

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**Expressão gênica e protéica das isoformas dos receptores de  
estrogênio e da enzima aromatase em hiperplasia prostática  
benigna e câncer de próstata**

**Fernanda Eugênia Rodrigues Seibel**

**Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas:  
Fisiologia

**Porto Alegre, 2010.**

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

## **AGRADECIMENTOS**

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

À minha orientadora Ilma Simoni Brum da Silva por toda sua dedicação e por ter me dado essa oportunidade única sem me conhecer, acreditando no meu trabalho.

À Gisele Branchini, pela amizade e pela ajuda incondicional no desenvolvimento dos experimentos deste trabalho.

Ao meu namorado Alex Sander da Rosa Araújo pelo auxílio nos experimentos, incentivo, compreensão e paciência.

Aos colegas Vanderlei Biolchi, Ana Paula Santin e Lolita Pizzolato pela amizade, dicas e “empréstimos” de material para os experimentos.

Aos colegas de mestrado Vanessa Lora e Gustavo Dias Ferreira pela amizade, paciência, incentivo e o excelente convívio diário de trabalho.

Ao professor Marcelo Grillo pela sua ajuda fundamental nos meus estudos para a finalização do curso e à professora Maria Flávia Ribeiro pelo exemplo e ensinamentos na disciplina de Ensino Didático.

Aos meus colegas de laboratório Carol, Aline, Tiago, Bruna, Klaus e Vivian pela animação contagiante.

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. Próstata.....	12
1.2. Hiperplasia Prostática Benigna.....	13
1.3. Câncer de Próstata.....	15
1.4. Estrogênios.....	18
1.4.1. Mecanismos de ação dos estrogênios.....	22
1.4.2. Receptor de estrogênio.....	24
1.5. Aromatase.....	32
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
3.1. Delineamento do estudo.....	36
3.2. População em estudo.....	36
3.3. Critérios de inclusão e de exclusão.....	37
3.4. Aspectos éticos .....	37
3.5. Cálculo da amostra.....	38
3.6. Coleta de amostras.....	38
3.7. Extração de RNA.....	39
3.7.1. Quantificação do RNA.....	40
3.8. Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa.....	41
3.8.1. Síntese de cDNA.....	41
3.8.2. Protocolo geral da PCR.....	42
3.9. Western blot.....	44
3.9.1. Extração de proteínas.....	44
3.9.2. Dosagem de proteínas.....	44

3.9.3. Análise de proteínas.....	45
3.9.4. Auto-radiografias.....	46
3.10. Dosagem hormonal.....	47
3.11. Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Características dos pacientes.....	49
4.2. Expressão gênica do receptor de estrogênio $\alpha$ .....	52
4.3. Expressão protéica do receptor de estrogênio $\alpha$ .....	54
4.4. Expressão gênica do receptor de estrogênio $\beta_2$ .....	56
4.5. Expressão gênica do receptor de estrogênio $\beta_5$ .....	58
4.6. Expressão protéica do receptor de estrogênio $\beta$ .....	60
4.7. Expressão gênica da aromatase.....	62
4.8. Comparação da expressão gênica dos receptores de estrogênio na hiperplasia prostática benigna.....	64
4.9. Comparação da expressão gênica dos receptores de estrogênio no câncer de próstata.....	65
4.10. Comparação da expressão protéica dos receptores de estrogênio na hiperplasia prostática benigna.....	66
4.11. Comparação da expressão protéica dos receptores de estrogênio no câncer de próstata.....	67
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
8. ANEXO.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

**17 $\beta$ HSD** - 17 $\beta$ -hidróxi-esteróide desidrogenase

**AR** – Receptores de androgênios

**$\beta$ 2-m** -  $\beta$ 2-microglobulina

**BSA** - Albumina sérica bovina

**cDNA** – Ácido desoxirribonucléico complementar

**CaP** – Câncer de próstata

**CoRegs** – Proteínas co-reguladoras

**DEPC** - Dietilpirocarbonato

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**dNTPs** - Desoxinucleotídeos trifosfatados

**DTT** - Ditioneitol

**E2** - 17 $\beta$ -estradiol

**EBP** – proteínas não-ER ligantes de estrogênio associadas à membrana

**EDTA** - Ácido Etilenodiaminotetracético

**ER** – Receptor de estrogênio

**ER $\alpha$**  – Receptor de estrogênio  $\alpha$

**ER $\beta$**  – Receptor de estrogênio  $\beta$

**ER $\beta$ -1** – Receptor de estrogênio  $\beta$  1

**ER $\beta$ -2** – Receptor de estrogênio  $\beta$  2

**ER $\beta$ -4** – Receptor de estrogênio  $\beta$  4

**ER $\beta$ -5** – Receptor de estrogênio  $\beta$  5

**ERE** - Elemento responsivo ao estrogênio

**ERR $\alpha$**  - Receptor nuclear  $\alpha$  relacionado ao estrogênio

**GC** – Células germinativas

**HCPA** – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**HEPES** - N-[2-hidroxietil]piperazina]-N-[2-ácido etanosulfônico]

**HPB** – Hiperplasia prostática benigna

**INCA** – Instituto Nacional do Câncer

**LC** - Células de Leydig

**LNCaP** - Células de câncer de próstata responsivas aos androgênios

**mRNA** – Ácido Ribonucléico mensageiro

**NC** - Nitrocelulose

**NO** – Óxido nítrico

**NR** – Receptores nucleares

**PC3** - Células de câncer de próstata resistente aos androgênios

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**pré-mRNA** – pré-RNA mensageiro

**PSA** – Antígeno prostático específico

**PMSF** – Fenilmetilsulfonilfluoreto

**RNA** – Ácido Ribonucléico

**RNA pol** – RNA polimerase II

**RT** – transcrição reversa

**RT-PCR** - Reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa

**RTU** – Ressecção transuretral

**SDS** - Sulfato dodecil de sódio

**SERM** – Modulador seletivo do receptor de estrogênio

**TNM** – Classificação dos tumores malignos

**TP** – Tecido prostático

## LISTA DE FIGURAS:

**Figura 1.** Localização e anatomia da próstata.

**Figura 2.** Fontes e alvos de estrogênio no sistema reprodutor masculino.

**Figura 3.** Modelos de ação dos estrogênios.

**Figura 4.** Representação esquemática dos receptores de estrogênio.

**Figura 5.** Isoformas dos receptores de estrogênio.

**Figura 6.** ER- $\alpha$  media as ações adversas do estrogênio na próstata.

**Figura 7.** ER- $\beta$  media as ações benéficas do estrogênio na próstata.

**Figura 8.** Regulação transcricional estrogênio dependente por ER $\alpha$  e ER $\beta$  homo e heterodímeros.

**Figura 9.** Modelo da interação das isoformas ER $\beta$  durante a transcrição.

**Figura 10.** Expressão gênica do ER $\alpha$  em amostras de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

**Figura 11.** Análise dos níveis protéicos de ER $\alpha$  das amostras de hiperplasia prostática benigna comparadas com as amostras de câncer de próstata.

**Figura 12.** Expressão gênica do ER $\beta$  2 em amostras de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

**Figura 13.** Expressão gênica do ER BETA 5 em amostras de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

**Figura 14.** Análise dos níveis protéicos de ER $\beta$  das amostras de hiperplasia prostática benigna comparadas com as amostras de câncer de próstata.

**Figura 15.** Razão da expressão gênica da aromatase em relação à  $\beta_2$ microglobulina.

**Figura 16.** Relação da expressão gênica dos receptores de estrogênio nos pacientes com hiperplasia prostática benigna.

**Figura 17.** Relação da expressão gênica dos receptores de estrogênio nos pacientes com câncer de próstata.

**Figura 18.** Relação da expressão protéica dos receptores de estrogênio nos pacientes com hiperplasia prostática benigna.

**Figura 19.** Relação da expressão protéica dos receptores de estrogênio nos pacientes com câncer de próstata.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Estimativas para o ano de 2010 para o Rio Grande do Sul das taxas brutas de incidência de câncer de próstata por 100 mil homens e do número de casos novos segundo localização primária

**Tabela 2.** Características dos oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA

**Tabela 3.** Condições finais para PCR após desnaturação inicial

**Tabela 4.** Perfil dos pacientes

**Tabela 5.** Características dos pacientes com câncer de próstata

## RESUMO

Tanto os androgênios quanto os estrogênios possuem um papel significativo na próstata e são indispensáveis para o crescimento normal prostático. A enzima aromatase catalisa a reação de conversão de androgênios para estrogênios. O papel dos estrogênios e seus receptores na etiologia e progressão do câncer de próstata (CaP) e da hiperplasia prostática benigna (HPB) é muito pouco compreendido.

**Objetivo:** Analisar a expressão do mRNA dos receptores de estrogênio ER $\alpha$ , ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 5 e da enzima aromatase. Analisar a expressão protéica do ER $\alpha$  e ER $\beta$  nos grupos CaP e HPB.

**Métodos:** Tecidos prostáticos oriundos de câncer de próstata e de hiperplasia prostática benigna foram submetidos à extração de RNA total com o reagente Trizol, o RNA foi reversamente transcrito para cDNA e avaliado usando RT-PCR para a expressão dos receptores de estrogênio  $\alpha$ ,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5 e aromatase. A expressão protéica de ER $\alpha$  e ER $\beta$  foi analisada por Western blot. **Resultados:** Comparações entre os tecidos hiperplásico e de carcinoma indicaram uma maior expressão do mRNA ER $\alpha$  ( $P < 0,001$ ) e da proteína ( $P < 0,038$ ) em amostras de câncer comparada a HPB. A expressão do mRNA do ER $\beta$ 5 foi significativamente aumentada nos tecidos hiperplásicos comparada ao grupo câncer. A expressão do mRNA do ER $\beta$ 2 e da aromatase não foi diferente entre os grupos HPB e CaP. Nossos resultados também mostraram que a expressão protéica do ER $\beta$  não foi diferente entre os grupos HPB e CaP.

**Conclusões:** O presente estudo indicou que a expressão protéica e gênica do ER $\alpha$  e a expressão gênica do ER $\beta$ 5 são diferentes entre os grupos sugerindo que o aumento dos níveis do ER $\alpha$  no CaP e do mRNA ER $\beta$ 5 na HPB pode ser importante na progressão das doenças prostáticas.

## Abstract

Both androgens and estrogens play a significant role in the prostate and are critical for normal prostate growth. The aromatase enzyme catalyzes the reaction to conversion of androgens to estrogens. The role of estrogen and its receptors in the etiology and progression of prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) is poorly understood.

**Objective:** The purpose of this study was to evaluate the estrogen receptors ER $\alpha$ ,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5 and aromatase enzyme mRNA expression and to investigate also the ER $\alpha$  and ER $\beta$  protein expression in groups PCa and BPH.

**Method:** Total RNA of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia tissues was extracted from each sample by the Trizol method and cDNA was performed. ER $\alpha$ , ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 5 estrogen receptors and aromatase gene expression were quantified by RT-PCR. ER $\alpha$  and ER $\beta$  protein expression was evaluated by Western blot.

**Results:** Comparisons of the hyperplastic and tumor prostate tissues indicated an overexpression of ER $\alpha$  mRNA ( $P < 0,001$ ) and protein ( $P < 0,038$ ) in tumor specimens. The mRNA expression of ER $\beta$ 5 was significantly increased in hyperplastic tissues compared to tumor group. The mRNA expression of ER $\beta$ 2 and aromatase was not different between BPH and PCa groups. Our results also showed that the protein expression of ER $\beta$  was not different between BPH and PCa groups.

