difference between them, being higher in the BPH group compared to the PCa ($*P=0.029$). This result evidences a possible participation of these genes in the development and/or progression of these diseases, mainly through the intraprostatic synthesis of sexual steroids. However, further studies are needed for a better understanding of the exact function they play and their influence on tumor proliferation.

Keywords: Prostate cancer. Benign prostatic hyperplasia. Steroidogenesis. Androgens. Estrogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização das regiões prostáticas.....	10
Figura 2 – Cânceres mais prevalentes em homens no mundo.....	12
Figura 3 – Esteroidogênese.....	16
Figura 4 – Vias $\Delta 5$ e $\Delta 4$	17
Figura 5 – Aromatase.....	18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	9
1.1 PRÓSTATA	9
1.2 HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA	10
1.3 CÂNCER DE PRÓSTATA	11
1.4 HORMÔNIOS ESTEROIDES	14
1.4.1 3β-hidroxiesteroide desidrogenase/Δ5-Δ4 isomerase	16
1.4.2 Aromatase	18
1.4.3 Androgênios	19
1.4.4 Esteroidogênese intraprostática	19
1.4.5 Estrogênios	21
2 JUSTIFICATIVAS	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 ARTIGO	24
4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “THE PROSTATE”	52
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	57

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 PRÓSTATA

A próstata é uma glândula acessória que faz parte do sistema genital masculino e sua principal função é contribuir para formação do líquido seminal através da secreção de um fluido alcalino composto por diversos íons e proteínas (HAYWARD; CUNHA, 2000). A glândula normal possui forma ovóide, pesa aproximadamente 20 g e está localizada na base da bexiga urinária, envolvendo parte da uretra. Estruturalmente, ela é formada por elementos glandulares e estroma fibromuscular e pode ser dividida em 3 regiões distintas, sendo a zona de transição e a periférica as mais relevantes clinicamente (Figura 1). A zona de transição compreende 5% a 10% do tecido glandular, e é nessa região onde ocorre a maioria das lesões hiperplásicas. Já a zona periférica compreende a maior parte do tecido glandular e é alvo de diversas doenças, principalmente carcinomas e prostatites. A zona central se expande em direção à base da bexiga, na forma de um cone, em torno dos ductos ejaculatórios (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; WEIN et al., 2016).

Os elementos glandulares da próstata são constituídos por ductos túbulo alveolares revestidos por um epitélio colunar pseudoestratificado e são responsáveis pela produção e drenagem de secreções prostáticas na uretra. Esses elementos são cercados por um estroma fibromuscular denso, composto principalmente por tecido conectivo, músculo liso e diversos tipos celulares, como fibroblastos e miofibroblastos (NIU; XIA, 2009; WHITE; XIE; VENTURA, 2013).

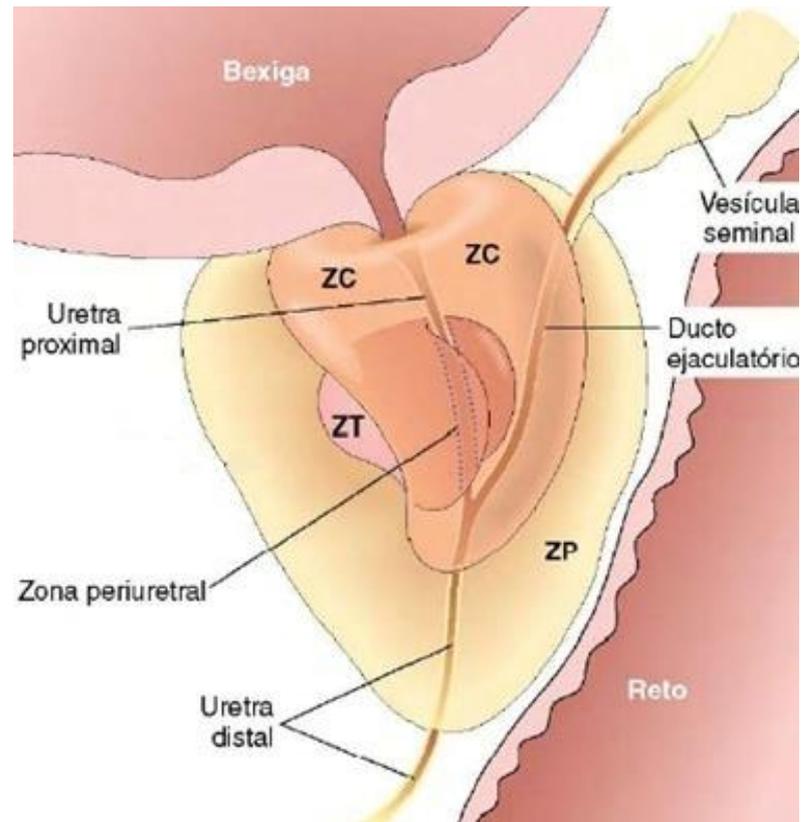


Figura 1. **Localização das regiões prostáticas:** Zona periférica (ZP), zona de transição (ZT) e zona central (ZC). Adaptada de (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

O desenvolvimento da glândula prostática é dependente de um sistema regulatório complexo, envolvendo a participação dos hormônios esteroides. Esses hormônios exercem seu efeito biológico através da ligação a receptores intracelulares específicos e indução da transcrição de genes alvo. Além de desempenhar um papel importante na diferenciação e no desenvolvimento normal da próstata, eles também estão envolvidos na iniciação e progressão de duas doenças muito prevalentes neste órgão: a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata (CARVALHO-SALLES; TAJARA, 1999).

1.2 HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é um diagnóstico histológico caracterizado pela proliferação não regulada do tecido conectivo, do músculo liso e do epitélio glandular na zona de transição prostática. Essa proliferação celular

progressiva leva ao aumento do volume da próstata e do tônus muscular estromal, o que pode causar a compressão física da uretra e originar diversos sintomas do trato urinário inferior (PATEL; PARSONS, 2014). Esses sintomas podem ser separados em sintomas de micção e armazenamento, e entre eles destacam-se a fraqueza do fluxo de urina, noctúria, frequência e urgência urinária (MOBLEY; FEIBUS; BAUM, 2015). A doença sintomática pode afetar de diversas formas o cotidiano dos homens com essa condição, interferindo em atividades habituais e causando uma diminuição geral da qualidade de vida. Quando o tratamento não é efetivo, pode ocorrer o surgimento de infecções e cálculos urinários (KIRBY, 2000).

Diversos fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento da HPB, incluindo fatores genéticos, hormonais e ambientais. Evidências sugerem que alterações do metabolismo e do estilo de vida são importantes na sua etiologia, incluindo obesidade, diabetes, dieta e exercício (PATEL; PARSONS, 2014). Além desses fatores, os androgênios também desempenham papel importante na sua progressão, pois alterações nos níveis desses hormônios podem levar a proliferação excessiva da glândula (CARSON; RITTMASER, 2003). Entre as alternativas de tratamento disponíveis, a ressecção transuretral de próstata é a terapia padrão mais utilizada. No entanto, recentemente, com o surgimento de novas abordagens terapêuticas, outras opções podem ser destacadas, como prostatectomia a laser, inserção de *stents* prostáticos, bloqueio α -adrenérgico e terapia hormonal (BARRY et al., 2017).

A HPB é uma doença muito prevalente, principalmente em homens mais velhos, afetando cerca de 50% dos homens com mais 50 anos de idade, com um aumento para 80% aos 80 anos de idade (CHUGHTAI et al., 2016). Nos Estados Unidos, cerca de 400.000 prostatectomias são realizadas anualmente, sendo um procedimento cirúrgico muito comum em idosos (BARRY et al., 2017).

1.3 CÂNCER DE PRÓSTATA

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2018), o câncer de próstata (CaP) é o segundo câncer mais frequente entre homens no Brasil (atrás apenas do câncer de pele do tipo não-melanoma) e o quarto tipo considerando ambos os sexos. Pelo fato de afetar um grande número de homens, geralmente com mais de 65 anos

de idade, ele é classificado como um câncer da terceira idade no mundo. Para o ano de 2018, no Brasil, foram estimados cerca de 68.220 novos casos da doença para cada 100 mil habitantes. Somente em Porto Alegre foram estimados 890 novos casos de CaP. A sua incidência varia pelo mundo, apresentando taxas mais elevadas nos países ocidentais, e taxas mais baixas em países do leste asiático. Nos Estados Unidos foram estimados 161,360 novos casos e 26,730 mortes pela doença para o ano de 2017 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). A figura 2 ilustra a distribuição geográfica dos cânceres mais prevalentes em homens no mundo, e evidencia o maior número de casos de CaP no continente americano.

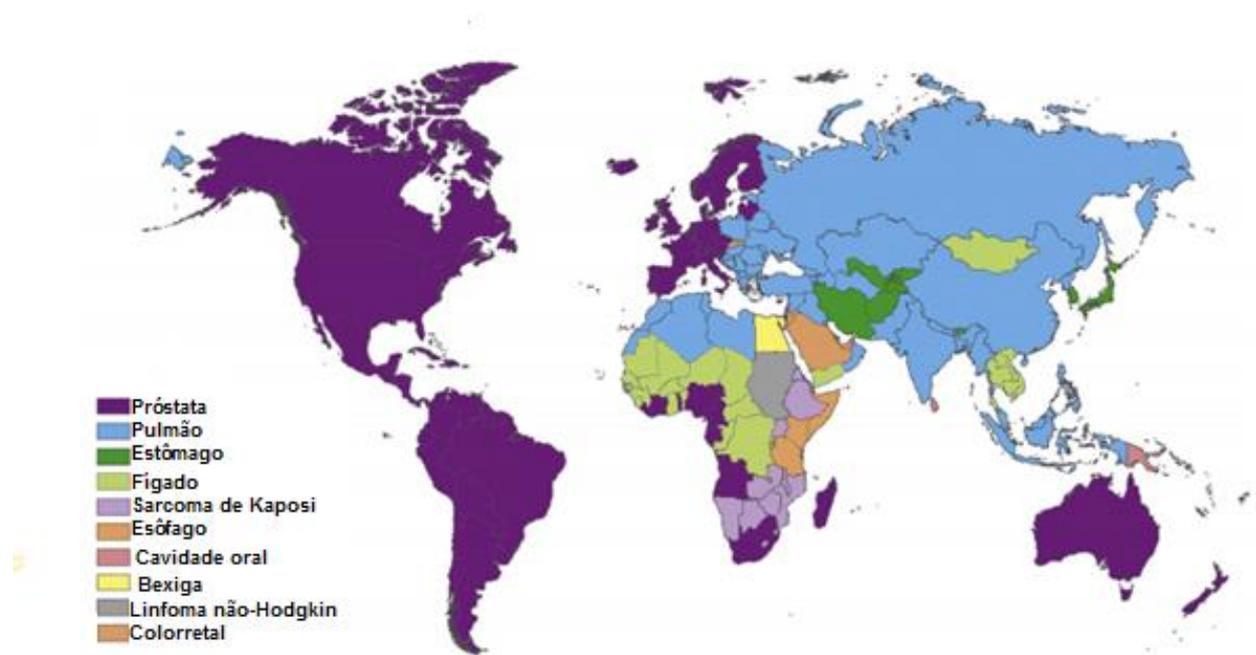


Figura 2. **Cânceres mais prevalentes em homens no mundo:** O maior número de casos diagnosticados de CaP é observado no continente americano. Adaptada de (CENTER et al., 2012).