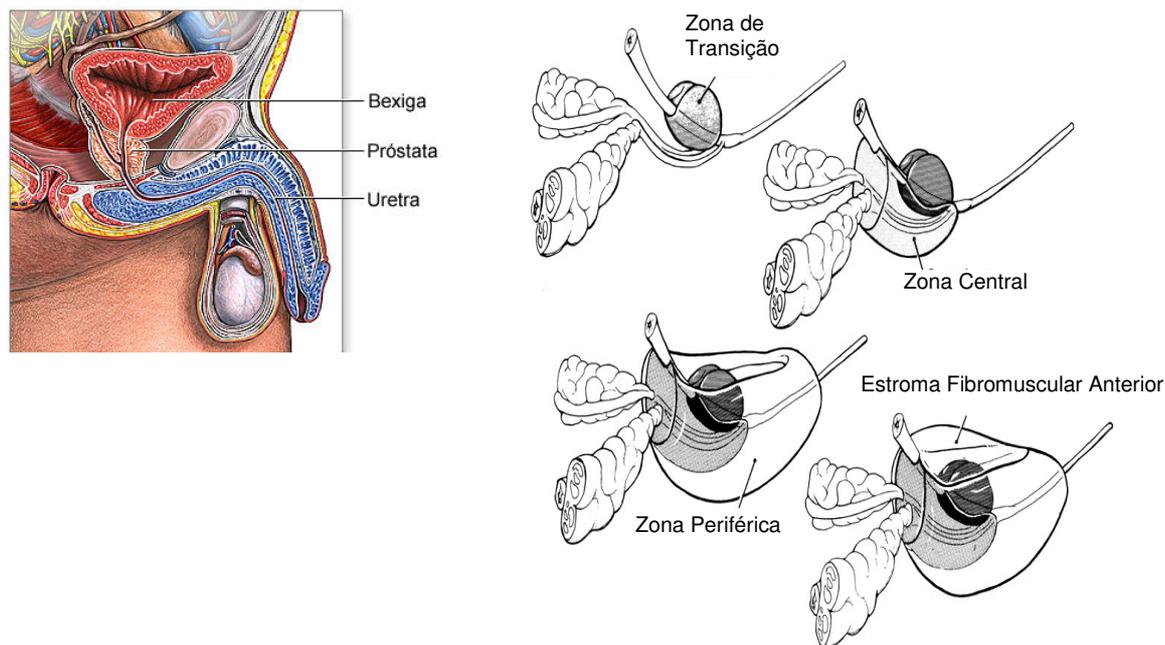
**Conclusions:** The present study indicated that gene and protein expression ER $\alpha$  and gene expression ER $\beta$ 5 are different between the groups suggesting that the ER $\alpha$  increased levels in PCa and mRNA ER $\beta$ 5 in BPH may be important in progression of prostate diseases.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Próstata**

A próstata é uma glândula que faz parte das glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino. Ela circunda a uretra logo abaixo da bexiga urinária e é envolvida por uma cápsula espessa de tecido conjuntivo (MARIEB & HOEHN, 2009). A função da próstata é produzir o líquido prostático que é útil para a movimentação, nutrição e preservação dos espermatozoides. O líquido prostático entra na uretra por diversos ductos, quando o músculo liso prostático se contrai durante a ejaculação. Essa secreção responde por um terço do volume do sêmen (MARIEB & HOEHN, 2009).

A glândula prostática tem três zonas distintas (Figura 1): a zona central que ocupa 25% do volume da glândula, a zona periférica que ocupa 70% da glândula e é o local principal do câncer prostático e a zona de transição, onde se originam a maioria das hiperplasias prostáticas benignas (SIMPSON, 1997).



**Figura 1.** Localização e anatomia da próstata. (Adaptado de Baylor College Medicine, 1990).

## 1. 2. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste no crescimento excessivo do tecido epitelial e fibromuscular da zona de transição da área periuretral da glândula prostática (McNEAL, 1990). A hiperplasia do estroma prostático e das células epiteliais resulta na formação de nódulos grandes e relativamente nítidos nesta região (COTRAN *et al.*, 2005).

A HPB é uma alteração extremamente comum, principalmente, em homens com mais de 50 anos de idade (FOSTER, 2000). Não existem estimativas precisas da sua prevalência porque não há uniformidade nos critérios de diagnóstico da doença (NEUHOUSER *et al.*, 2004). Evidências histológicas de hiperplasia prostática benigna podem ser vistas em aproximadamente 20% dos homens de 40 anos de idade, esse número aumenta para 70% aos 60 anos e para 90% aos 70

anos. Entretanto, não há correlação direta, entre as alterações histológicas e os sintomas clínicos (BARRY & ROEHRBORN, 2001).

Dados da Associação Européia de Urologia mostram que a hiperplasia prostática benigna possui prevalência semelhante à hipertensão e à diabetes na população de mesma faixa etária (CURKENDALL *et al.*, 2000). Além disso, a Associação Americana de Urologia possui informações que confirmam que aproximadamente 50% dos homens entre 51 e 60 anos, e 90% dos acima de 80 anos, desenvolvem hiperplasia prostática benigna ([http://www.urologyhealth.org/search\\_index.cfm?topic=173 & search = benign,prostatic,hyperplasia,epidemiology & searchtype=or](http://www.urologyhealth.org/search_index.cfm?topic=173&search=benign,prostatic,hyperplasia,epidemiology&searchtype=or) acessado em 23/02/10). Dados a respeito da incidência de hiperplasia prostática benigna na população brasileira não estão neste momento disponíveis.

Estudos epidemiológicos sobre a incidência da hiperplasia prostática benigna mostram variações entre diferentes populações étnicas e países. As taxas mais baixas de incidência da HPB estão entre os países asiáticos (DENIS *et al.*, 1999; GRIFFITHS *et al.*, 1998) e asiático-americanos (KANG *et al.*, 2004). Por outro lado, foram observadas taxas de incidência da HPB mais elevadas em populações africanas (DAWAM *et al.*, 2000). Visto que a população brasileira apresenta características étnicas muito heterogêneas, com grande grau de miscigenação entre os povos de origem européia, africana e ameríndia, a correlação entre a presença da HPB e a raça na população brasileira se torna uma tarefa difícil.

Os sintomas da HPB, quando presentes, estão relacionados a dois efeitos secundários:

(1) compressão da uretra com dificuldade à micção e (2) retenção de urina na bexiga com distensão subsequente e hipertrofia da mesma, infecção urinária e

desenvolvimento de cistite e infecções renais. Além do aumento prostático benigno os sintomas podem ser classificados em obstrutivos, como dificuldade para iniciar e esforço para finalizar a micção, diminuição da força e do calibre do jato miccional, gotejamento pós-miccional e sensação de esvaziamento incompleto da bexiga e sintomas irritativos, como urgência miccional, polaciúria, noctúria, hematúria e ardor miccional (COTRAN *et al.*, 2005).

Estudos sugerem que a HPB pode ocorrer devido a um aumento no desequilíbrio entre os fatores associados com o crescimento e a morte celular (IACOPINO *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007).

Existem poucas dúvidas sobre a relação do crescimento da próstata e a ação de androgênios (via receptores de androgênio), o que ainda não está bem claro é como essa interação acontece (LEAV *et al.*, 2001; DJAVAN *et al.*, 2002; BAUMAN *et al.*, 2006). Essa ação androgênica pode ser inibida ou potencializada pelos estrógenios, porém o mecanismo desse efeito aparentemente oposto, não está elucidado (ZHU *et al.*; 2005; BAUMAN *et al.*, 2006).

### **1.3. Câncer de Próstata**

O câncer de próstata (CaP) ou adenocarcinoma de próstata é a segunda forma mais comum de câncer e a segunda maior causa de morte por câncer nos Estados Unidos no sexo masculino (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). O risco de desenvolvimento da doença é de 1 em cada 6 homens, e o risco de morte pela doença é de 1 em 30 (NELSON *et al.*, 2003). A incidência do câncer de próstata está aumentando, possivelmente, decorrente à maior expectativa de vida dos homens

(GRÖNBERG, 2003) e pela melhoria nas técnicas diagnósticas, especialmente com a análise do antígeno prostático específico (PSA) (HANKEY *et al.*, 1999).

Em valores absolutos, o câncer de próstata é o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. Sua taxa de incidência é cerca de seis vezes maior nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento (CARRUBA, 2006).

No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens ficando atrás apenas do câncer de pele não-melanoma. Segundo dados do INCA, o número de mortes no Brasil em 2007 foi 11.478. Dados mais recentes ainda não estão disponíveis, porém o número de casos novos de câncer de próstata estimados no Brasil, para 2010, é de 52.350 (INCA, 2010).

Na Região Centro-Oeste o câncer de próstata é o mais prevalente entre os homens (48/100.000 homens). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, é o mais freqüente nas regiões Sul (69/100.000 homens), Sudeste (62/100.000 homens), Nordeste (44/100.000 homens) e Norte (24/100.000 homens). Estimativas da incidência de novos casos de câncer de próstata para o ano de 2010 no Rio Grande do Sul e Porto Alegre são mostradas na Tabela 1 juntamente com a estimativa para 2010 de outros tipos de câncer que ocorrem com mais freqüência em homens.

**Tabela 1.** Estimativas para o ano de 2010 para o Rio Grande do Sul das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil e do número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primária (Adaptado de INCA, 2010).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	4.510	80,40	690	97,22
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.710	48,33	370	51,70
Estômago	930	16,58	130	17,78
Cólon e Reto	1.520	27,07	310	43,59
Cavidade Oral	800	14,25	110	15,14
Esôfago	1.040	18,50	110	14,49
Leucemias	430	7,75	70	9,60
Pele Melanoma	480	8,61	80	10,76
Outras Localizações	7.910	141,25	1.490	209,01
<b>Subtotal</b>	<b>20.330</b>	<b>363,04</b>	<b>3.360</b>	<b>471,33</b>
Pele não Melanoma	4.190	74,92	320	44,12
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>24.520</b>	<b>437,79</b>	<b>3.680</b>	<b>515,62</b>

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Pouco se sabe sobre as causas do câncer prostático. Todavia, vários fatores de risco estão envolvidos, tais como: etnia, idade, história familiar, níveis hormonais e influências ambientais (YIP *et al.*, 1999; BOYLE *et al.*, 2003; GRÖNBERG, 2003; NELSON *et al.*, 2003).

A incidência do câncer de próstata varia muito entre diferentes populações étnicas e países. As taxas mais baixas estão entre os países asiáticos e as mais altas na América do Norte e na Escandinávia (BENNETT *et al.*, 2002; PLATZ *et al.*, 2000). Entretanto, há um aumento gradual da percentagem desta doença quando pessoas que, apresentam uma baixa taxa de incidência, migram para locais de alta incidência, reforçando a participação de influências ambientais neste cenário (NELSON *et al.*, 2003).

A hereditariedade é um fator bastante importante na etiologia do câncer de próstata, já que homens com familiares de primeiro grau acometidos desta doença, têm um risco duas vezes maior de desenvolvê-la em relação àqueles que não

possuem esse histórico familiar. Esta chance pode aumentar em até 11 vezes, se existem 2 ou 3 membros da família acometidos. A probabilidade de um homem apresentar câncer de próstata é maior se ele tiver um irmão com câncer de próstata do que se for o pai que apresentar a doença (REITER & KERNION, 2002).

Pacientes com doença clinicamente localizada geralmente não apresentam sintomas urinários. Por isso, a lesão é descoberta pelo achado de um nódulo suspeito ao exame retal ou por um nível de PSA elevado. A maioria dos cânceres de próstata aparece periféricamente, longe da uretra, portanto, os sintomas urinários ocorrem tardiamente (COTRAN *et al.*, 2005). Os androgênios e os estrogênios parecem estar relacionados a estimulação da proliferação de células em culturas de câncer de próstata, através de efeitos mediados por receptores (BONKHOFF *et al.*, 1999).

#### **1.4. Estrogênios**

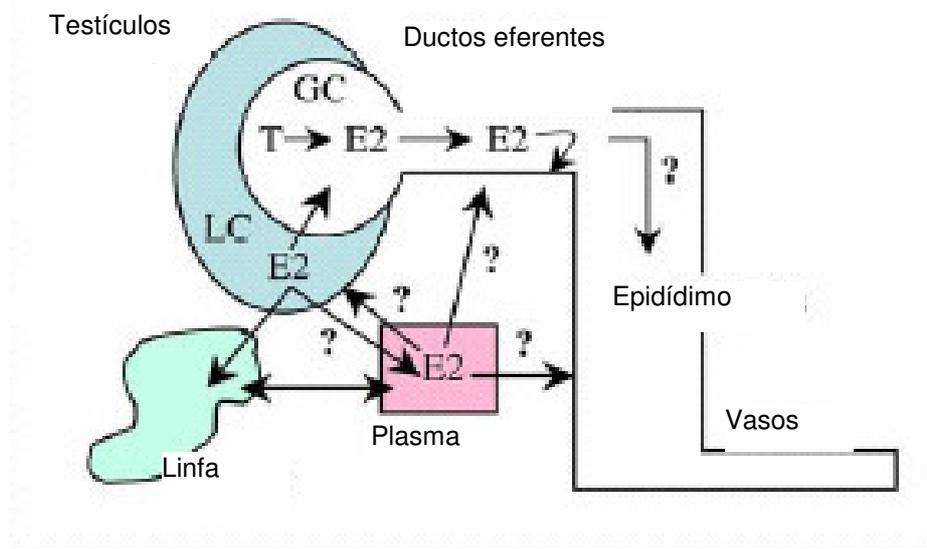
Os estrogênios regulam o crescimento e a diferenciação do sistema genital além da fisiologia dos processos reprodutivos. Também têm influência sobre processos patológicos de cânceres considerados hormônio-dependentes como o de mama, endométrio, próstata, ovário e tireóide (CARRUBA, 2006).

Os estrogênios fazem parte de um grupo de compostos esteróides que funcionam como os principais hormônios sexuais femininos. Apesar dos estrogênios estarem presentes em homens e mulheres, seus níveis são significativamente, maiores em mulheres na idade reprodutiva (CHEN *et al.*, 2008).

Pequenas quantidades de estrogênio são sintetizadas no sexo masculino (cerca de um quinto da quantidade da mulher não-grávida), podendo ser recuperado em quantidades razoáveis em amostras de urina (HESS, 2003).

A concentração de estrogênio no líquido dos túbulos seminíferos é muito alta e, provavelmente, desempenha papel importante na espermogênese. O  $17\beta$ -estradiol (E2) é produzido nos tecidos periféricos e levado via plasma até o sistema reprodutor masculino. Ele é também sintetizado pelas células de Leydig (LC) no interstício testicular, conforme esquematizado na Figura 2. A contribuição do  $17\beta$ -estradiol dos testículos para o plasma e da vasculatura para os testículos é desconhecida, mas presume-se que muito do  $17\beta$ -estradiol presente na linfa possa ser derivado das células de Leydig. Nos testículos adultos, as células de Leydig e as células germinativas (GC) possuem a enzima aromatase p450 que possui papel chave na conversão de androgênios em estrogênios. As células de Leydig podem também contribuir para as concentrações de E2 da rede de fluidos testiculares, mas é mais aceitável que as células germinativas produzam o E2, fornecendo o estrogênio que será alvo do ducto epitelial eferente (região que contém a maior concentração de receptores de estrogênio). Pouco se sabe da função e dos alvos do  $17\beta$ -estradiol no epidídimo e nos vasos deferentes. Além disso, quantidades muito maiores de estrogênio são formadas a partir da testosterona e do androstenediol no sangue, provavelmente até 80% da produção masculina total de estrogênio (HESS, 2003).

## Fontes e alvos de estrogênio



**Figura 2.** Fontes e alvos de estrogênio no sistema reprodutor masculino. (Adaptado de Hess, 2003).

Os estrogênios provavelmente possuem uma função dupla no desenvolvimento do câncer de próstata. Sua eficiência terapêutica em doenças refratárias aos hormônios está amplamente relacionada ao seu efeito supressivo na liberação de gonadotrofinas pela hipófise reduzindo, desta forma, a produção dos androgênios testiculares. Outro mecanismo sugerido é a participação dos estrogênios no crescimento neoplásico prostático por um processo mediado por receptores de estrogênio (BONKHOF *et al.*, 1999).

Os estrogênios, através da interação com seus receptores, possuem papel importante no controle do crescimento e da diferenciação celular. O efeito dos estrogênios no epitélio da próstata continua desconhecido, embora os mesmos tenham sido usados no tratamento do câncer de próstata por causa do seu efeito de inibição do crescimento. Entretanto, tanto pela sua toxicidade quanto pela sua baixa taxa de resposta, o tratamento do câncer de próstata com estrogênio não é mais utilizado (SIGNORETTI & LODA, 2001).

Patologias da próstata estão sendo relacionadas com os estrogênios. Tem sido demonstrado, em diferentes espécies, que os estrogênios em sinergismo com os androgênios, induzem a hiperplasia glandular, a displasia e o câncer de próstata (NILSSON & GUSTAFSSON, 2000).

Em homens, o balanço dos níveis sistêmicos de androgênios e estrogênios é alterado significativamente com a idade. Ocorre declínio dos níveis plasmáticos de androgênios, enquanto os níveis de estrogênio permanecem relativamente constantes ou aumentados. Isto leva à diminuição da razão androgênio/estrogênio com a idade, sugerindo que os estrogênios podem também ter um papel no desenvolvimento do câncer de próstata (CARRUBA, 2006).

As mudanças nas concentrações séricas de esteróides sexuais vistas em homens com idade mais avançada podem promover doenças da próstata. Estudos com células prostáticas de estroma normais apresentaram um estímulo na proliferação das mesmas por um aumento na relação estrogênio/androgênio e na administração dos esteróides separadamente. Experimentos com linhagem de células de câncer de próstata mostraram aumento na proliferação destas com ambos os esteróides, mas a alteração na relação estrogênio/androgênio não teve efeito adicional (KING *et al.*, 2006). Porém, até o momento, evidências clínicas relacionando o aumento dos níveis de estrogênio no soro ou um aumento na relação estrogênio/androgênio com risco elevado de câncer de próstata permanecem inconclusivas, tornando necessários mais estudos sobre esse assunto.

#### **1.4.1. Mecanismo de ação dos estrogênios**

O mais potente estrogênio produzido no corpo é o 17 $\beta$ -estradiol (E2). A atividade estrogênica é mediada pela interação entre os receptores de estrogênio (ERs) e o hormônio, com subsequente ativação dos receptores. Dados da literatura mostraram o efeito direto do estrogênio, por mediação dos seus receptores, em alvos moleculares específicos em cultura de células humanas de câncer de próstata (TAKAHASHI *et al.*, 2007).

O 17 $\beta$ -estradiol representa outro importante ligante natural para os receptores de androgênio (AR) e pode ter um papel essencial na função do AR e no desenvolvimento do sistema reprodutivo masculino (YEH *et al.*, 1998).

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

Outro mecanismo de ação dos estrogênios em que os mesmos podem agir mais rapidamente (dentro de segundos ou minutos) é o chamado mecanismo “não genômico”. A ação ocorre através do ER localizado na membrana plasmática ou através de outros receptores de estrogênio fora da membrana plasmática

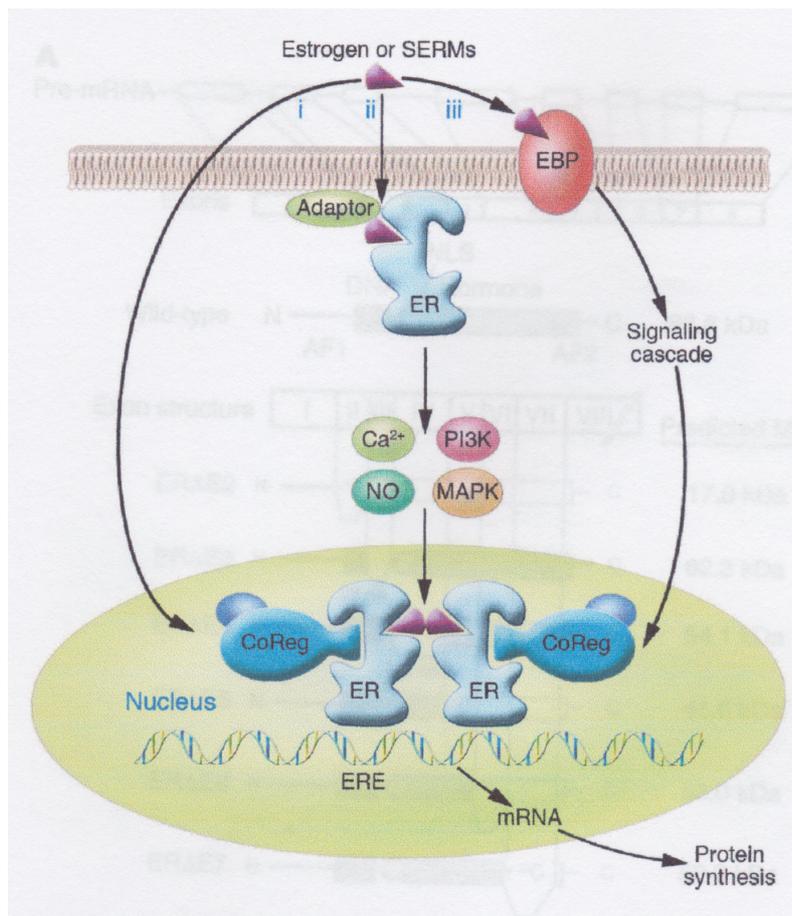
associados a proteínas ligadoras ao estrogênio, resultando na resposta celular tal como o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  ou NO e a ativação de cinases. O ER pode ser alvo na membrana plasmática de proteínas adaptadoras como a caveolina (DEROO & KORACH, 2006).

A Figura 3, resume os diferentes mecanismos de ação dos estrogênios conforme descrito a seguir :

(i) o estrogênio ou outro modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM) liga ao receptor de estrogênio (ER), um fator de transcrição ativado por ligante que regula a transcrição de genes alvos no núcleo pela interação com o elemento responsivo ao estrogênio (ERE), que corresponde a uma seqüência regulatória nos genes alvos e com proteínas co-reguladoras recrutadas (CoRegs) tais como co-ativadores;

(ii) o efeito rápido ou “não-genômico” dos estrogênios pode também ocorrer através do ER localizado na membrana plasmática ou adjacente que pode requerer a presença de proteínas “adaptadoras”, que direcionam o ER para a membrana. A ativação do ER de membrana leva a uma rápida mudança na sinalização de moléculas celulares e a uma estimulação da atividade cinase que pode afetar a transcrição gênica;

(iii) por último, outras proteínas não-ER ligantes ao estrogênio associadas à membrana (EBPs) podem também disparar uma resposta intracelular (DEROO & KORACH, 2006).



**Figura 3.** Modelos de ação dos estrogênios (Adaptada de Deroo & Korach, 2006).

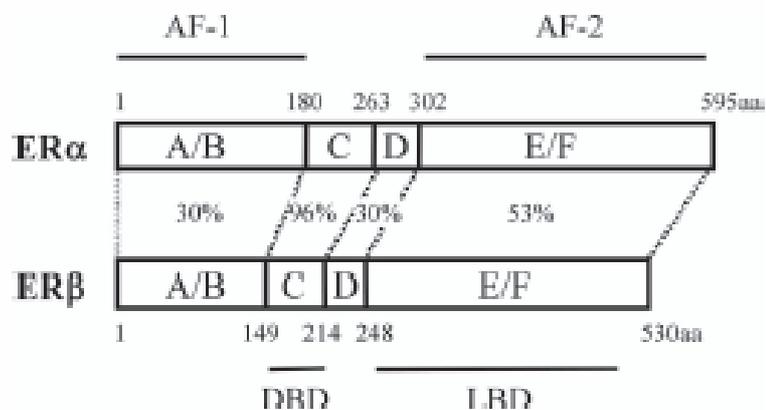
#### 1.4.2. Receptor de estrogênio (ER)

Os receptores de estrogênio pertencem à família de receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição. A sinalização dependente da ligação do estrogênio começa com a ligação deste ao receptor. No entanto, a resposta transcricional celular específica ao estrogênio depende de múltiplos fatores. O fator mais imediato inicia a composição de proteínas co-reguladoras em uma determinada célula e as características de promotores de genes responsivos ao estrogênio. Mesmo que os hormônios sejam moduladores da transcrição, o padrão de

modulação de genes depende também de que outras vias sinalizadoras sejam ativas na célula no momento da exposição ao hormônio (HELDRING *et al.*, 2007).