Alguns fatores de risco importantes para o desenvolvimento da doença são a raça e a idade. Dados mostram que afro-americanos apresentam as maiores taxas de CaP no mundo, e que a sua incidência e mortalidade aumentam exponencialmente a partir dos 50 anos de idade, sendo rara a sua ocorrência antes desse período (CRAWFORD, 2003). Além desses dois fatores, a história familiar é outro fator de risco

estabelecido, visto que, parentes de primeiro grau de homens que possuem a doença tem o dobro do risco de desenvolvê-la (EELES et al., 2013).

A maior parte dos carcinomas de próstata envolve a zona periférica da glândula, porém, com a progressão tumoral, ele pode prolongar-se pela cápsula e crescer em direção à zona central (LEE et al., 1985). Metástases podem ocorrer em diferentes locais, mas os mais comumente afetados são os ossos, nódulos linfáticos, pulmões e fígado (KRISHNA; BERGAN, 2014). Outra característica do CaP é a capacidade de produzir padrões arquitetônicos distintos e múltiplos que geralmente são expressos dentro do mesmo tumor. Baseado nisso, o sistema de classificação histológica elaborado por Gleason classifica o câncer de acordo com a sua aparência microscópica através de um escore que varia de 2 a 10. Essa escore é o resultado da soma de dois graus presentes no tumor. Esses graus variam de 1 a 5, sendo que o grau primário representa a maior parte do tumor e o grau secundário está relacionado à menor parte dele. A soma desses dois graus fornece o valor final do escore. Quanto mais alto esse valor, mais agressivo é o tumor e pior é o prognóstico do paciente. Por exemplo, um escore de Gleason 7 pode resultar da soma dos graus 3+4 ou 4+3. Neste último caso o prognóstico é pior pois o grau mais agressivo (4) é predominante (HAMMERICH; AYALA; WHEELER, 2009).

Atualmente as principais ferramentas para diagnóstico do CaP incluem o exame de toque retal, biópsia guiada por ultrassom transretal e a dosagem do nível sanguíneo do antígeno prostático específico (PSA) (MOTTET et al., 2017). O PSA é oriundo do epitélio prostático e normalmente é secretado no sêmen. Sua principal função é clivar e liquefazer o coágulo seminal formado após a ejaculação. Ele é um importante marcador biológico de alterações prostáticas e em situações normais não ultrapassa o valor de 4,0 ng/mL. Apesar da análise do PSA ser o exame mais utilizado, ele possui limitações, visto que não é específico para o câncer, e achados anormais podem ser causados tanto por HPB quanto por prostatites (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

A maioria dos casos de CaP com diagnóstico precoce são de baixo risco e exigem mínima intervenção terapêutica. Porém, em aproximadamente 8% dos pacientes, a doença é avançada ou metastática, sendo necessário outras intervenções para controlar a sua progressão (WADOSKY et al., 2017). Ademais, cerca de 90% dos cânceres identificados se apresentam clinicamente localizados no momento do diagnóstico (ABESHOUSE et al., 2015). As principais modalidades de

tratamento para o CaP localizado incluem a prostatectomia radical, prostatovesiculectomia, braquiterapia, radioterapia externa e observação (RHODEN; AVERBECK, 2010). Para o câncer avançado ou metastático a terapia de privação androgênica (ADT) é o tratamento de escolha, visto que o crescimento de células do CaP é dependente dos androgênios (NOGUEIRA et al., 2016).

1.4 HORMÔNIOS ESTEROIDES

Os hormônios esteroides atuam na regulação de processos fisiológicos e do desenvolvimento em diversos estágios da vida fetal e adulta (MILLER; AUCHUS, 2011). Tais hormônios podem ser produzidos por diversos órgãos, como por exemplo, os testículos, glândulas adrenais, ovários, placenta e cérebro, sendo suas ações fundamentais para função reprodutiva normal e homeostase do organismo (BENNETT et al., 2012). O processo de produção desses hormônios é conhecido por esteroidogênese, e a partir dele tem-se a formação de glicocorticoides, mineralocorticoides e esteroides sexuais. Estes últimos são subdivididos em androgênios, estrogênios e progestágenos, e após sua liberação na corrente sanguínea, são capazes de exercer seus efeitos nos órgãos alvo através da ligação a receptores específicos (MILLER; AUCHUS, 2011).

Os hormônios esteroides são sintetizados a partir do colesterol e, por ação enzimática, seguem rotas distintas para a formação de determinados produtos. A alteração em apenas uma enzima da rota pode levar a formação de tipos e proporções hormonais distintas (AIRES, 2012). Os primeiros passos da esteroidogênese ocorrem da mesma maneira nos diferentes tecidos, e o colesterol, como o principal precursor, está presente em todos os tipos teciduais (CERQUEIRA et al., 2016). A primeira reação do processo ocorre com o transporte do colesterol através da membrana mitocondrial da célula e sua posterior conversão em pregnenolona (P5) pela enzima desmolase, também conhecida como enzima de clivagem da cadeia lateral do citocromo P450 (P450_{scc}) (HOFLAND et al., 2010). A P5, por sua vez, é catalisada por duas enzimas, a 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase (3 β -HSD) e a 17 α -hidroxilase/17,20-liase do citocromo P450 (P450_{c17}) (MILLER, 1988). Essas reações envolvem duas vias interligadas (conhecidas como Δ 5 e Δ 4) e ambas utilizam

P5 como substrato precursor e 3β -HSD e P450c17 como enzimas chave (NGUYEN et al., 2012).

Como pode ser observado na figura 3, a enzima P450c17 é essencial na via esteroidogênica, pois possui atividade enzimática dupla: 17α -hidroxilase e $17,20$ -liase. A atividade 17α -hidroxilase é responsável pela conversão de progesterona (P4) em 17α -hidroxiprogesterona e P5 em 17α -hidroxipregnenolona. Já a atividade $17,20$ -liase é responsável pela conversão dos substratos formados pela 17α -hidroxilase em desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (A4) (precursores da biossíntese dos androgênios) (LUU-THE; BÉLANGER; LABRIE, 2008). A DHEA, por sua vez, pode ser catalisada por duas enzimas: a 17β -hidroxiesteroide desidrogenase (17β -HSD), que dá origem ao androstenediol, e a 3β -HSD que dá origem a androstenediona. Tanto o androstenediol quanto a androstenediona podem ser convertidos em testosterona pelas enzimas 3β -HSD e 17β -HSD, respectivamente (FLÜCK; MILLER; AUCHUS, 2003). A aromatização de androgênios a estrogênios, e a conversão de A4 para estrona (E1) é realizada pela aromatase do citocromo P450 (MILLER, 1988).