Foram descritos dois receptores de estrogênio, o receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) e o receptor de estrogênio  $\beta$  (ER $\beta$ ). Embora ambos os receptores tenham igual afinidade de ligação com o 17 $\beta$ -estradiol, outras substâncias, como fitoestrogênios e moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), podem ligar-se ao ER $\alpha$  e ao ER $\beta$  seletivamente (SIGNORETTI & LODA, 2001).

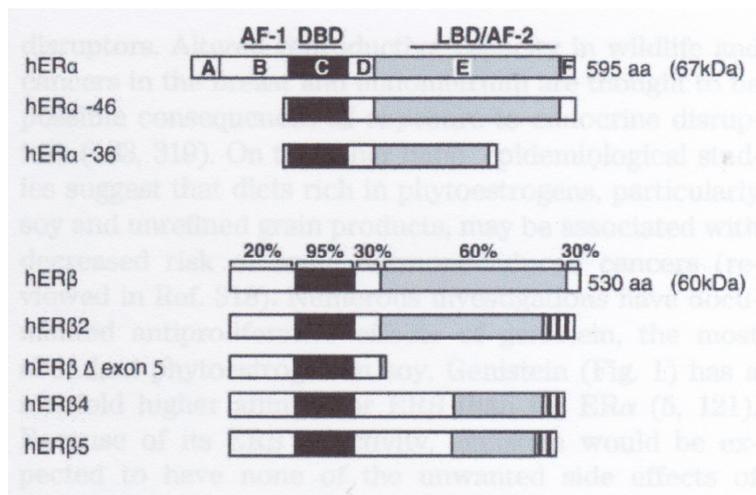
ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Figura 4) são codificados por genes separados, ESR1 e ESR2, respectivamente, que são encontrados em diferentes cromossomos. O gene para o ER $\alpha$  está localizado no locus cromossomal 6q25.1 e o ER $\beta$  está na posição 14q22-24 (KOEHLER *et al.*, 2005).



**Figura 4.** Representação esquemática dos receptores de estrogênio (Adaptado de Bardin *et al.*, 2004).

ER $\alpha$  e ER $\beta$  são classificados como receptores nucleares do tipo I e acredita-se possuírem propriedades comuns a todos os tipos de receptores nucleares do tipo I. Essa classificação deve-se ao fato de que ambos são encontrados no citosol e

fazem translocação nuclear depois da ligação com o ligante. Eles formam homodímeros e ligam a elementos responsivos de mesma origem, que consistem de uma repetição palindrômica (LEUNG *et al.*, 2006). Ambos ERs possuem isoformas conforme esquematizado na Figura 5.



**Figura 5.** Isoformas dos receptores de estrogênio (Adaptada de Heldring *et al.*, 2007).

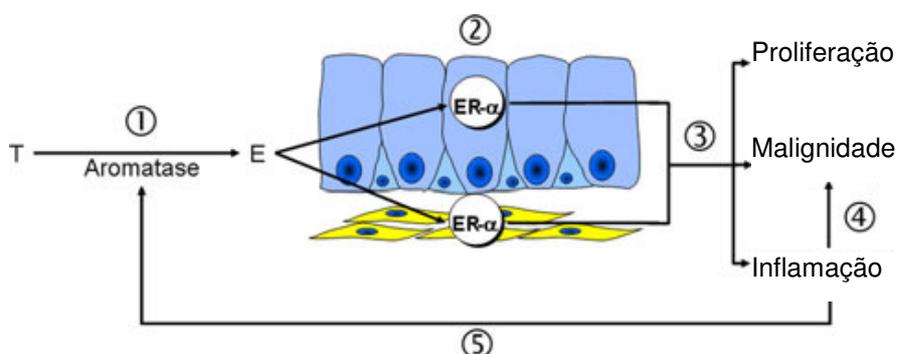
O compartimento de diferenciação do epitélio prostático (células luminais secretoras) expressa altos níveis de ERβ, enquanto o ERα (Figura 6) é restrito ao compartimento de proliferação (células basais). Em altos graus de neoplasia intraepitelial prostática, a expressão do gene ERα se estende às células luminais e isso pode mediar os efeitos carcinogênicos dos estrogênios no epitélio displásico. Independentemente do grau e do estágio, o câncer de próstata mantém grande expressão de ERβ, o que é parcialmente perdido nos estágios insensíveis ao androgênio da doença (BONKHOF & FIXEMER, 2005).

Foi observada alta incidência de expressão do mRNA do ERβ em tecidos de câncer prostático não-tratados. Além disso, a ausência da expressão do mRNA do

ER $\alpha$  e a presença da expressão de mRNA ER $\beta$  em células de câncer de próstata hormônio-independentes e/ou não-tratadas levam à especulação de um mecanismo hormônio refratário caracterizando o câncer de próstata (ITO *et al.*, 2001). O aumento da expressão do receptor nuclear  $\alpha$  relacionado ao estrogênio (ERR $\alpha$ ) é um prognóstico negativo no câncer de próstata (FUJIMURA *et al.*, 2007).

Vários experimentos indicam que as isoformas do ER $\beta$  podem modular de forma diferente a sinalização estrogênica, e como consequência, influenciar nos alvos de regulação do gene (MATTHEWS & GUSTAFSSON, 2003; LEUNG *et al.*, 2006).

O risco de desenvolvimento de câncer de próstata tem sido associado com um nucleotídeo polimórfico único (SNP) rs2987983, localizado na região promotora do gene ER $\beta$ , reforçando a hipótese de que a variação na seqüência da região promotora do ER $\beta$  é importante para o risco de câncer de próstata (THELLENBERG-KARLSSON *et al.*, 2006).



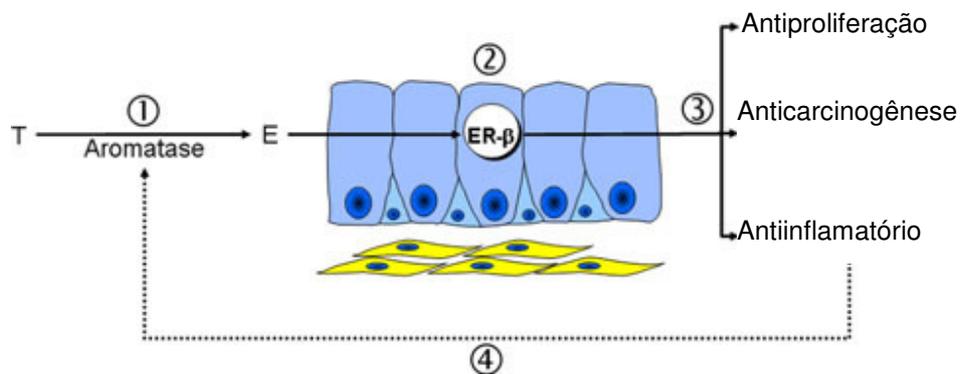
**Figura 6.** ER- $\alpha$  media as ações adversas do estrogênio na próstata. Androgênios são metabolizados em estrogênios localmente dentro da próstata pela enzima aromatase (1); o estrogênio formado sinaliza via ER- $\alpha$ , localizado e expresso dentro do epitélio e do estroma glandular (2) ER- $\alpha$  subsequente exerce efeitos adversos sobre a próstata especificamente proliferação anormal, inflamação e malignidade (3); a indução da inflamação pelo ER- $\alpha$  pode, também, promover o desenvolvimento da malignidade (4) bem como, estimular a expressão da aromatase que está alterada na malignidade e pode ser (5).

induzida por citocinas inflamatórias (5), estimulando um ciclo de atividade. (Adaptado de Ellem & Risbridger, 2009).

Mutações pontuais em ER $\alpha$  e ER $\beta$  não são necessárias para que ocorra o câncer de próstata metastático. Alterações em diferentes áreas dos genes dos receptores de estrogênio são mais freqüentemente encontradas. Esses polimorfismos fazem parte de muitas influências genéticas que acumuladas contribuem para o risco do desenvolvimento de câncer de próstata (BERGNER *et al.*, 2007).

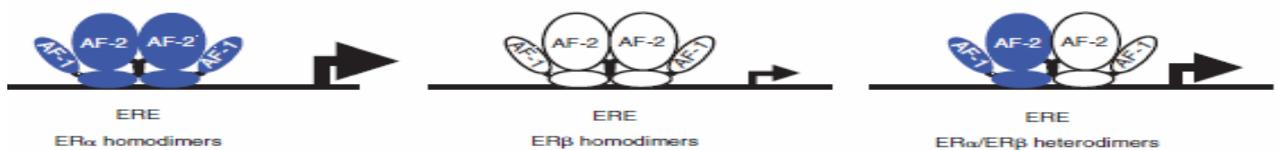
As funções propostas do ER $\beta$  (Figura 7) incluem ação antiproliferativa, regulação da apoptose celular, controle genético da expressão antioxidante, modulação da resposta imune e do comportamento relacionado à ansiedade e do risco de insuficiência cardíaca (IMAMOV *et al.*, 2005).

Em linhagens celulares, o 17 $\beta$ -estradiol na presença de ER $\alpha$  incita a proliferação, mas na presença de ER $\beta$  inibe a proliferação, causando dois efeitos opostos (KOEHLER *et al.*, 2005). O receptor de estrogênio  $\beta$  tem um papel protetor contra a proliferação descontrolada de células. O ER $\beta$  é perdido durante a progressão do câncer de próstata, sugerindo o seu envolvimento direto com a proliferação do tumor na doença. Entretanto, o mecanismo molecular em que se baseia esse efeito não está bem esclarecido (PRAVETTONI *et al.*, 2007). A reexpressão do ER $\beta$  ocorre em todos os casos de cânceres de próstata com metástases (HO *et al.*, 2006).



**Figura 7.** ER- $\beta$  media as ações benéficas do estrogênio na próstata. Androgênios são metabolizados em estrogênios localmente dentro da próstata pela enzima aromatase (1); o estrogênio formado sinaliza via ER- $\beta$ , localizado e expresso dentro do epitélio glandular (2) ER- $\beta$  subseqüentemente exerce efeitos benéficos (e protetores) sobre a próstata tais como antiproliferativo, antiinflamatório e anticarcinogênico (3); ainda desconhecida no momento a ação antiinflamatória do ER- $\beta$  pode também potencialmente resultar na diminuição da expressão da aromatase e então reduzir o estrogênio local (4). (Adaptado de Ellem & Risbridger, 2009)

Os receptores de estrogênio podem formar homodímeros e heterodímeros, conforme esquematizado na Figura 8.



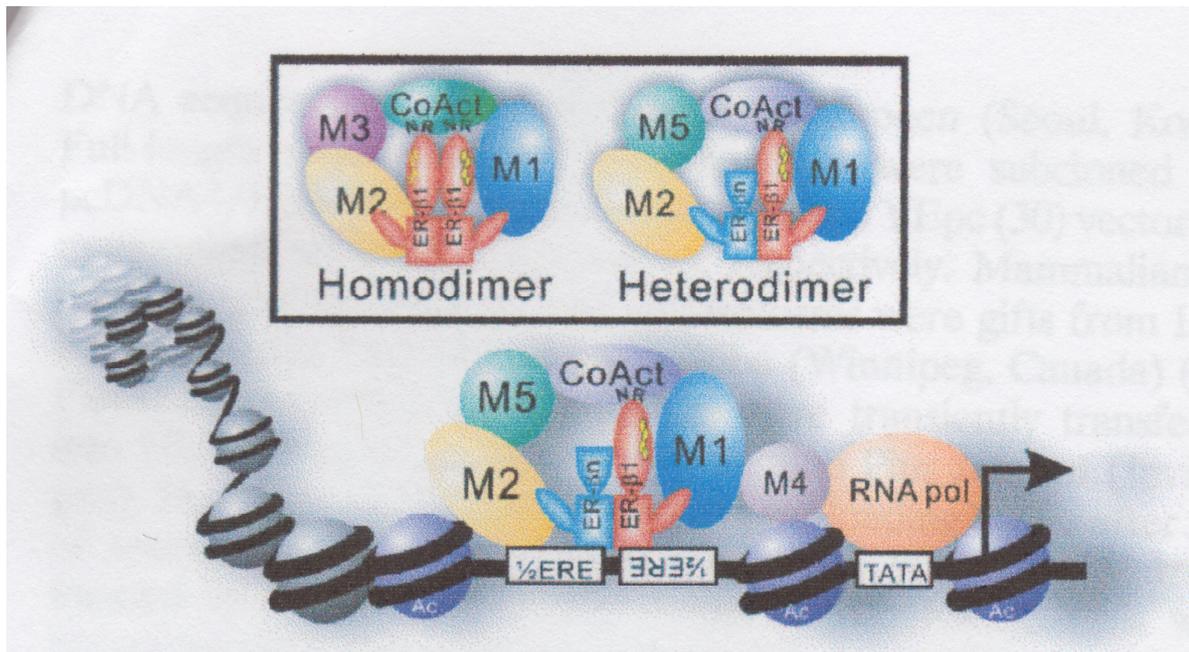
**Figura 8.** Regulação transcricional dependente do estrogênio por ER $\alpha$  e ER $\beta$  homo e heterodímeros (Adaptado de Matthews & Gustafsson, 2003).

O ER $\beta$  parece agir como regulador da sinalização estrogênica e quando co-expressado com o ER $\alpha$  (formando um heterodímero), o ER $\beta$  causa uma redução dependente da concentração na ativação transcricional mediada pelo ER $\alpha$ . Vários grupos têm demonstrado que ER $\alpha$  e ER $\beta$  formam heterodímeros funcionais *in vitro* e

*in vivo* e que se ambas as isoformas são expressas, os heterodímeros predominam. O papel que os heterodímeros exercem na sinalização estrogênica, especialmente na mediação do efeito antagônico do ER $\beta$  sobre a atividade transcricional do Er $\alpha$  é ainda desconhecido (MATTHEWS & GUSTAFSSON, 2003).

Estudos atuais sobre as isoformas do receptor de estrogênio  $\beta$ , mostraram que ER $\beta$ -1 é a única isoforma inteiramente funcional, enquanto que ER $\beta$ -2, ER $\beta$ -4 e ER $\beta$ -5 na forma de seus homodímeros não possuem nenhuma atividade inata própria. Entretanto, essas isoformas podem heterodimerizar com ER $\beta$ -1 e aumentar sua transativação de um modo dependente do ligante (LEUNG *et al.*, 2006).

ER $\beta$ -1 tende a formar heterodímeros com outras isoformas sob a estimulação de estrogênios, mas não de fitoestrogênios. O ER $\beta$ -1 prefere heterodimerizar, particularmente com ER $\beta$ -4 e Er $\beta$ -5, sugerindo que o heterodímero ER $\beta$  pode recrutar apenas um co-ativador durante a ativação transcricional. Um grupo de co-reguladores (M1-5) que, através de acetilação, sustentam uma forma ativa de nucleossomos e funcionam na formação de um complexo transcricional com a RNA polimerase II (RNA pol), são reunidos de uma maneira assimétrica ao redor do heterodímero ER $\beta$ -1, que liga de forma palindrômica simétrica ao elemento responsivo ao estrogênio (ERE), conforme esquematizado na Figura 9 (LEUNG *et al.*, 2006).



**Figura 9.** Modelo da interação das isoformas ER $\beta$  durante a transcrição. A isoforma ER $\beta$ 1 formando homodímeros ou heterodímeros. (Adaptado de Leung *et al*, 2006).

Foi observado que cada tecido ou linhagem celular tem um único padrão e/ou razão de expressão entre ER $\beta$ -1 e suas isoformas. Esses achados sugerem que diferentes estrogênios induzem a formação de diferentes grupos de heterodímeros em um tecido específico ou tipo celular, levando a uma ampla variedade de efeitos biológicos (LEUNG *et al.*, 2006).

Na próstata normal e em células de cultura da linhagem PC3 (células de câncer de próstata resistente aos androgênios) foi detectada a expressão das isoformas ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5 enquanto que em células de cultura da linhagem LNCaP (células de câncer de próstata responsivas aos androgênios) foi detectada predominantemente a expressão da isoforma ER $\beta$ 5 (MOORE *et al.*, 1998)

As diferentes atividades biológicas do ER $\alpha$  e do ER $\beta$  podem ser atribuídas a uma variedade de fatores que precisam ser cuidadosamente estudados no carcinoma de próstata humano. Esses fatores incluem o recrutamento de diferentes

co-ativadores e co-repressores que modificam a transcrição e a homodimerização ao invés de promoverem a heterodimerização desses receptores. Devido ao fato de que a heterodimerização pode ocorrer apenas em células que co-expresssem esses receptores, a avaliação da expressão tanto dos ERs quanto dos co-reguladores, em tecidos normais e tumorais, tornou-se muito importante (LEUNG *et al.*, 2006).

Os receptores de estrogênio também existem como processamentos (*splicing*) alternativos de pré-mRNA. Os processamentos (*splicing*) alternativos podem ser gerados por duplicação do éxon, inserção de material genético adicional ou mutações somáticas que levam a códons finalizadores alterados e/ou inclusão de material intrônico. Comparados com o receptor original, os diferentes produtos de processamento alternativo diferem nas ações que eles participam como consequência da ausência ou configuração diferente dos vários domínios do receptor (TAYLOR *et al.*, 2010).

## **1.5. Aromatase**

Tanto os tecidos prostáticos humanos malignos quanto os normais apresentam enzimas-chave do metabolismo esteróide, incluindo a 17 $\beta$ -hidróxi-esteróide desidrogenase (17 $\beta$ HSD), a 5 $\alpha$ -redutase e a aromatase (CARRUBA, 2007).

A biossíntese local dos estrogênios pode ocorrer via aromatização dos androgênios através da enzima aromatase. Essa enzima pode agir como um importante regulador do balanço entre as concentrações de androgênios e estrogênios, tanto nos tecidos quanto no plasma. O processo irreversível de conversão de androgênios em estrogênios é feito mais especificamente pela

aromatase citocromo P450, pertencente ao complexo enzimático microsomal chamado aromatase (CARREAU *et al.*, 2003).

Estudos mostram um excesso na expressão da aromatase no câncer testicular (tumor de células de Leydig) que levaria a produção aumentada de estrogênios (FOWLER *et al.*, 2000).

Pensa-se que os androgênios podem causar câncer de próstata, porém existe pouco suporte científico para esse pensamento. Devido ao fato de que a testosterona pode ser convertida em  $17\beta$ -estradiol pela enzima aromatase expressa na próstata humana, os estrogênios podem estar envolvidos na indução do câncer de próstata pela testosterona (KROON *et al.*, 2005; BOSLAND, 2006).

Enquanto existem evidências consistentes de que uma aromatase anormal pode ter papel importante no desenvolvimento e/ou progressão do câncer de mama humano, a expressão e a atividade da aromatase na próstata humana não-tumoral e tumoral permanece duvidosa. No câncer de próstata o aumento da expressão e da atividade da enzima aromatase no tecido tumoral podem ser igualmente importantes tanto quanto os receptores de estrogênio dentro do epitélio prostático (CARRUBA, 2007).

Foi bem estabelecido que um feedback positivo via mecanismo parácrino e autócrino, leva a um contínuo crescimento e desenvolvimento de tumores de mama (SIMPSON *et al.*, 1997). De forma significativa, o promotor da aromatase, presente na próstata benigna e no câncer de próstata, responde e pode ser induzido por citocinas inflamatórias. Os estrogênios também são capazes de induzir a inflamação prostática e conseqüentemente, servem para estabelecer um ciclo de aumento da aromatase, síntese de estrogênio local e maior inflamação. Esse suposto mecanismo é de particular interesse já que a inflamação tem sido implicada no

desenvolvimento do câncer de próstata e pode ser o mecanismo pelo qual o estrogênio induz o desenvolvimento da malignidade na próstata (ELLEM & RISBRIDGER, 2009).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral:**

Analisar a expressão gênica e protéica das diferentes isoformas dos receptores de estrogênio e da enzima aromatase em homens com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

### **2.2. Objetivos específicos:**

Analisar a expressão gênica das isoformas do receptor de estrogênio  $\beta$  (ER $\beta$ ), ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5 em tecido prostático humano hiperplásico e de carcinoma.

Analisar a expressão protéica do receptor de estrogênio  $\beta$  (ER $\beta$ ) em tecido prostático humano hiperplásico e de carcinoma.

Analisar a expressão gênica e protéica do receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) em tecido prostático humano hiperplásico e de carcinoma.

Analisar a expressão gênica da enzima aromatase em tecido de câncer de próstata e em hiperplasia prostática benigna.

Verificar a existência de correlação entre a expressão das diferentes isoformas do receptor de estrogênio para cada grupo isoladamente.

Medir as concentrações séricas de testosterona e de estradiol em ambos os grupos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Delineamento do estudo:**

Estudo transversal.

#### **3.2. População em estudo**

Foram convidados a participar do estudo todos os pacientes atendidos pelo Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com procedimento cirúrgico agendado de ressecção transuretral da próstata, prostatectomia parcial ou total no período de março de 2008 a dezembro de 2009.

Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo HPB formado por pacientes com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna e grupo CaP formado por pacientes com diagnóstico de câncer de próstata.

**Grupo HPB** - Pacientes entre 45 e 90 anos, com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna, com volume prostático medido por ecografia abdominal acima de 30g, toque retal sem suspeita de neoplasia maligna, que não estavam em tratamento com hormônios e que não possuíam diagnóstico de neoplasia concomitante, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os pacientes com HPB que participaram deste estudo, já haviam sido submetidos à cirurgia (prostatectomia aberta ou ressecção transuretral) tendo o diagnóstico confirmado pelo exame anatopatológico.

**Grupo CaP** - Pacientes entre 45 e 90 anos, com diagnóstico de câncer de próstata, com volume prostático medido por ecografia abdominal acima de 30g, que não tinham feito tratamento hormonal ou quimioterápico, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Os pacientes foram consultados e autorizaram a utilização do material para este estudo. O tecido prostático foi obtido de pacientes masculinos, submetidos à prostatectomia radical por diagnóstico de câncer de próstata ou por ressecção transuretral (RTU) da próstata por diagnóstico de hiperplasia prostática benigna.

Os objetivos da pesquisa foram explicados aos pacientes e todos assinaram o Termo de Consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

### **3.3. Critérios de inclusão e de exclusão:**

Pacientes com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata e que não tenham recebido tratamento com hormonioterapia ou quimioterapia e que não possuam diagnóstico de outra neoplasia concomitante, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que tenham sido indicados para cirurgia por seu médico responsável.

### **3.4. Aspectos Éticos**

O tecido prostático utilizado foi proveniente de material de descarte de pacientes submetidos à ressecção transuretral de próstata e prostatectomia radical.

Uma vez que se trata de informações genéticas específicas, foi garantido aos pacientes o sigilo em relação às informações obtidas e uso absolutamente restrito para fins de pesquisa científica. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS) com número 08092.

### **3.5. Cálculo Amostral**

O tamanho da amostra para a análise da expressão gênica e protéica no tecido prostático foi calculado através do programa PEPI 3, utilizando-se dados de estudos prévios realizados pelo nosso laboratório (CERICATTO *et al.*, 2005). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90% e diferença entre as médias de 0,1 unidades arbitrárias, chegando-se a um N de 25 pacientes por grupo.

### **3.6. Coleta das amostras**

Foram analisados 50 pacientes neste estudo, os quais foram atendidos no Serviço de Urologia do HCPA.