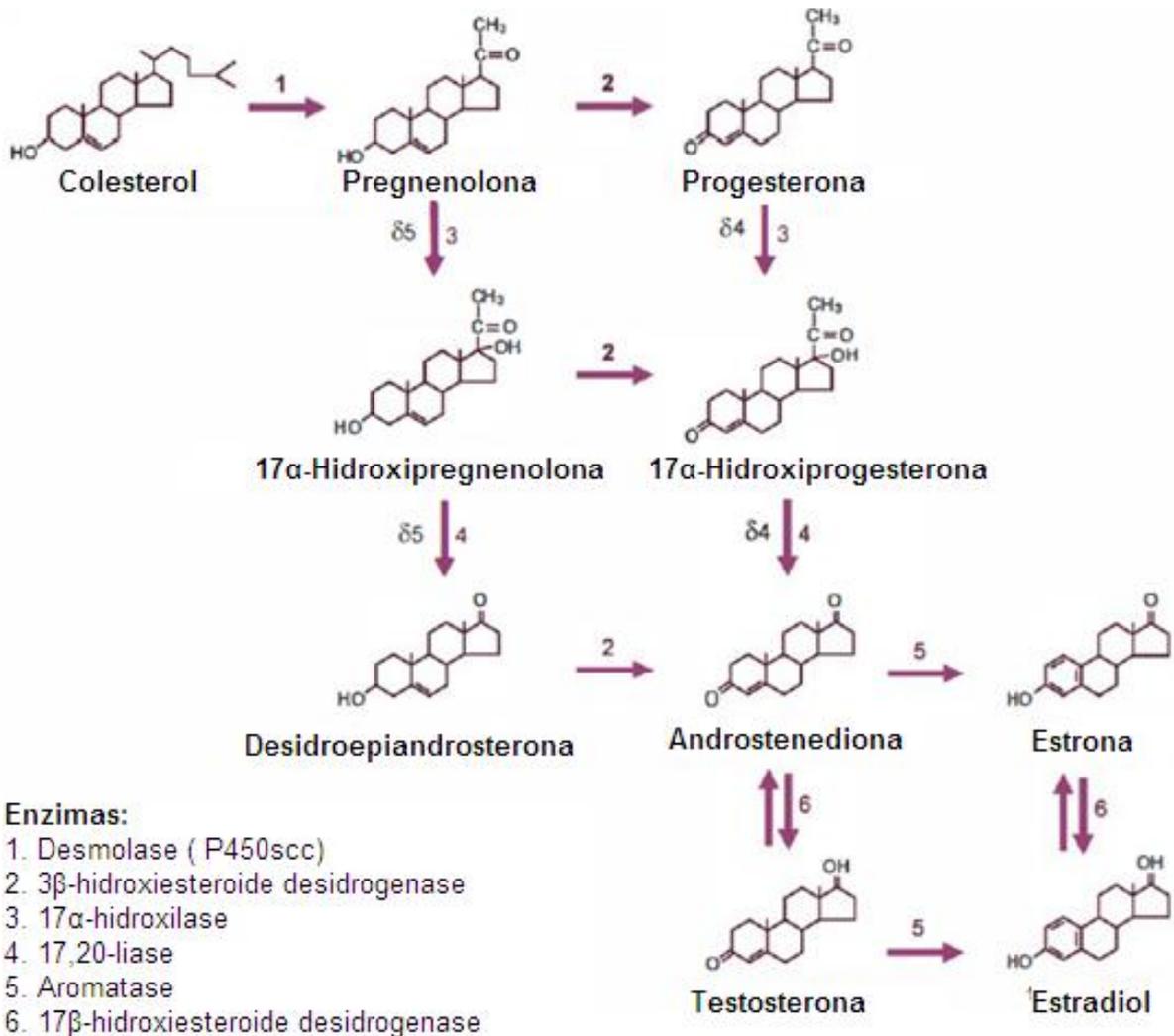


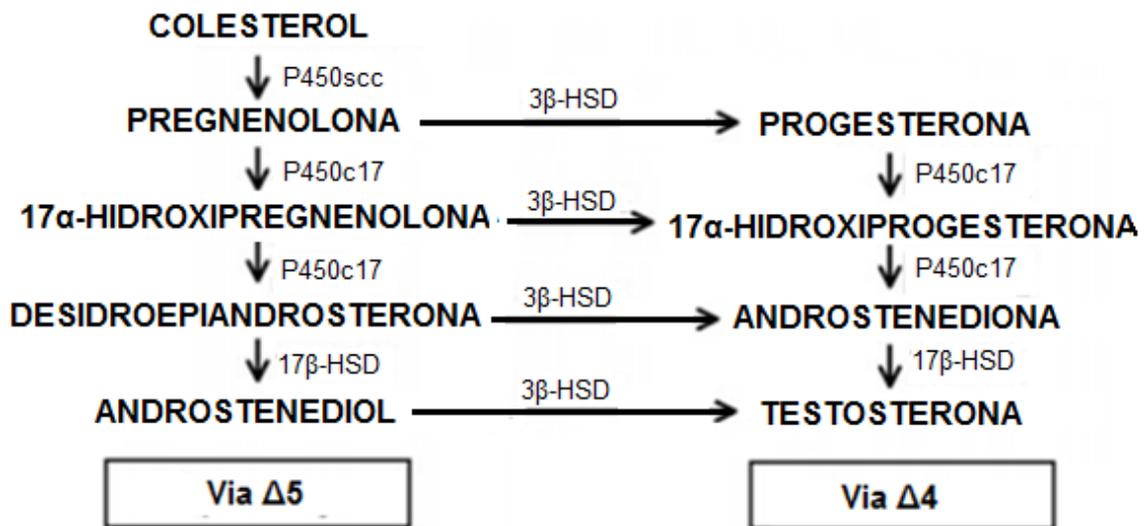
Figura 3. **Esteroidogênese:** Etapas envolvidas na biossíntese dos esteroides sexuais. A conversão de DHEA em androstenediol não está representada na imagem. Adaptada de (AIRES, 2012).

1.4.1 3β-hidroxiesteroide desidrogenase/Δ5-Δ4 isomerase

A enzima 3β-hidroxiesteroide desidrogenase/Δ5-Δ4 isomerase (3β-HSD) faz parte do grupo de enzimas envolvidas na síntese dos hormônios esteroides em humanos. Essa enzima atua principalmente através da oxidação e isomerização de precursores da via Δ5 para a via Δ4, uma etapa essencial para a síntese hormonal. Atualmente existem dois subtipos conhecidos, classificados como 3β-HSD tipo 1 e tipo 2, e codificados pelos genes HSD3B1 e HSD3B2, respectivamente (SIMARD et al., 2005). O primeiro subtipo já foi identificado na placenta e na próstata, enquanto o

segundo é expresso majoritariamente na glândula adrenal, ovários e testículos. Além disso, acredita-se que a principal função da enzima 3β -HSD1 seja converter seus substratos na circulação em esteroides sexuais nos tecidos, incluindo a testosterona, DHT e estrogênios. Já o papel fisiológico da 3β -HSD2, além de estar relacionado com a síntese de precursores necessários para a síntese de esteroides sexuais, também está relacionado a síntese de precursores para a produção de cortisol e aldosterona (HETTEL; SHARIFI, 2017; RAHMAN; HOFLAND; FOSTER, 2016).

De um modo geral, essa enzima faz parte de todas as reações que envolvem a transformação de substratos da via $\Delta 5$ para a $\Delta 4$, sendo sua presença e atividade enzimática essencial para a formação dos androgênios a partir dessa via (MILLER, 1988).



Enzimas:

P450_{scc}: Desmolase

P450_{c17}: 17 α -hidroxilase/17,20-liase

17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase

3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase

Figura 4. **Vias $\Delta 5$ e $\Delta 4$** : Representação esquemática das vias envolvidas na síntese dos hormônios esteroides em humanos. Adaptada de (FLÜCK; MILLER; AUCHUS, 2003).

1.4.2 Aromatase

A enzima aromatase (ARO) é codificada pelo gene CYP19A1 e pertence ao grupo das enzimas do citocromo P450. Ela é composta por 503 aminoácidos e um grupo heme contendo ferro. Sua principal função consiste na aromatização de androgênios a estrogênios, mais especificamente, a transformação de androstendiona em estrona e de testosterona em estradiol (Figura 5) (THOMAS; POTTER, 2013).

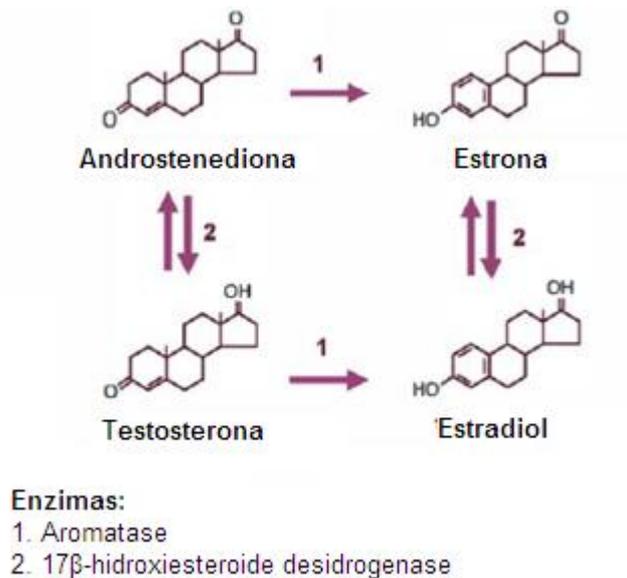


Figura 5. **Aromatase:** Reações que envolvem a enzima aromatase no processo de síntese dos esteroides sexuais. Adaptada de (AIRES, 2012).

A presença dessa enzima na próstata é controversa. Diversos estudos já demonstraram que ela está presente e ativa nesse órgão, porém, outros não foram capazes de identificá-la (ELLEM; RISBRIDGER, 2010). Atualmente, já se sabe que, pela sua atuação na síntese de estrogênios, ela possui papel significativo na progressão de tumores dependentes desses hormônios, como o câncer de mama (KAO et al., 1998). Dada a similaridade de desenvolvimento entre os tecidos da mama e da próstata, a atividade anormal da aromatase pode desempenhar um papel importante da patogênese do CaP (ELLEM; RISBRIDGER, 2010).

1.4.3 Androgênios

O desenvolvimento da próstata normal, assim como do CaP e da HPB, são dependentes dos androgênios (CARSON; RITTMASER, 2003). Os androgênios são hormônios esteroides responsáveis pelo crescimento e manutenção dos órgãos genitais masculinos e das características sexuais secundárias (BASU; TINDALL, 2010). No homem, a maior parte dos androgênios é fornecida pelos testículos e uma pequena parte pela glândula adrenal, sendo a testosterona o principal hormônio produzido. Nas células secretoras da próstata, a testosterona é convertida pela enzima 5 α -redutase em diidrotestosterona (DHT), hormônio que possui maior afinidade pelo receptor de androgênios (AR) (AIRES, 2012; GUYTON; HALL, 2011).

Os androgênios, principalmente a DHT exercem papel fundamental no desenvolvimento da próstata e qualquer alteração na sua função ou nos seus níveis pode levar a proliferação excessiva da glândula e ao desenvolvimento de doenças proliferativas (CARSON; RITTMASER, 2003; HEINLEIN; CHANG, 2004). As células tumorais da próstata são altamente dependentes desses hormônios, e é por esse motivo que elas necessitam expressar o AR. Com base nessa dependência, estratégias terapêuticas como a terapia de privação androgênica (ADT), que tem por objetivo a redução dos níveis sanguíneos de testosterona, tanto por castração química (farmacológica) quanto cirúrgica (remoção dos testículos), são predominantes (CICCARESE et al., 2016).

Na maioria dos pacientes, a ADT é eficaz inicialmente, porém, essa resposta é de curta duração, e a maioria dos tumores volta a progredir, o que caracteriza o estágio conhecido como CaP resistente à castração (CRPC) (LIU et al., 2014). Uma vez que a disponibilidade de androgênios da corrente sanguínea torna-se limitada, as células tumorais são capazes de se adaptar ao novo ambiente e desenvolver outros mecanismos para manter a proliferação tumoral. Dentre estes mecanismos podemos destacar a ativação da esteroidogênese intraprostática (ZHOU; BOLTON; JONES, 2014).

1.4.4 Esteroidogênese intraprostática

A maior parte da testosterona em homens normais é produzida pelos testículos, e a glândula adrenal contribui apenas com pequenas quantidades desse hormônio. Porém, embora a contribuição seja mínima, a adrenal é capaz de produzir níveis significativos de precursores para a sua formação como, por exemplo: DHEA, sulfato de DHEA e androstenediona, os quais são liberados na corrente sanguínea e captados pelos tecidos. Se o tecido possuir a maquinaria enzimática necessária, esses precursores podem então ser convertidos em androgênios e estrogênios mais potentes (RUBINOW, 2018; SCHIFFER; ARLT; STORBECK, 2018).

Como já comentado, pacientes submetidos à ADT acabam desenvolvendo, após determinado período, o estágio conhecido como CaP resistente a castração, e um dos possíveis mecanismos envolvidos é a ativação da esteroidogênese intraprostática e consequente produção de androgênios intratumoral (LIU et al., 2014). Essa hipótese é reforçada pela presença de níveis iguais desses hormônios em tecido prostático de pacientes com CaP antes e após a ADT, o que não condiz com a redução observada no sangue (ARMANDARI et al., 2014).

Atualmente existem duas possibilidades para a síntese de androgênios intraprostática, sendo elas a produção de androgênios *de novo* a partir do colesterol e através de precursores adrenais, ambos os casos acompanhados do aumento da expressão gênica de diferentes enzimas que medeiam o metabolismo intracelular dos esteroides a testosterona e DHT (DAI; HEEMERS; SHARIFI, 2017). Para que esses processos ocorram, além da presença dos precursores hormonais, é necessário a presença e ativação de enzimas específicas na próstata. A expressão dessas enzimas é essencial para manter a síntese hormonal persistente e por esse motivo elas tornaram-se alvos de diversas pesquisas (HETTEL; SHARIFI, 2017).

De acordo com estudos realizados, os precursores adrenais podem ser convertidos em testosterona e DHT por células prostáticas, e a produção de esteroides sexuais *de novo* a partir do colesterol também é possível. Esse último processo, que antes acreditava-se ser exclusivo das gônadas e glândulas adrenais, já foi identificado em outros tecidos e tipos celulares, como os rins, neurônios, astrócitos, queratinócitos, adipócitos e trofoblastos placentários (RUBINOW, 2018). Além disso, um estudo envolvendo xenoenxertos de LNCaP mostrou que a expressão de enzimas necessárias para a síntese de androgênios *de novo* a partir do colesterol foi detectada tanto a nível gênico quanto proteico, o que corrobora com a hipótese de

que as células tumorais podem utilizar o colesterol como precursor (ARMANDARI et al., 2014; KNUUTTILA et al., 2018).