Amostras de sangue venoso foram coletadas desses pacientes para obtenção de soro para as análises hormonais de testosterona e 17- $\beta$  estradiol.

As amostras de tecido prostático foram coletadas no centro cirúrgico onde os pacientes foram submetidos à remoção cirúrgica conforme diagnóstico médico. Foram obtidos fragmentos da próstata e o restante do material foi encaminhado para o exame anátomo-patológico.

Os fragmentos destinados à análise da expressão gênica e protéica no tecido foram devidamente identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e transferidos para um freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA total e de proteínas.

O diagnóstico de câncer de próstata e de hiperplasia prostática benigna foi realizado com base no exame anátomo-patológico.

Os fragmentos cirúrgicos, destinados à pesquisa foram devidamente identificados (C= tecido de câncer de próstata e H= tecido de hiperplasia prostática benigna), e submetidos de forma individualizada aos processos de extração do RNA total, síntese de cDNA e amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos para determinação dos níveis de mRNA dos genes do ER $\alpha$ , do ER $\beta$ 2, do ER $\beta$ 5 e da Aromatase, e análise de proteína, conforme descrição resumida a seguir.

### **3.7. Extração de RNA**

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

O fragmento de tecido, após congelamento, foi colocado em um tubo *ependorf* com 0,5 mL de Trizol e homogeneizado por aproximadamente 1 minuto em gelo. Foi acrescentado mais 0,5 mL de Trizol e deixado 5 minutos em temperatura ambiente. Passados os 5 minutos, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio a esse material e agitado no vortéx por 15 segundos. O material foi deixado em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm a

4°C. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro *ependorf*, neste foi adicionado 1 mL de propanol, agitado suavemente por inversão e colocado a -20°C *overnight*.

Passado o período *overnight*, o material foi centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C, descartando-se o sobrenadante.

O RNA precipita formando um *pellet*. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado esse foi centrifugado por 10 minutos a 8.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente.

O RNA foi dissolvido em água ultrapura tratada com DEPC, incubado por 10 minutos a 65°C e colocado em banho de gelo durante 1 minuto para posterior quantificação das amostras e estocagem a -20°C.

### **3.7.1. Quantificação do RNA**

O precipitado de RNA foi diluído em 12-20 µL de água com DEPC de acordo com o tamanho do *pellet* formado. Para a quantificação, alíquotas de 1 µL da solução de RNA das amostras foram diluídas em 499 µL de água com DEPC e lidas em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (GeneQuant), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

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

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

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

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

D = 1: 499 = 500 vezes

### **3.8. Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa - RT-PCR**

#### **3.8.1. Síntese de cDNA**

A partir do RNA total, a expressão do mRNA específico para os fatores em estudo foi avaliada indiretamente, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de transcrição reversa (RT), ou simplesmente, RT-PCR.

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

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

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

### **3.8.2. Protocolo Geral da PCR**

As reações de PCR foram feitas para um volume final de 25  $\mu$ L. Foi utilizado 1  $\mu$ L de cDNA (correspondente a aproximadamente 2 ng de cDNA) para todos os genes de interesse, exceto para a aromatase para a qual utilizou-se 2  $\mu$ L de cDNA.

As amostras foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 2 minutos na presença de Tris-HCl (pH 8.4) 200mM, KCl 500mM e MgCl<sub>2</sub> 50mM. Esse procedimento, conhecido como *Hot Start*, tem por objetivo desnaturar estruturas secundárias que, submetidas à ação da polimerase, resultariam na amplificação de fragmentos indesejados. Para os genes ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5 foi acrescentado 1  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO).

Em seguida os tubos foram imersos em gelo e receberam 10  $\mu$ L de uma solução com as mesmas concentrações do tampão Tris-HCl e MgCl<sub>2</sub>, acrescida dos oligonucleotídeos sense e antisense específicos para cada gene de interesse, da mistura de dNTPs e da enzima Taq DNA Polimerase e submetidos à amplificação conforme programa específico para cada gene.

A tabela 2 mostra as características dos oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA para  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2-m) usado como gene normalizador e para ER $\alpha$ , ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 5 e aromatase.

**Tabela 2.** Características dos oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA.

Gene	Seqüência sintetizada sense	Seqüência sintetizada antisense	Fragmento
$\beta_2m$	5'CTATCCAGCGTACTCCAAAG 3'	5'ACAAGTCTGAATGCTCCACT 3'	165 pb
ER $\alpha$	5'CAGGGGTGAAGTGGGGTCTGC3'	5'ATGCGGAACCGAGATGAT3'	483 pb
ER $\beta_2$	5'CTTTGGTTTGGGTGATTG 3'	5'CTTTAGGCCACCGAGTTGATT 3'	208 pb
ER $\beta_5$	5'GATGCTTTGGTTTGGGTGAT 3'	5'GCCACCGAGTTGATTAGAGG 3'	206 pb
AROMATASE	5' TCTGGATCTCTGGAGAGGAAA 3'	5' GCCTTTCTCATGCATACCGA 3'	133 pb

Os oligonucleotídeos para a avaliação da expressão gênica de  $\beta_2m$  (GenBank M17986) ER $\alpha$  (GenBank AF128220), ER $\beta_2$  (GenBank AF051428), ER $\beta_5$  (GenBank AF124790) e aromatase foram desenhados através do programa Primer 3, encontrado no endereço virtual: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. As condições finais da PCR estão listadas na tabela 3. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen Corporation. O produto amplificado pela PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio para os genes ER $\alpha$ , ER $\beta_2$  e ER $\beta_5$  e em gel de agarose low melting 2% para o gene da aromatase.

**Tabela 3.** Condições finais para PCR após desnaturação inicial

GENE	DESNATURAÇÃO	ANELAMENTO	EXTENSÃO	CICLOS	EXTENSÃO FINAL
B2 microglobulina	94°C / 30 seg	55°C / 30 seg	72°C / 1 min	30	72°C/5 min
ER $\alpha$	94°C / 1 min	62°C/ 1 min	72°C / 1 min	38	72°C/5 min
ER $\beta_2$	94°C / 1 min	57°C/50 seg	72°C/50seg	40	72°C/5 min
ER $\beta_5$	94°C / 1 min	57°C/ 40 seg	72°C/50 seg	38	72°C/5 min
AROMATASE	94°C / 1 min	55°C / 50 seg	72°C/50 seg	40	72°C/5 min

As bandas foram quantificadas por análise densitométrica através do sistema de captação de imagem (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Para cada gene de interesse, a análise densitométrica obtida para a banda referente foi corrigida pela banda referente ao gene constitutivo  $\beta_2m$ , sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias.

### **3.9. Western blot**

#### **3.9.1. Extração de proteínas**

Aproximadamente 0,2 gramas de tecido foram homogeneizados individualmente em um homogeneizador Omnix por 30 segundos em velocidade 3 a 4°C na presença de 500  $\mu$ L de uma solução tampão de lise contendo 50 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM de  $Na_4P_2O_7$  e 2 mM de  $NaVO_4$ , 0,1% Triton X-100.

O material foi solubilizado por no mínimo 16 h a 4°C, após foi centrifugado durante 30 minutos a 4°C em velocidade de 12000 x g. O sobrenadante foi coletado e guardado em microtubos a -20°C para dosagem de proteína e realização do Western blot.

#### **3.9.2. Dosagem de proteínas**

Cerca de 10  $\mu$ L de amostra foram utilizados para dosagem de proteínas pelo Método Colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). A quantidade de proteína das amostras foi analisada por leitura de espectrometria com comprimento de onda de 595 nm. Todas as amostras foram testadas em duplicata, com 5  $\mu$ L de amostra

diluída em 95 µL de água e 1000 µL de solução de Bradford, e comparadas com curva padrão de albumina. Para a realização da eletroforese de proteína dos Western blots foram utilizadas 50 µg de proteína por poço.

### **3.9.3. Análise de proteínas**

Para separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE com uma concentração de poliacrilamida de 10%. Foram utilizadas 8 amostras por grupo.

Aproximadamente 50 µg de proteína extraída das amostras foram incubadas com solução de Laemmli (30% glicerol, 10% SDS; 62,5 mM Tris, 750 mg DTT e 0,001% azul de bromofenol) a 95°C por 10 minutos (Laemmli, 1970), e colocadas em cada poço do gel.

A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo 192 mM glicina; 25 mM Tris e 0,1% SDS, pH 8,3. As proteínas migraram no gel por aproximadamente 2 h e 30 min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. A migração das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular.

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e realizada a etapa de transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose por sistema semi-seco. A transferência foi efetuada por 1 hora, com voltagem de 25 v.

As membranas de nitrocelulose foram então incubadas durante 1 h em solução bloqueadora (TBS), contendo 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05% Tween 20, pH 7,4, acrescido de BSA 2%. Esta solução satura sítios de ligação inespecíficos da membrana de nitrocelulose.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por, no mínimo, 16 h a 4°C sob agitação constante, com o anticorpo anti-ER $\beta$  (56 kDa da Santa Cruz Biotechnology – ER $\beta$  H-150) e anti-ER $\alpha$  (66 kDa da Santa Cruz Biotechnology – ER $\alpha$  F-10) diluídos em TBS 1:500.

Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS (3 lavagens de 10 minutos cada) e então incubadas com o segundo anticorpo por 2 horas. Para o ER $\beta$  foi utilizado o anticorpo de cabra anti-coelho (1:5000) e para o ER $\alpha$  foi utilizado o anticorpo de cabra anti-camundongo (1:5000), ambos conjugados com a enzima horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology). Após a incubação com o segundo anticorpo, as membranas foram lavadas novamente com TBS (3 lavagens de 10 minutos cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimio-luminescência (ECL) por 1 min.

#### **3.9.4. Autorradiografias**

Após a incubação com solução para quimio-luminescência, as membranas foram colocadas em contato com o filme fotográfico (GE Healthcare<sup>®</sup>) durante 30 a 120 segundos. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1 min, lavado com ácido acético e colocado por mais 1 min na solução fixadora. Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura. Após a revelação, seguiram-se a visualização e a análise dos resultados. A densidade óptica das bandas foi medida por um sistema de processamento de imagem (Image-Master VDS Pharmacia Biotech). A densitometria obtida para as bandas do ER $\beta$  e ER $\alpha$  foi corrigida pela banda da  $\beta$ -tubulina, sendo os resultados obtidos expressos em unidades arbitrárias.

### **3.10. Dosagem hormonal**

O método utilizado para a dosagem dos hormônios testosterona e 17  $\beta$ -estradiol foi de quimiluminescência por imunoensaio competitivo. O teste foi realizado com os seguintes reagentes: substrato quimiluminescente dioxetano (LSUBM), reagente testosterona total e reagente 17  $\beta$ -estradiol, que são constituídos pela combinação desses hormônios com fosfatase alcalina, e esferas recobertas com um anticorpo altamente específico para esses hormônios.

O método se baseia na competição pelo anticorpo específico das moléculas da amostra analisada com as moléculas de 17  $\beta$ -estradiol e testosterona ligadas à fosfatase alcalina. As análises da testosterona foram realizadas pelo Laboratório de Bioquímica do HCPA e as de 17  $\beta$ -estradiol pelo Laboratório FrideLab. Os resultados da testosterona foram expressos em ng/mL e do 17 $\beta$ -estradiol em pg/mL.

### **3.11. Análise estatística**

Os resultados hormonais, volume prostático, expressão gênica e protéica foram avaliados quantitativamente e não apresentaram distribuição normal, portanto, foi utilizado o teste de Mann Whitney para amostras independentes entre os grupos CaP e HPB.

Este teste foi usado para avaliação dos dados referentes às expressões gênicas dos receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 5 e da enzima aromatase e das proteínas ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Para cada amostra, os resultados foram representados como mediana e intervalo interquartil da mediana, tanto para o câncer de próstata quanto para as amostras de hiperplasia prostática benigna.

Os resultados de idade e PSA foram analisados quanto a sua normalidade, mostrando serem paramétricos. Para estes, foi utilizado para a análise estatística o teste T de Student.