1.4.5 Estrogênios

Com base em diversas pesquisas envolvendo a próstata, é possível observar um consenso a respeito da importância dos androgênios no desenvolvimento e homeostase da glândula, assim como na patogênese do CaP e da HPB. Porém, eles não são os únicos envolvidos nos processos fisiopatológicos relacionados a essa glândula (ELLEM; RISBRIDGER, 2010). Os estrogênios envolvem um grupo de hormônios compostos por 18 carbonos e que pode ser subdividido em 3 tipos hormonais estruturalmente semelhantes: estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3), sendo o E2 o mais potente (THOMAS; POTTER, 2013). Esses hormônios atuam através da ligação ao receptor de estrogênio alfa e beta ($ER\alpha$ e $ER\beta$, respectivamente), e sua regulação tem sido considerada um dos fatores de risco associados ao desenvolvimento da HPB e do CaP (ELLEM; RISBRIDGER, 2010). O mecanismo de ação exato desses receptores nas doenças prostáticas ainda não está totalmente compreendido, porém, sugere-se que a ativação do subtipo α resulte em hiperplasia, inflamação e displasia (ELLEM; RISBRIDGER, 2009).

Os estrogênios atuam no desenvolvimento e função da próstata direta e indiretamente em diversos estágios da vida masculina, incluindo a ação na regulação do crescimento e da diferenciação da glândula. A regulação indireta ocorre através da interferência da produção dos androgênios pela inibição do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, e a direta, principalmente pela metabolização local de androgênios a estrogênios pela enzima aromatase (HÄRKÖNEN; MÄKELÄ, 2004). Outro fator importante relacionado a androgênios e estrogênios, é que enquanto os níveis séricos do primeiro diminuem com o envelhecimento, o do segundo aumentam ou permanecem iguais. Esse aumento acentuado da proporção de estrogênios em relação aos androgênios, e o consequente desequilíbrio nos níveis desses hormônios pode estar relacionado ao crescimento prostático anormal e a possíveis transformações malignas (CARRUBA, 2013; ELLEM; RISBRIDGER, 2010).

2 JUSTIFICATIVAS

As doenças prostáticas possuem alta relevância clínica tanto pela frequência com que ocorrem quanto pelo comprometimento da qualidade e expectativa de vida dos seus portadores, afetando um grande número de homens com idade avançada. Com base nisso, faz-se necessário um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na reativação da sinalização androgênica em pacientes com CaP, e na consequente resistência tumoral a diversas terapias existentes. Além disso, a identificação e análise de enzimas que podem estar envolvidas na síntese intraprostática de hormônios esteroides pode contribuir para a elucidação desses mecanismos, e possui grande importância pelo seu possível envolvimento na progressão tumoral e no desenvolvimento da resistência a terapia hormonal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse estudo foi avaliar a expressão dos genes HSD3B1 e CYP19A1, que codificam as enzimas 3 β -HSD1 e ARO, respectivamente, em amostras de tecido de câncer de próstata primário e hiperplasia prostática benigna.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os genes HSD3B1 e CYP19A1 em amostras tecido de câncer de próstata primário score de Gleason 6 e 7 e hiperplasia prostática benigna.
- Comparar a expressão dos genes HSD3B1 e CYP19A1 em amostras de tecido de câncer de próstata primário score de Gleason 6 e 7 com amostras de tecido de hiperplasia prostática benigna.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

TRABALHO EXPERIMENTAL

NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Com intenção de publicação no periódico “The prostate” este artigo está formatado nos moldes exigidos pela revista (normas no anexo A).

Título: Perfil de expressão dos genes HSD3B1 e CYP19A1 em tumores de próstata

Título Reduzido: Expressão gênica de HSD3B1 e CYP19A1 em tumores de próstata

Vitória Machado Krüger^{1,*}; Ilma Simoni Brum da Silva¹ PhD; Lolita Schneider Pizzolato¹ PhD.

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

*Autor correspondente:

Rua Sarmiento Leite, 500

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, Brasil

Fone: 51 33083559

Endereço de email: Ilma@ufrgs.br

ABSTRACT

Background: Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are the most common prostatic diseases in the elderly, and both are characterized by changes in prostate control and growth. Steroid hormones, mainly androgens, play a central role in the maintenance and progression of these diseases, acting through the activation of specific intracellular receptors. One of the most common treatments for PCa is androgen deprivation therapy (ADT), and although it results in a period of clinical regression, many patients progress to a condition that is refractory to androgen depletion. Some mechanisms have been associated with these cases of resistance, including the activation of intraprostatic steroidogenesis, and consequent production of intratumoral androgens and estrogens. For this process to occur, in addition to the presence of hormone precursors in the prostate, specific enzymes such as 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase / Δ 5- Δ 4 isomerase type 1 (3 β -HSD1) and aromatase (ARO) are required. These enzymes participate in key steps in the pathway of sexual steroid synthesis and their expression may be altered in prostatic diseases. Therefore, the analysis of the HSD3B1 and CYP19A1 genes, which encode the 3 β -HSD1 and ARO enzymes, respectively, may allow a better understanding of the pathogenesis of PCa and BPH.

Methods: Gene expression of HSD3B1 and CYP19A1 was performed by RT-qPCR in 22 samples of primary PCa and 22 samples of BPH from patients of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre.

Results: The HSD3B1 gene was identified in both PCa and BPH, but did not present significant difference of expression between the analyzed groups ($P=0.25$). The CYP19A1 gene was identified in both groups and showed a significant difference between them, being higher in the BPH group compared to the PCa ($*P=0.029$).

Conclusion: This result evidences the possible participation that these genes have in the pathogenesis of PCa and BPH. However, further studies are needed to better understand the influence that the steroidogenic pathway has on the development of prostate tumors.

KEYWORDS: Prostate cancer. Benign prostatic hyperplasia. Steroidogenesis. Androgens. Estrogens.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer¹, o câncer de próstata (CaP) é o segundo câncer mais frequente entre os homens no Brasil e o quarto tipo considerando ambos os sexos. Pelo fato de afetar um grande número de homens a partir dos 65 anos de idade, ele é classificado como um câncer da terceira idade no mundo. Diversos fatores de risco podem estar associados ao seu desenvolvimento, incluindo a raça, idade e história familiar da doença.^{2,3} Atualmente, as principais ferramentas de diagnóstico disponíveis incluem o exame de toque retal, biópsia guiada por ultrassom transretal e a dosagem do nível sanguíneo do antígeno prostático específico (PSA).⁴ Apesar da análise do PSA ser o exame mais utilizado, ele possui limitações, visto que não é específico para o câncer, e achados anormais podem ser causados tanto por hiperplasia prostática benigna (HPB) quanto por prostatites.⁵ A HPB é caracterizada pela proliferação não regulada do músculo liso, do tecido conectivo e do epitélio glandular na zona de transição prostática. Ela pode causar compressão física da uretra pelo aumento progressivo do volume da próstata e do tônus muscular estromal, e originar diversos sintomas do trato urinário inferior.⁶ Sua incidência é alta em homens mais velhos, afetando cerca de 50% dos homens com mais 50 anos de idade, com um aumento para 80% aos 80 anos de idade.⁷

Tanto o CaP quanto a HPB são dependentes dos androgênios para o seu desenvolvimento.⁸ Os androgênios são hormônios esteroides responsáveis pelo crescimento e manutenção dos órgãos reprodutores masculinos e das características sexuais secundárias.⁹ O primeiro passo da síntese de todos os esteroides é a conversão do colesterol em pregnenolona (P5). Essa conversão é catalisada pela enzima de clivagem de cadeia lateral do citocromo P450 (P450scc). A P5, por sua

vez, é catalisada por duas enzimas, a 3β -hidroxiesteroide desidrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ isomerase (3β -HSD) e a 17α -hidroxilase/ $17,20$ -liase do citocromo P450 (P450c17).¹⁰ Essas reações envolvem duas vias interligadas (conhecidas como $\Delta 5$ e $\Delta 4$) e ambas utilizam P5 como substrato precursor e 3β -HSD e P450c17 como enzimas chave.¹¹ Os produtos destas reações inter-relacionadas são de dois grupos principais de esteroides, a progesterona (P4) e 17α -hidroxiprogesterona (17OH-P4), e androgênios como a desidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenediona (A4). A aromatização de androgênios a estrogênios, e a conversão de A4 para estrona (E1) é catalisada pela aromatase do citocromo P450 (ARO).¹⁰

Em homens, a maior parte dos androgênios é fornecida pelos testículos e uma pequena parte pela glândula adrenal, sendo a testosterona o principal hormônio produzido.^{12,13} Nas células secretoras da próstata, a enzima 5α -redutase converte a testosterona em diidrotestosterona (DHT), a qual possui maior afinidade pelo receptor de androgênios (AR).^{14,15} Assim como a próstata normal, o CaP também é dependente desses hormônios, e por esse motivo as células tumorais necessitam expressar o AR. Com base nessa dependência, estratégias terapêuticas como a terapia de privação androgênica (ADT), que tem por objetivo a redução dos níveis de testosterona circulantes, são predominantes.¹⁵ Apesar da terapia funcionar inicialmente, a resposta é de curta duração, e a maioria dos tumores progride para um estágio conhecido como CaP resistente à castração (CRPC). Diversos mecanismos têm sido associados a esses casos de resistência, incluindo a possibilidade da ativação da esteroidogênese intraprostática e consequente síntese de androgênios intratumoral.¹⁶

Embora a maior parte da testosterona, em homens normais, seja produzida pelos testículos, e glândula adrenal contribua apenas com pequenas quantidades desse hormônio, a síntese intratumoral de androgênios a partir de precursores

adrenais ou *de novo* a partir do colesterol pode representar uma fonte substancial de testosterona e DHT em pacientes tratados com a ADT.¹⁷ Ademais, para que esses processos ocorram, além dos precursores hormonais, é necessário a presença e ativação de enzimas específicas na próstata.¹⁸ Entre essas enzimas, a 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase tipo 1 (3 β -HSD1) é de grande importância, pois faz parte de todas as reações que envolvem a transformação de substratos da via Δ 5 para a via Δ 4, sendo sua presença e atividade enzimática essencial para a formação dos androgênios.^{10,19}

É certo que os androgênios possuem grande importância no desenvolvimento da próstata, porém, eles não são os únicos envolvidos nos processos fisiopatológicos relacionados a esse órgão.²⁰ Os estrogênios envolvem um grupo de hormônios subdividido em 3 tipos hormonais estruturalmente semelhantes: estrona, estradiol e estriol.²¹ Esses hormônios podem atuar direta ou indiretamente em diversos estágios da vida masculina. A regulação indireta ocorre através da interferência da produção dos androgênios pela inibição do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, e a direta, principalmente pela metabolização local de androgênios a estrogênios pela enzima aromatase.²² Na próstata os estrogênios podem se ligar a receptores específicos como o ER α e ER β , e a regulação desses receptores tem sido associada ao desenvolvimento do CaP e da HPB.²⁰

Outro fator importante é que enquanto os níveis séricos dos androgênios diminuem com o envelhecimento, os níveis de estrogênios aumentam ou permanecem constantes. O desequilíbrio nos níveis desses hormônios pode estar relacionado ao crescimento prostático anormal e a possíveis transformações malignas.^{20,23} Devido a isso, é importante considerar o papel da enzima aromatase nas doenças prostáticas

e sua influência na alteração do equilíbrio na relação entre androgênios e estrogênios.²⁴

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento do estudo

Estudo transversal.

2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Todas as amostras do estudo são provenientes de pacientes do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e foram divididas em dois grupos: HPB e CaP. Para o primeiro grupo foram selecionados 25 pacientes submetidos à cirurgia para HPB, com diagnóstico comprovado por exame anatomopatológico, com volume prostático medido por ecografia abdominal acima de 30g, toque retal sem suspeita de neoplasia, que não estivessem fazendo quimioterapia e sem diagnóstico de neoplasia concomitante. Para o segundo grupo, foram selecionados 25 pacientes submetidos à cirurgia para CaP com diagnóstico comprovado por exame anatomopatológico, com idade entre 40 e 85 anos, que não haviam recebido quimioterapia e sem diagnóstico de outra neoplasia concomitante.

2.3 Coleta das amostras

As amostras de tecido prostático maligno foram coletadas no transoperatório das cirurgias de prostatovesiculectomia e prostatectomia radical, nas quais é feita a retirada da próstata. O procedimento inicial de coleta foi realizado pelo médico urologista, que localiza o nódulo tumoral na próstata, faz a sua retirada e, por fim, a divisão em dois fragmentos. Um dos fragmentos foi enviado para o Serviço de Patologia a fim de confirmar o diagnóstico e o outro foi coletado em um criotubo plástico de 2,0 mL, contendo RNAlater, para transporte e armazenamento em freezer -80°C.

As amostras de HPB foram coletadas no transoperatório das cirurgias de prostatectomia aberta e ressecção transuretral (RTU), nas quais foi feita a coleta de pequenos fragmentos da próstata, e estes foram armazenados em 2 criotubos de 2,0 mL contendo RNAlater, para transporte e armazenamento em freezer -80°C.

2.4 Exame Anatomopatológico e classificação dos tumores

O exame anatomopatológico das amostras de tecido prostático e a confirmação da presença ou ausência de tecido tumoral nas mesmas foi realizado pelo Serviço de Patologia do HCPA.

A classificação histológica da agressividade do tumor também foi realizada pelo Serviço de Patologia do HCPA, e seguiu a classificação desenvolvida por Gleason.

2.5 População e amostra

O cálculo do tamanho da amostra para análise da expressão gênica no tecido prostático foi calculado pelo programa WinPepi, utilizando-se dados de estudos

prévios do nosso grupo de pesquisa.²⁵ Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, um poder estatístico de 90% e diferença entre as médias de 0,1 unidades arbitrárias, chegando-se a um N de 25 pacientes por grupo. A população em estudo foi constituída por pacientes masculinos com diagnóstico de HPB ou CaP.

Todos os pacientes foram consultados sobre a coleta e utilização do material, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

Os dados referentes à idade dos pacientes, PSA pré-operatório e escore de Gleason foram obtidos dos prontuários e registros do HCPA.

2.6 Aspectos éticos

Esse trabalho faz parte de um estudo maior intitulado “Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores de próstata” que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e foi aprovado em seus aspectos éticos e científicos, sob o número 12-0320.

O tecido prostático utilizado foi proveniente de material de descarte de pacientes submetidos às cirurgias de RTU de próstata, prostatectomia aberta, prostatectomia radical ou prostatovesiculectomia. Aos pacientes, foi garantido sigilo quanto às informações obtidas e seu uso foi absolutamente restrito para fins de pesquisa científica.

2.7 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol, seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente foi realizada a quantificação do RNA em um

espectrofotômetro para ácidos nucleicos (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, EUA) nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, a partir de 1uL da solução de RNA total. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm foi superior a 1,6. Por fim, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2µg do RNA total, utilizando o conjunto de reagentes GoScript Reverse Transcription System (Promega Corp., Madison, WI, USA), seguindo o protocolo do fabricante.

2.8 Desenho dos oligonucleotídeos (primers)

Os pares de primers para cada gene foram desenhados através da ferramenta PrimerQuest do site IDT– Integrated DNA Technologies, e as sequências obtidas para cada gene estão listadas na tabela I.

Tabela I. Sequência de primers dos genes HSD3B1, CYP19A1 e β_2m .

Gene	Sequência (5'-3')
HSD3B1	
<i>Sense</i>	CGGCTAACGGGTGGAATCTG
<i>Antisense</i>	CCCCATAGATATACATGGGTCGTAAG
CYP19A1	
<i>Sense</i>	TGACCAATGAATCGGGCTATG
<i>Antisense</i>	GTCCAAAGGGATCCTCAAGAAG
β_2m	
<i>Sense</i>	CTATCCAGCGTACTCCAAAG
<i>Antisense</i>	ACAAGTCTGAATGCTCCACT

β_2m : β_2 -microglobulina.

2.9 Amplificação por RT-qPCR

A análise da expressão dos genes de interesse foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa (RT-qPCR), utilizando a Power SYBR green PCR Mastermix (Applied Biosystems). No presente estudo as amostras de cDNA foram amplificadas pelo aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com um volume total de 12,5 µL por reação, sendo 6,25 µL de SYBR Green Master Mix, 1 µL de ROX, 0,2 µL de primer sense e antisense, 3,85 µL de H₂O e 1 µL de amostra diluída 1:5 para os genes β_2m , HSD3B1 e CYP19A1. A amplificação das amostras foi realizada em duplicata em placas de 96 poços.

As condições da reação foram: desnaturação a 95°C por 2 minutos, e 40 ciclos continuando a desnaturação em 95°C por 30 segundos e anelamento a 60°C por 3 minutos. Uma curva padrão com 5 pontos em duplicata com uma diluição seriada de cDNA foi utilizada para quantificar as amostras (quantificação relativa). O gene β_2 -microglobulina (β_2m) foi utilizado como controle endógeno da reação, pois de acordo com testes realizados pelo nosso grupo de pesquisa, ele mostrou-se mais adequado em relação a outros genes analisados.

Informações referentes à amplificação dos genes e eficiência (%) das curvas padrão para cada um dos genes em estudo estão representados nos materiais suplementares.

2.10 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Como a expressão dos genes analisados não apresentou distribuição normal, utilizamos o teste de Mann-Whitney. A expressão gênica foi considerada significativa quando o $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS 20 (Statistical Package for the Social Sciences).

2.11 Local de realização do projeto

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, do Departamento de Fisiologia, lotado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS da UFRGS, que dispõe da infraestrutura necessária para a execução desse trabalho.

3 RESULTADOS

3.1 Características das amostras analisadas:

As principais características das amostras estudadas estão apresentadas na tabela II. A mediana de idade (percentil 25-75) não foi diferente entre os grupos, sendo igual a 73,0 (66,5- 79,2) para o grupo HPB e 71,5 (68,7- 73,5) para o grupo CaP ($P=0,371$). A mediana da dosagem sérica de PSA pré-operatório foi de 5,0 (2,7-8,5) ng/dL no grupo HPB e 6,0 (5,45-10,96) ng/dL no grupo CaP, sendo maior no grupo CaP em comparação ao grupo HPB ($*P=0,03$). O escore de Gleason foi avaliado somente no grupo CaP, sendo que de 22 amostras analisadas, 8 apresentavam escore igual a 6 (3+3), 8 igual a 7 (3+4) e 6 igual a 7 (4+3).

Tabela II. Caracterização das amostras estudadas.

	HPB (n=22)	CaP (n=22)	Valor –P
Idade [mediana (percentil 25- 75)]	73,0 (66,5-79,2)	71,5 (68,7- 73,5)	0,371 ³
PSA pré operatório (ng/dL) [mediana (percentil 25-75)]	5,0 (2,7- 8,5)	6,0 (5,45- 10,96)	0,03 ³
Score de Gleason 6 (3+3)^{1,2}	-	8 (36,4%)	-
Score de Gleason 7 (3+4)^{1,2}	-	8 (36,4%)	-
Score de Gleason 7 (4+3)^{1,2}	-	6 (27,2%)	-

HPB: Hiperplasia prostática benigna; CaP: Câncer de próstata; PSA: Antígeno prostático específico.¹Dados não avaliados para as amostras de hiperplasia prostática benigna. ²Dados apresentados em número de amostra (%). ³Teste de Mann-Whitney.

3.2 Análise dos níveis de RNAm dos genes HSD3B1 e CYP19A1

Para a análise da expressão dos genes HSD3B1 e CYP19A1, o cDNA das amostras de tecido foi submetido a quantificação por RT-qPCR.

Os dados de expressão gênica dos genes estudados não apresentaram distribuição normal, sendo considerados não paramétricos. A expressão gênica [mediana (percentil 25- 75)] de HSD3B1 foi de 0,36 (0,098-0,91) no grupo HPB e 0,26 (0,056-0,6) no grupo CaP, não havendo diferença significativa entre os grupos ($P=0,25$). Já a expressão gênica de CYP19A1 foi maior no grupo HPB 0,72 (0,14-2,3) quando comparado com o grupo CaP 0,19 (0,062-0,51) ($*P=0,029$) (Tabela III).

A figura 1 mostra a representação gráfica dos resultados da expressão dos genes nos grupos HPB e CaP.

Tabela III. Resultados da expressão gênica de HSD3B1 e CYP19A1 em HPB e CaP.

	HPB	CaP	P
HSD3B1	0,36 (0,098-0,91)	0,26 (0,056-0,6)	0,25
CYP19A1	0,72 (0,14-2,3)	0,19 (0,062-0,51)	0,029*

HPB: Hiperplasia prostática benigna; CaP: Câncer de próstata.

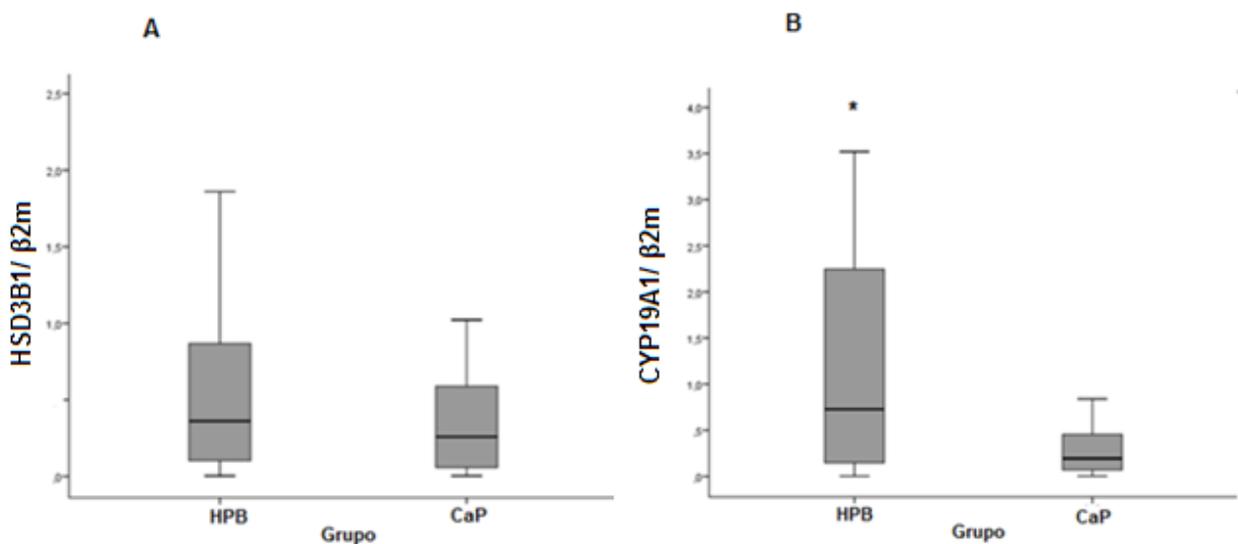


Figura 1: **Representação gráfica da expressão dos genes nos grupos HPB e CaP.**

A. Expressão gênica de HSD3B1 em tecido prostático de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Teste de Mann-Whitney, dados representados como mediana e intervalo interquartil (25-75). $P = 0,25$.