Foi considerado o nível de significância quando  $P < 0,05$ . Todas as análises foram feitas utilizando-se o processador de dados SPSS versão 15.0 (Statistical Packages for the Social Sciences).

## **4. RESULTADOS**

Foram incluídas neste estudo 50 pacientes. 25 pacientes com diagnóstico de câncer de próstata e 25 pacientes com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna.

### **4.1. Características dos pacientes**

Os resultados referentes à idade e aos níveis de PSA dos pacientes estão representados na Tabela 4 como média  $\pm$  desvio padrão. As dosagens hormonais (testosterona e 17 $\beta$  estradiol) e volume prostático estão representados como mediana e intervalo interquartil.

A média de idade e o volume prostático não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos. Os níveis de PSA foram significativamente maiores no grupo câncer de próstata quando comparado com o grupo hiperplasia prostática benigna.

Os valores de testosterona e de 17- $\beta$  estradiol entre os dois grupos não apresentaram diferença significativa. A relação entre 17- $\beta$  estradiol/testosterona mostrou-se aumentada na HPB.

**Tabela 4.** Perfil dos pacientes.

	<b>Hiperplasia</b>	<b>Câncer</b>
Idade (anos)	64,76 ± 7,7	64 ± 6,58
PSA	4,8 ± 3,3	8,69 ± 4,17 *
Volume prostático	42,5 (20-51,7)	40,0 (32-54)
Testosterona (ng/mL)	3,22 (3,15-3,47)	4,60 (2,93-6,79)
17 β Estradiol (pg/mL)	47 (46-50,5)	46 (40-50,5)
Relação 17 β estradiol /testosterona	14,5	10,0 **

Valores expressos como média ± D.P. (teste T Student) ou mediana e intervalo interquartil

(25–75%) (teste de Mann-Whitney). \*  $P = 0.001$  \*\*  $P = 0.025$

Na caracterização dos pacientes com câncer de próstata, utilizando a classificação de tumores malignos (TNM) do INCA 2004, observamos na análise do estadiamento do câncer que 60% dos pacientes apresentavam metástases e que em 40% dos pacientes analisados, o câncer estava confinado somente ao tecido prostático. Já a análise anatomopatológica mostrou que 80% dos pacientes com câncer de próstata possuem 50% de chance de disseminação da doença em 10 anos para outros órgãos e que 20% dos 25 pacientes estudados possuem 75% de possibilidade disto acontecer.

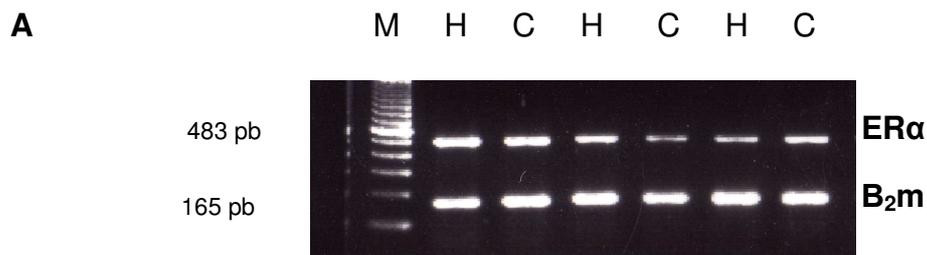
**Tabela 5.** Características dos pacientes com câncer de próstata

<b>Grau de Gleason</b>	<b>Número de pacientes (n=25)</b>
6 (3+3)	9
7 (3+4)	7
7 (4+3)	4
8 (4+4)	2
8 (3+5)	2
9 (4+5)	1
<b>Estadiamento</b>	
T2A	2
T2B	3
T2C	5
T3A	9
T3B	6

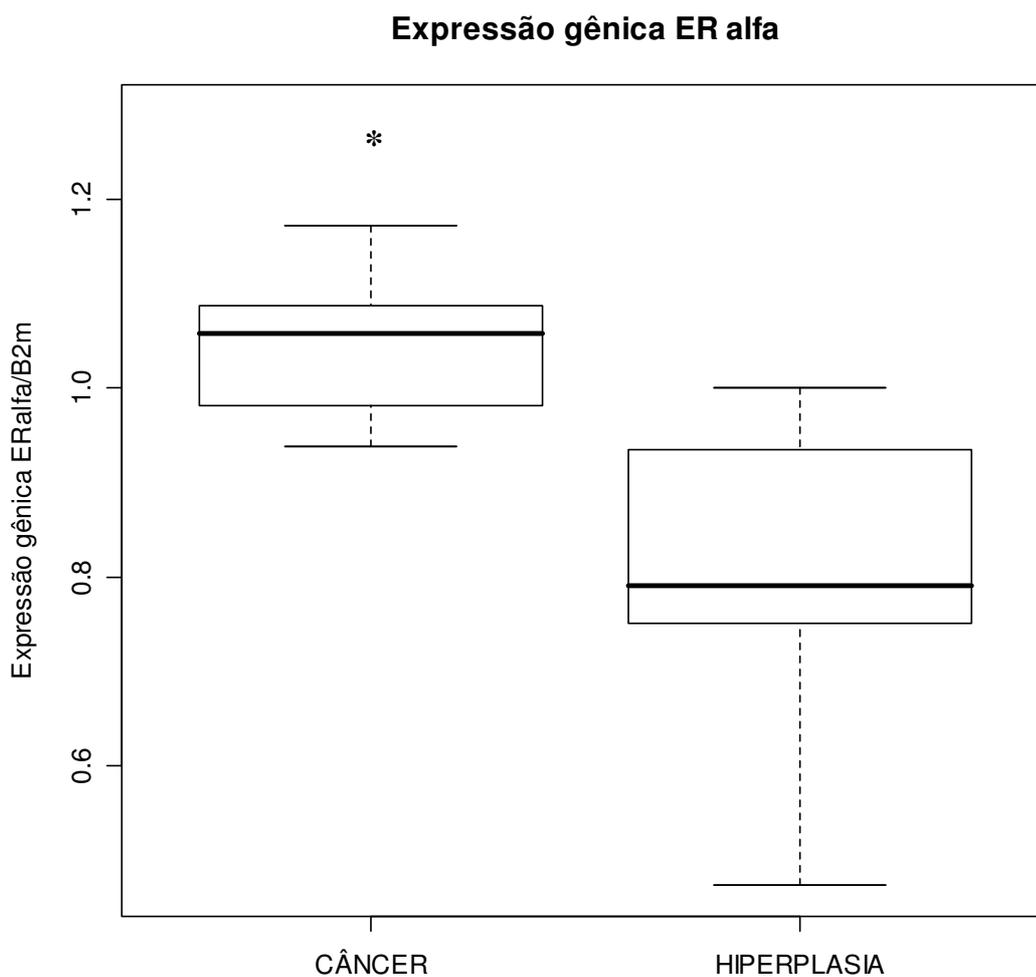
#### **4.2. Expressão gênica do Receptor de Estrogênio $\alpha$ (ER $\alpha$ )**

A expressão de mRNA do receptor de estrogênio ER $\alpha$  foi comparada entre as amostras de câncer de próstata com as amostras de hiperplasia prostática benigna. O mRNA foi avaliado por RT-PCR e normalizado pela  $\beta$ 2 microglobulina, conforme ilustrado de forma representativa na Figura 10 (n=25).

A imagem do gel de agarose contendo o produto da PCR amplificado com oligonucleotídeos específicos para ER $\alpha$  mostra uma maior expressão do gene ER $\alpha$  nas amostras de câncer de próstata com mediana 1,05 (0,96-1,10) quando comparado com o tecido hiperplásico benigno de próstata com mediana 0,79 (0,71-0,94). A análise semi-quantitativa desta imagem feita por densitometria foi representada graficamente como mediana e intervalo interquartil dos níveis de ER $\alpha$  corrigidos pelos níveis de  $\beta$ <sub>2</sub>m.



**B**



**FIGURA 10.** Expressão gênica do ER $\alpha$  em amostras de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata **(A)** Gel de agarose representativo das amostras: o fragmento de 483 pb corresponde ao mRNA do ER $\alpha$  e o de 165 pb ao da  $\beta_2$ m. M: marcador de peso molecular (pb), H: Hiperplasia prostática benigna; C: câncer de próstata. **(B)** O gráfico representa a quantificação das bandas expressa como relação ER $\alpha$  / $\beta_2$ m (mediana e intervalo interquartil) em unidades arbitrárias. Foi observado um aumento na expressão de ER $\alpha$  (\*) no câncer de próstata quando comparado ao tecido prostático hiperplásico com  $P=0,001$  ( $n=25$ ).

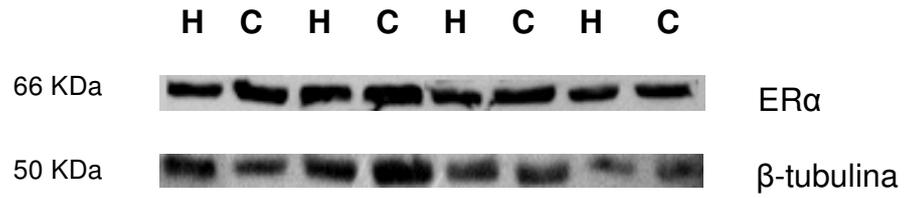
### **4.3. Expressão protéica do receptor de estrogênio $\alpha$ (ER $\alpha$ )**

A Figura 11 ilustra os níveis protéicos da proteína ER $\alpha$  avaliados pela técnica de Western Blot com anticorpo específico para o ER $\alpha$ .

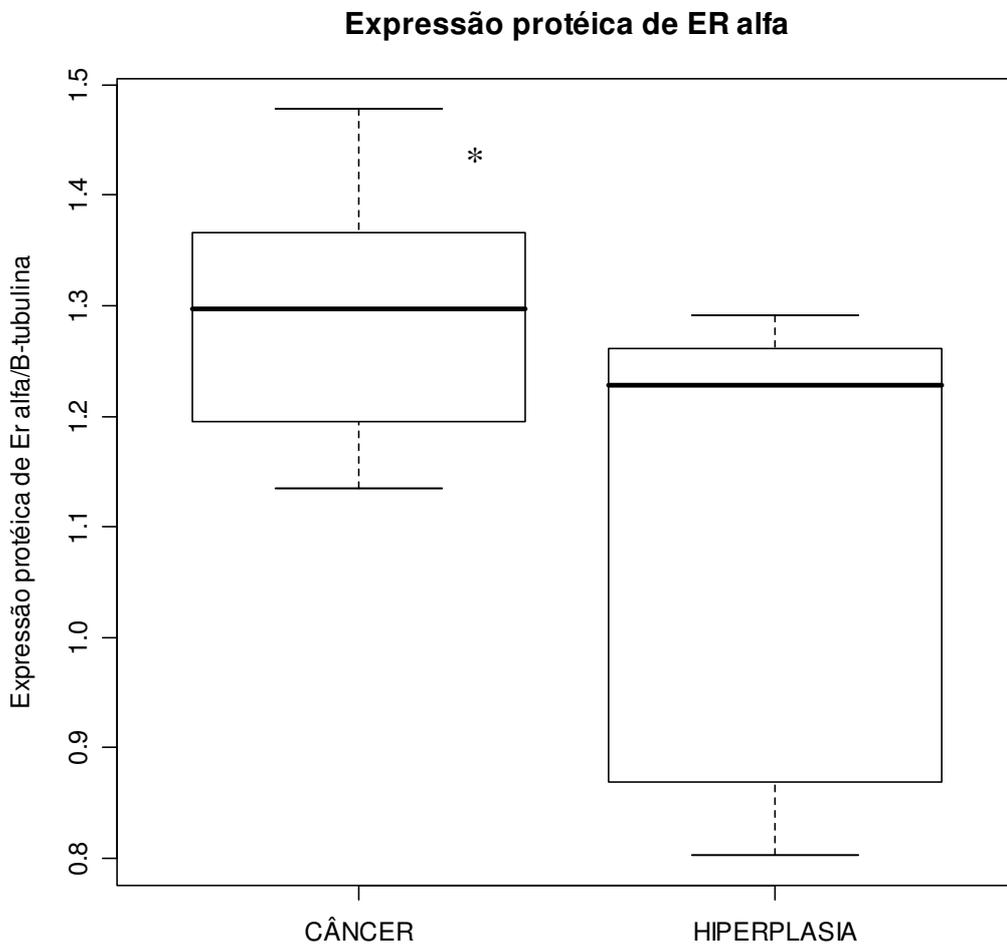
A imagem da auto-radiografia mostra uma maior expressão da proteína ER $\alpha$  nas amostras de câncer de próstata com mediana 1,29 (1,18-1,38) quando comparadas com o tecido de hiperplasia prostática benigna com mediana 1,22 (0,85-1,27).