B. Expressão gênica de CYP19A1 em tecido prostático de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Teste de Mann-Whitney, dados representados como mediana e intervalo interquartil. * $P=0,029$.

4 DISCUSSÃO

O câncer de próstata é uma doença dependente de hormônios, uma vez que a glândula prostática requer androgênios para sua função normal e as células tumorais retêm essa característica. A terapia de privação de androgênica (ADT) foi desenvolvida com base nessa dependência, e é eficaz até que o tumor entre em um estado refratário a depleção hormonal.^{26,27} A síntese intraprostática de esteroides sexuais a partir de precursores adrenais ou *de novo* a partir do colesterol pode

representar uma fonte substancial de androgênios em pacientes tratados com a ADT.^{17,28} Além disso, esse mecanismo também possibilita a formação de estrogênios pela ação da enzima aromatase na próstata. Os estrogênios, assim como os androgênios, podem estar associados ao desenvolvimento e progressão de doenças prostáticas, principalmente quando se observa um desequilíbrio nos níveis desses hormônios.^{20,24}

Neste trabalho, analisamos conjuntamente a expressão de duas enzimas envolvidas na síntese intraprostática de hormônios esteroides em câncer de próstata primário e hiperplasia prostática benigna: a enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase tipo 1 (3 β -HSD1) e a enzima aromatase (ARO). De acordo com os nossos resultados, o gene que codifica a enzima 3 β -HSD1 foi identificado tanto em CaP quanto em HPB, porém, não apresentou diferença significativa de expressão entre os grupos analisados. Visto que esse estudo foi realizado em cânceres primários, é possível que a esteroidogênese intraprostática não tenha sido ativada, o que poderia justificar a expressão normal do gene HSD3B1 no CaP em comparação com a HPB. Outro fator que devemos considerar é que avaliamos a expressão gênica e, mesmo que o gene apresente expressão normal, a sua síntese proteica ou atividade enzimática pode estar alterada.

Por outro lado, resultados de dosagem hormonal em tecido prostático que identificou a via Δ 4 e Δ 5, realizado por nosso grupo de pesquisa em parceria com o laboratório do Dr. Labrie no Canadá (dados não publicados), mostraram que a via Δ 4 está mais ativa na HPB e, como já mencionado, a enzima 3 β -HSD1 é a responsável pela conversão dos substratos entre essas vias. Corroborando com esses dados, um estudo realizado por Khvostova et al.²⁹ comparou os perfis de expressão gênica em tecido prostático benigno e maligno, demonstrando aumentos significativos na

expressão do gene HSD3B1 em tecidos benignos quando comparados com os malignos. Portanto, é possível que a presença desse gene na HPB esteja relacionada à progressão da doença pela ativação da esteroidogênese intraprostática, visto que, assim como o CaP, a HPB é dependente de hormônios, podendo ser capaz de formar esteroides de forma endógena.³⁰

O segundo gene analisado foi o CYP19A1, que codifica a enzima aromatase. De acordo com os nossos resultados, esse gene foi identificado tanto em CaP quanto em HPB, apresentando um aumento significativo de expressão no grupo HPB quando comparado com o CaP. Dessa forma, identificamos e analisamos o perfil de expressão de CYP19A1 tanto em tecido prostático benigno quanto maligno, contribuindo para um melhor entendimento e interpretação dos resultados e discrepâncias presentes na literatura a respeito desse gene. Esses resultados condizem com o estudo realizado por Gianfrilli et al.³¹, em que foi observado uma maior expressão da aromatase em HPB em comparação com CaP. Porém, ao contrário do nosso trabalho, esse foi realizado em tumores mais avançados, incluindo amostras com escores de Gleason elevados. Além disso, Ellem et al.³² identificaram o RNAm dessa enzima em 100% das biópsias de HPB e CaP analisadas, porém, a expressão entre os grupos não foi comparada.

Com base nos nossos resultados e na hipótese de que estrogênios são capazes de causar proliferação aberrante do epitélio prostático através da sua ligação ao receptor ER α , a enzima aromatase possivelmente desempenha um papel relevante na fisiopatologia da HPB.²⁰ Royuela et al.³³ mostraram que o ER α está superexpresso na doença e, na presença do ligante necessário, ocorre a indução da proliferação das células estromais da próstata. Além disso, a exposição a altos níveis de estrogênios durante o período neonatal resulta em alterações do crescimento da glândula e a

predisposição a hiperplasia e a outras doenças prostáticas, evidenciando a grande influência que os estrogênios possuem.^{34,35} Reforçando esses estudos, Ho et al.³⁶ sugerem que os androgênios por si só não são capazes de induzir o desenvolvimento da HPB, e que os estrogênios podem ter um papel associado.

Diversos estudos investigaram a associação dos estrogênios com a etiologia da HPB, sugerindo a utilização de antiestrogênios ou inibidores da enzima aromatase como possíveis terapias. Porém, até o momento os desfechos clínicos desses tratamentos não foram totalmente satisfatórios. Uma das hipóteses para esses resultados é que o uso de inibidores da aromatase acaba levando a um aumento nos níveis de precursores para síntese de androgênios, o que faz com que a doença continue progredindo.³⁷ De acordo com os nossos achados, o gene que codifica a 3 β -HSD1 está expresso em HPB e, devido a atuação dessa enzima na síntese de androgênios intraprostática, ela poderá ser alvo de pesquisas futuras, juntamente com a investigação de outras alternativas para reduzir os níveis de estrogênios locais na próstata.

Muitos estudos se empenharam em descrever as enzimas envolvidas na síntese intraprostática de hormônios esteroides e analisar sua expressão em tecido prostático. A partir deles é possível observar muitos resultados conflitantes e heterogêneos, principalmente entre tecidos benignos e malignos. O nosso objetivo foi analisar a presença e a expressão dos genes HSD3B1 e CYP19A1 em câncer de próstata primário e hiperplasia prostática benigna, ao contrário da maioria dos trabalhos na literatura, os quais focaram em investigar a expressão desses genes em câncer de próstata resistente a castração. Esses trabalhos comprovam que diversos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo dos esteroides sexuais estão presentes e mais expressos no CPRC em comparação com cânceres primários,

podendo caracterizar um meio de progressão da doença.³⁸ Com base nisso, estratégias terapêuticas tendo como alvo as enzimas da via esteroidogênica em tumores em fases iniciais, poderiam representar uma possível barreira à progressão tumoral e ao desenvolvimento da resistência à terapia hormonal no futuro.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os nossos resultados os genes HSD3B1 e CYP19A1 foram identificados tanto em tecido prostático benigno quanto maligno. Desses genes, apenas o CYP19A1 apresentou diferença significativa de expressão entre os grupos, estando mais expresso em amostras de HPB em comparação com o CaP. Esse resultado sugere uma possível participação desses genes na patogênese dessas doenças, principalmente através da síntese intraprostática de esteroides sexuais. Entretanto, estudos suplementares necessitam ser realizados para um melhor entendimento da influência que a via esteroidogênica possui no desenvolvimento e progressão dos tumores de próstata.

SUPORTE FINANCEIRO

CAPES, CNPq, FAPERGS, FIPE/HCPA

CONFLITO DE INTERESSE

Todos os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse

REFERÊNCIAS

1. INCA. Câncer de próstata.
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>.

- Published 2018. Accessed April 10, 2018.
2. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology*. 2003;62(6):3-12. doi:10.1016/j.urology.2003.10.013.
 3. Eeles R, Goh C, Castro E, et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol*. 2013;11(1):18-31. doi:10.1038/nrurol.2013.266.
 4. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*. 2017;71(4):618-629. doi:10.1016/j.eururo.2016.08.003.
 5. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Patologia Básica*. 9th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
 6. Patel ND, Parsons JK. Epidemiology and etiology of benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. *Indian J Urol*. 2014;30(2):170-176. doi:10.4103/0970-1591.126900.
 7. Chughtai B, Forde JC, Dana Marie Thomas D, et al. Benign prostatic hyperplasia. *Nat Publ Gr*. 2016;2. doi:10.1038/nrdp.2016.31.
 8. Carson C, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2003;61(4):2-7. doi:10.1016/S0090-4295(03)00045-1.
 9. Basu S, Tindall DJ. Androgen Action in Prostate Cancer. *Horm Cancer*. 2010;1(5):223-228. doi:10.1007/s12672-010-0044-4.
 10. MILLER WL. Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis*. *Endocr Rev*. 1988;9(3):295-318. doi:10.1210/edrv-9-3-295.
 11. Nguyen PTT, Lee RSF, Conley AJ, Sneyd J, Soboleva TK. Variation in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity and in pregnenolone supply rate can paradoxically alter androstenedione synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012;128(1-2):12-20. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.10.003.
 12. Aires MM. *Fisiologia*. 4th ed. (GUANABARA KOOGAN LTDA, ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
 13. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12th ed. (Elsevier, ed.). Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
 14. Green SM, Mostaghel EA, Nelson PS. Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;360(1-2):3-13. doi:10.1016/j.mce.2011.09.046.
 15. Ciccamese C, Santoni M, Brunelli M, et al. AR-V7 and prostate cancer: The watershed for treatment selection? *Cancer Treat Rev*. 2016;43:27-35. doi:10.1016/j.ctrv.2015.12.003.
 16. Liu LL, Xie N, Sun S, Plymate S, Mostaghel E, Dong X. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2014;33(24):3140-3150. doi:10.1038/onc.2013.284.
 17. Schiffer L, Arlt W, Storbeck K-H. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;465:4-26. doi:10.1016/J.MCE.2017.08.016.
 18. Hettel D, Sharifi N. HSD3B1 status as a biomarker of androgen deprivation resistance and implications for prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2017;15(3):191-196. doi:10.1038/nrurol.2017.201.
 19. Simard J, Ricketts M-L, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. Molecular Biology of the 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 Isomerase Gene Family. *Endocr Rev*. 2005;26(4):525-582. doi:10.1210/er.2002-0050.
 20. Ellem SJ, Risbridger GP. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;118(4-5):246-251.

- doi:10.1016/j.jsbmb.2009.10.015.
21. Thomas MP, Potter BVL. The structural biology of oestrogen metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;137:27-49. doi:10.1016/j.jsbmb.2012.12.014.
 22. Härkönen PL, Mäkelä SI. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;92(4):297-305. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.10.016.
 23. Carruba G. Estrogens in Prostate Cancer. In: *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective.* London: Springer London; 2013:369-381. doi:10.1007/978-1-4471-2864-9_30.
 24. Rahman HP, Hofland J, Foster PA. In touch with your feminine side: how oestrogen metabolism impacts prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(6):R249-R266. doi:10.1530/ERC-16-0118.
 25. Cericatto R, Pozzobon A, Morsch DM, Menke CH, Brum IS, Spritzer PM. Estrogen receptor- α , bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: Association with nodule size, hormonal and reproductive features. *Steroids.* 2005;70(3):153-160. doi:10.1016/J.STEROIDS.2004.10.013.
 26. Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *JAMA.* 2005;294(2):238. doi:10.1001/jama.294.2.238.
 27. Liu LL, Xie N, Sun S, Plymate S, Mostaghel E, Dong X. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene.* 2014;33(24):3140-3150. doi:10.1038/onc.2013.284.
 28. Dai C, Heemers H, Sharifi N. Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(9):a030452. doi:10.1101/cshperspect.a030452.
 29. Khvostova E, Otpuschennikov A, Pustyl'nyak V, Gulyaeva L. Gene Expression of Androgen Metabolising Enzymes in Benign and Malignant Prostatic Tissues. *Horm Metab Res.* 2014;47(2):119-124. doi:10.1055/s-0034-1374631.
 30. Sakai M, Martinez-Arguelles DB, Aprikian AG, Magliocco AM, Papadopoulos V. De novo steroid biosynthesis in human prostate cell lines and biopsies. *Prostate.* 2016;76(6):575-587. doi:10.1002/pros.23146.
 31. Gianfrilli D, Pierotti S, Pofi R, Leonardo C, Ciccariello M, Barbagallo F. Sex Steroid Metabolism in Benign and Malignant Intact Prostate Biopsies: Individual Profiling of Prostate Intracrinology. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1-8. doi:10.1155/2014/464869.
 32. Ellem SJ, Schmitt JF, Pedersen JS, Frydenberg M, Risbridger GP. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(5):2434-2441. doi:10.1210/jc.2003-030933.
 33. Royuela M, de Miguel MP, Bethencourt FR, et al. Estrogen receptors alpha and beta in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J Endocrinol.* 2001;168(3):447-454. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241176>. Accessed May 21, 2018.
 34. Prins GS, Birch L. Neonatal Estrogen Exposure Up-Regulates Estrogen Receptor Expression in the Developing and Adult Rat Prostate Lobes ¹. *Endocrinology.* 1997;138(5):1801-1809. doi:10.1210/endo.138.5.5106.
 35. Pylkkänen L, Mäkelä S, Valve E, Härkönen P, Toikkanen S, Santti R. Prostatic dysplasia associated with increased expression of c-myc in neonatally estrogenized mice. *J Urol.* 1993;149(6):1593-1601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8501817>. Accessed May 17, 2018.
 36. Ho CKM, Nanda J, Chapman KE, Habib FK. Oestrogen and benign prostatic

- hyperplasia: effects on stromal cell proliferation and local formation from androgen. *J Endocrinol.* 2008;197(3):483-491. doi:10.1677/JOE-07-0470.
37. Sciarra F, Toscano V. Role of estrogens in human benign prostatic hyperplasia. *Arch Androl.* 2000;44(3):213-220. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864369>. Accessed May 17, 2018.
 38. Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, et al. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res.* 2008;68(11):4447-4454. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0249.

MATERIAIS SUPLEMENTARES

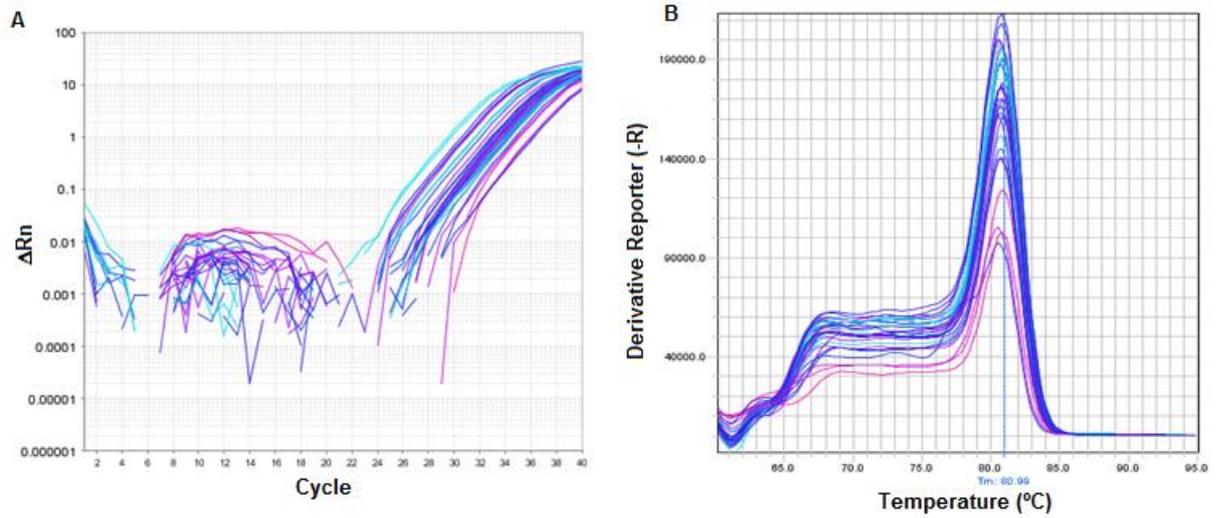


Figura 1: **Representação da qPCR do gene HSD3B1**

A: Status da reação de amplificação. Representa o aumento da fluorescência em relação ao ciclo limiar (Ct).

B: Curva de Melting.

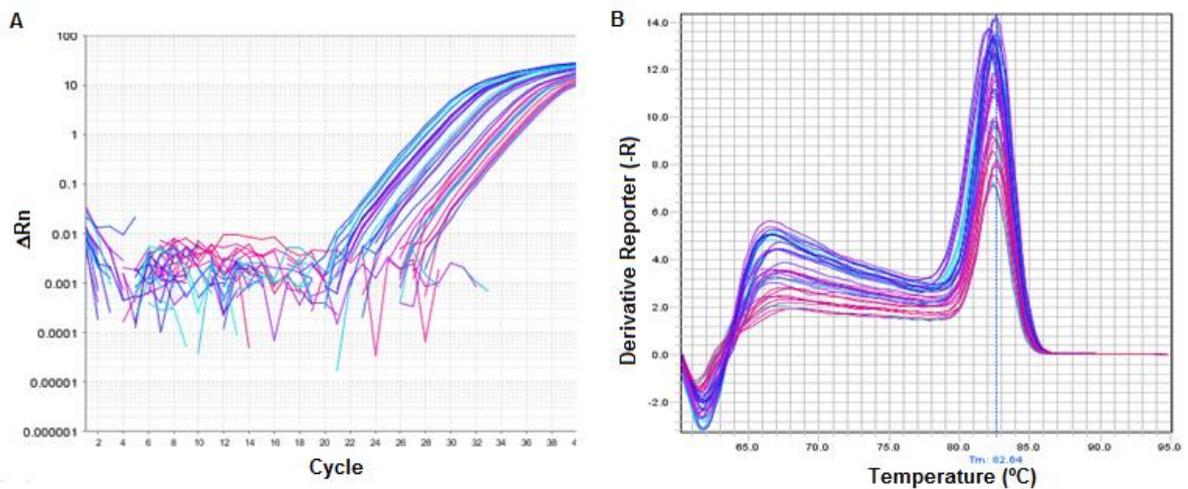
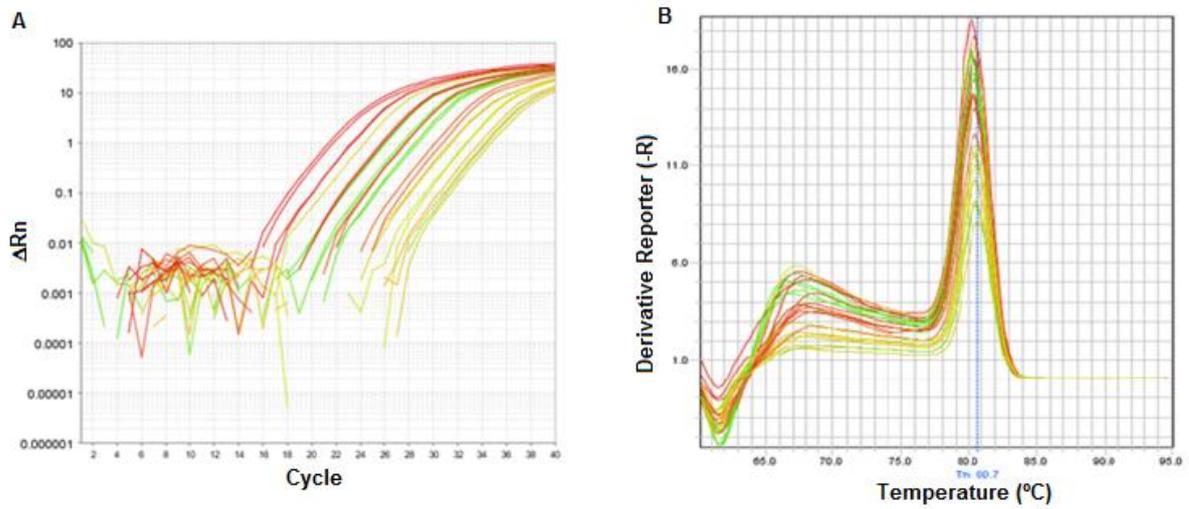


Figura 2: **Representação da qPCR do gene CYP19A1**

A: Status da reação de amplificação. Representa o aumento da fluorescência em relação ao ciclo limiar (Ct).



B: Curva de Melting.

Figura 3: **Representação da qPCR do gene β_2 -microglobulina**

A: Status da reação de amplificação. Representa o aumento da fluorescência em relação ao ciclo limiar (Ct).

B: Curva de Melting.

Tabela I. Dados de eficiência (%) das curvas padrão dos genes HSD3B1, CYP19A1 e β_2m ,

Gene	Eficiência (%)
HSD3B1	106
CYP19A1	105
β_2m	110

β_2m : β_2 -microglobulina.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados deste estudo, foi possível identificar os genes HSD3B1 e CYP19A1 em amostras de CaP primário e HPB, porém, apenas o CYP19A1 apresentou diferença significativa de expressão entre os grupos analisados, apresentando níveis mais elevados nas amostras de HPB em comparação com o CaP. Esse resultado sugere que esses genes podem estar envolvidos na patogênese dessas doenças e representam um possível mecanismo de proliferação tumoral através da síntese intraprostática de esteroides sexuais. Entretanto, investigações futuras são necessárias para uma melhor compreensão do papel exato que eles desempenham nas doenças prostáticas e da influência que possuem na progressão tumoral.

Como perspectivas para este estudo temos a análise da atividade enzimática de 3β -HSD1 e aromatase, assim como a análise de outras enzimas envolvidas na via de síntese de hormônios esteroides. Além disso, estudos com linhagens de CaP e HPB serão incluídos para o estudo de possíveis inibidores seletivos ou moduladores enzimáticos.

REFERÊNCIAS

- ABESHOUSE, A. et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 1011–1025, nov. 2015.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ARMANDARI, I. et al. Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy. **Prostate International**, v. 2, n. 3, p. 105–113, 1 set. 2014.
- BARRY, M. J. et al. The American Urological Association Symptom Index for Benign Prostatic Hyperplasia. **The Journal of Urology**, v. 197, n. 2, p. S189–S197, fev. 2017.
- BASU, S.; TINDALL, D. J. Androgen Action in Prostate Cancer. **Hormones and Cancer**, v. 1, n. 5, p. 223–228, 16 out. 2010.
- BENNETT, N. C. et al. Evidence for Steroidogenic Potential in Human Prostate Cell Lines and Tissues. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 3, p. 1078–1087, set. 2012.
- CARRUBA, G. Estrogens in Prostate Cancer. In: **Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective**. London: Springer London, 2013. p. 369–381.
- CARSON, C.; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 61, n. 4, p. 2–7, abr. 2003.
- CARVALHO-SALLES, A. B.; TAJARA, E. H. Fatores hormonais e genéticos na próstata normal e neoplásica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 3, p. 177–185, jun. 1999.
- CENTER, M. M. et al. International Variation in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. **European Urology**, v. 61, n. 6, p. 1079–1092, jun. 2012.
- CERQUEIRA, N. M. F. S. A. et al. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. **Biochemistry**, v. 55, n. 39, p. 5483–5506, 4 out. 2016.
- CHUGHTAI, B. et al. Benign prostatic hyperplasia. **Nature Publishing Group**, v. 2, 2016.
- CICCARESE, C. et al. AR-V7 and prostate cancer: The watershed for treatment selection? **Cancer Treatment Reviews**, v. 43, p. 27–35, fev. 2016.
- CRAWFORD, E. D. Epidemiology of prostate cancer. **Urology**, v. 62, n. 6, p. 3–12, dez. 2003.
- DAI, C.; HEEMERS, H.; SHARIFI, N. Androgen Signaling in Prostate Cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 7, n. 9, p. a030452, 1 set. 2017.
- EELES, R. et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 1, p. 18–31, 3 dez. 2013.

ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. The Dual, Opposing Roles of Estrogen in the Prostate. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1155, n. 1, p. 174–186, 1 fev. 2009.

ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 4–5, p. 246–251, 28 fev. 2010.

FLÜCK, C. E.; MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The 17, 20-Lyase Activity of Cytochrome P450c17 from Human Fetal Testis Favors the Δ 5 Steroidogenic Pathway. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 8, p. 3762–3766, ago. 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAMMERICH, K. H.; AYALA, G. E.; WHEELER, T. M. Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. **Cambridge University, Cambridge**, n. November 2016, p. 1–10, 2009.

HÄRKÖNEN, P. L.; MÄKELÄ, S. I. Role of estrogens in development of prostate cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 297–305, nov. 2004.

HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. **Radiologic Clinics of North America**, v. 38, n. 1, p. 1–14, jan. 2000.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen Receptor in Prostate Cancer. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 2, p. 276–308, 1 abr. 2004.

HETTEL, D.; SHARIFI, N. HSD3B1 status as a biomarker of androgen deprivation resistance and implications for prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 3, p. 191–196, 12 dez. 2017.

HOFLAND, J. et al. Evidence of limited contributions for intratumoral steroidogenesis in prostate cancer. **Cancer research**, v. 70, n. 3, p. 1256–64, 1 fev. 2010.

INCA. **Câncer de próstata**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

KAO, Y. C. et al. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. **Environmental health perspectives**, v. 106, n. 2, p. 85–92, fev. 1998.

KIRBY, R. S. The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? **Urology**, v. 56, n. 5, p. 3–6, 1 nov. 2000.

KNUUTTILA, M. et al. Antiandrogens Reduce Intratumoral Androgen Concentrations and Induce Androgen Receptor Expression in Castration-Resistant Prostate Cancer Xenografts. **The American Journal of Pathology**, v. 188, n. 1, p. 216–228, 1 jan. 2018.

KRISHNA, S. N.; BERGAN, R. C. Therapeutic modulation of prostate cancer metastasis. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 223–239, fev. 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LEE, F. et al. Transrectal ultrasound in the diagnosis of prostate cancer: Location, echogenicity, histopathology, and staging. **The Prostate**, v. 7, n. 2, p. 117–129, 1985.

LIU, L. L. et al. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 33, n. 24, p. 3140–3150, 12 jun. 2014.

LUU-THE, V.; BÉLANGER, A.; LABRIE, F. Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 207–221, abr. 2008.

MILLER, W. L. Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis*. **Endocrine Reviews**, v. 9, n. 3, p. 295–318, 1 ago. 1988.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 1, p. 81–151, fev. 2011.

MOBLEY, D.; FEIBUS, A.; BAUM, N. Benign prostatic hyperplasia and urinary symptoms: Evaluation and treatment. **Postgraduate Medicine**, v. 127, n. 3, p. 301–307, 4 maio 2015.

MOTTET, N. et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. **European Urology**, v. 71, n. 4, p. 618–629, abr. 2017.

NGUYEN, P. T. T. et al. Variation in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity and in pregnenolone supply rate can paradoxically alter androstenedione synthesis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 1–2, p. 12–20, jan. 2012.

NIU, Y.-N.; XIA, S.-J. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. **Asian journal of andrology**, v. 11, n. 1, p. 28–35, jan. 2009.

NOGUEIRA, L. et al. Câncer de Próstata Resistente à Castração: Definição e Tratamento Inicial. 2016.

PATEL, N. D.; PARSONS, J. K. Epidemiology and etiology of benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. **Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India**, v. 30, n. 2, p. 170–6, abr. 2014.

RAHMAN, H. P.; HOFLAND, J.; FOSTER, P. A. In touch with your feminine side: how oestrogen metabolism impacts prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 23, n. 6, p. R249–R266, jun. 2016.

RHODEN, E. L.; AVERBECK, M. A. Câncer de próstata localizado Localized prostate cancer. v. 54, n. 1, p. 92–99, 2010.

RUBINOW, K. B. An intracrine view of sex steroids, immunity, and metabolic regulation. **Molecular Metabolism**, v. 0, n. 0, mar. 2018.

SCHIFFER, L.; ARLT, W.; STORBECK, K.-H. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 465, p. 4–26, 15 abr. 2018.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, jan. 2017.

SIMARD, J. et al. Molecular Biology of the 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 Isomerase Gene Family. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 4, p. 525–582, 1 jun. 2005.

THOMAS, M. P.; POTTER, B. V. L. The structural biology of oestrogen metabolism. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, p. 27–49, set. 2013.

WADOSKY, K. M. et al. Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. **Oncotarget**, v. 8, n. 11, p. 18550–18576, 13 mar. 2017.

WEIN, A. J. et al. **Campbell-Walsh Urology**. Philadelphia: Elsevier, 2016.

WHITE, C. W.; XIE, J. H.; VENTURA, S. Age-related changes in the innervation of the prostate gland. **Organogenesis**, v. 9, n. 3, p. 206–215, 27 jul. 2013.

ZHOU, Y.; BOLTON, E. C.; JONES, J. O. Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 54, n. 1, p. R15–R29, 8 dez. 2014.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “THE PROSTATE”

Author Guidelines

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

Title page. This should contain the complete title of the paper: the names and affiliations of all authors; the institution at which the work was performed (specific to the department level); the name, address, telephone and fax numbers, and E-mail address for all correspondence; and a shortened title, not more than 40 characters, to be used as a running head. If a manuscript was worked on by a group, one or more authors may be named from this group. The other members of the group are not considered authors, but may be listed in an acknowledgment. Contract grant acknowledgment, giving the name of the contract grant sponsor and the contract grant number must be supplied, if applicable, as the last item of the title page. Other acknowledgments must be supplied at the end of the manuscript.

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

Abstract. This should be a factual condensation of the entire work structured into four paragraphs titled, **Background**, **Methods**, **Results**, and **Conclusions**.

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

Search Engine Optimization: Driving usage and readership is critically important to raising the visibility of your published research. One of the key factors in sustaining long-term usage is through search engine optimization (SEO). Below is a list of suggested ways of maximizing your SEO.

1. Make sure your article title is SEO-friendly. It should be descriptive, and it must include a key phrase from your topic. Key words should appear within the title's first 65 characters.
2. Provide up to five topic-specific key words or phrases in the keyword field.
3. Be sure your key words and phrases appear in your abstract several times, but don't go overboard or the search engine may kick you out.
4. When referencing authors, be consistent. Use their names as they generally appear in past online publications.
5. When appropriate, use your key words in article section headings. Remember: They can't read it if they can't find it! For more detailed information on SEO, including helpful examples, go to <http://authorservices.wiley.com/bauthor/seo.asp>.

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

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

References.

AMA – American Medical Association

References: All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In-text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Journal article:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book:

2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style - [AMA Manual of Style](#)

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

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

Illustrations. Use illustrations sparingly. They should be numbered in one consecutive series using Arabic numerals and be cited in order in the text. Four-color illustrations will be considered for publication. Illustrations will be in color in the online version of the article at no cost to the author. Color illustrations will be converted to black and white for the print issue, also at no cost to the author. Alternatively, authors can choose to pay a fee for color printing (\$850 per figure). A color printing request form is provided with author proofs.

Rapid Communications

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

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

Guidelines for Electronic Submission

File Requirements:

Text. Must be submitted in Word (DOC or RTF). Do not embed tables or figures. Please include the title page, synopsis, abstract, main body, references, acknowledgements, and figure legends in a single file. Length should be within 25 double-spaced pages.

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

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

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

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

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

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

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

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

Creative Commons Attribution License OAA

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

CONFLICT OF INTEREST

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

Video Abstracts

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in this journal. You can learn more about it at www.wileyauthors.com/videoabstracts. If you have any questions, please direct them to videoabstracts@wiley.com.

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

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Prezado Senhor

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

Como o senhor tem o diagnóstico de _____ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendada cirurgia para a retirada da glândula, gostaríamos de convidá-lo para participar deste estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em uma coleta de amostra de sangue e a permitir 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 consulta a dados do seu prontuário, como idade, peso, altura, uso de medicamentos e dosagens hormonais anteriores. O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia, e este procedimento não apresenta nenhum risco para sua saúde.

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

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras de sangue e de tecido para que outras características possam ser analisadas em outros trabalhos de nosso grupo relacionadas a linha de pesquisa “mecanismo de ação de hormônios esteróides em tecido prostático”. No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação de fatores de risco de desenvolver tumores de próstata e também na compreensão do mecanismo de desenvolvimento destas alterações prostáticas. 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 senhor 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^a. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, UFRGS, 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: _____