Os dados foram obtidos através da análise densitométrica semi-quantitativa das bandas e representados graficamente como mediana e intervalo interquartil dos níveis protéicos de ER $\alpha$  corrigidos por uma banda de  $\beta$ -tubulina.

**A**



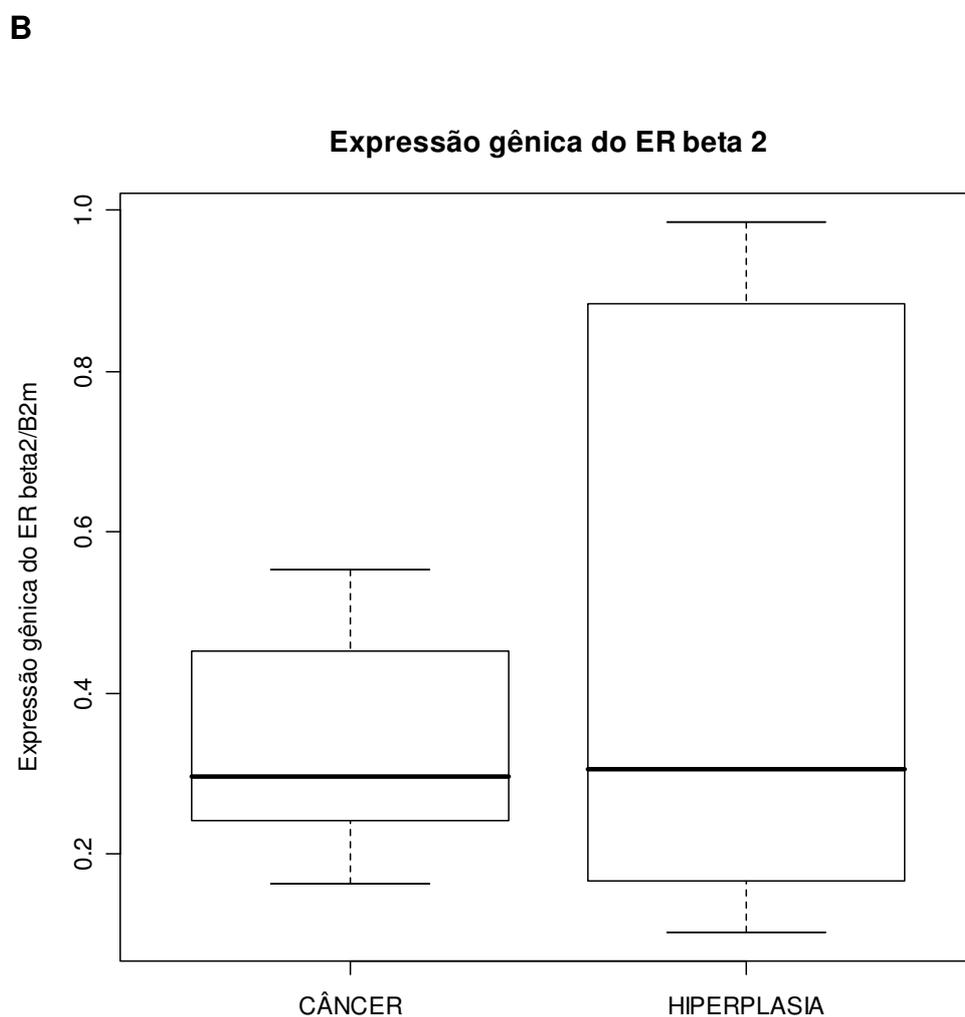
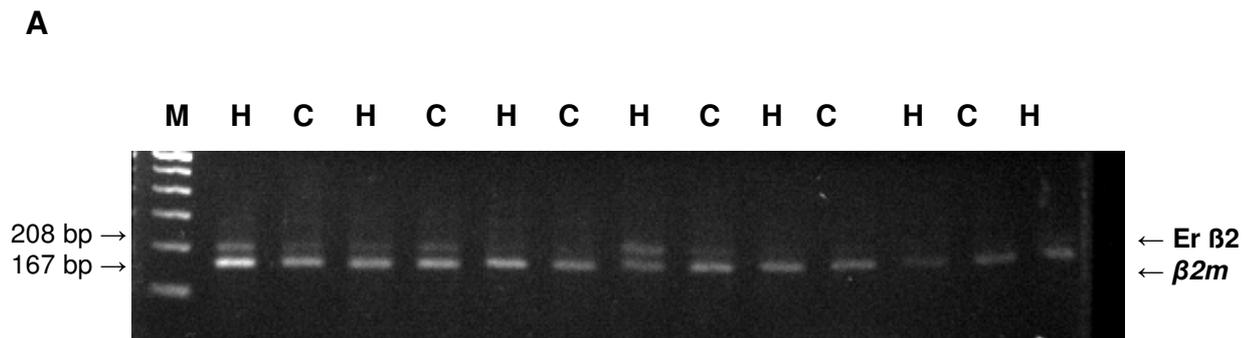
**B**



**FIGURA 11.** Análise dos níveis protéicos de ER $\alpha$  das amostras de hiperplasia prostática benigna comparadas com as amostras de câncer de próstata. **(A)** Representação das bandas do ER $\alpha$  em 66 KDa e da  $\beta$ -tubulina em 50 KDa; onde H = hiperplasia e C= câncer **(B)** O gráfico representa a análise densitométrica das bandas e é expresso como a relação ER $\alpha$  / $\beta$ -tubulina mostrando uma maior expressão protéica de ER $\alpha$  no câncer com  $P=0,038$  (n=8).

#### **4.4. Expressão gênica do Receptor de Estrogênio $\beta_2$ (ER $\beta_2$ )**

A análise densitométrica da imagem do gel de agarose contendo o produto da PCR amplificado com oligonucleotídeos específicos para ER $\beta_2$  não mostrou diferença significativa entre a expressão do gene ER $\beta_2$  nas amostras de hiperplasia prostática benigna com mediana 0,30 (0,16-0,88) quando comparadas com o tecido de câncer de próstata com mediana 0,29 (0,23-0,46). A análise semi-quantitativa desta imagem feita por densitometria foi representada graficamente como mediana e intervalo interquartil dos níveis de E $\beta_2$  corrigidos pelos níveis de  $\beta_2m$ . Estes dados estão apresentados na Figura 12.

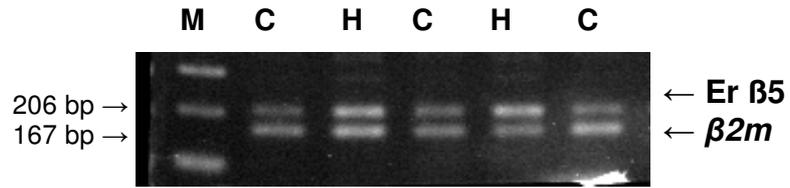


**Figura 12.** Expressão gênica do ERβ 2 em amostras de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Em **A** temos a representação do gel de agarose mostrando os produtos amplificados de ER BETA 2 e β<sub>2</sub>m. Em **B**, os dados da análise densitométrica são expressos como mediana e intervalo interquartil para n= 25 para cada grupo. P =0,8

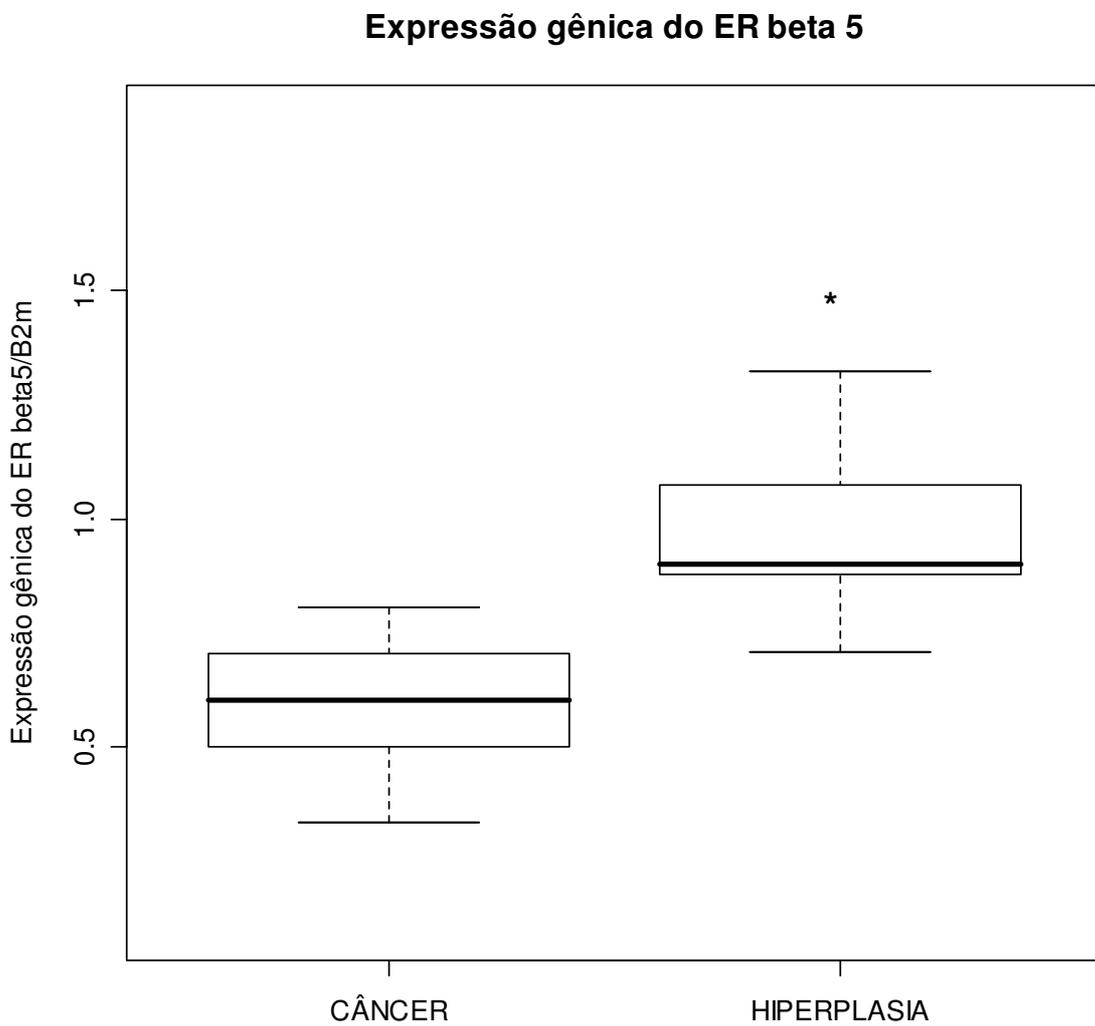
#### **4.5. Expressão gênica do Receptor de Estrogênio $\beta$ 5 (ER $\beta$ 5)**

A análise densitométrica da imagem do gel de agarose contendo o produto da PCR amplificado com oligonucleotídeos específicos para ER $\beta$ 5 mostra uma maior expressão do gene ER $\beta$ 5 nas amostras de hiperplasia prostática benigna com mediana 0,90 (0,83-1,07) quando comparadas com o tecido de câncer de próstata com mediana 0,60 (0,49-0,71). A análise semi-quantitativa desta imagem foi representada graficamente como mediana e intervalo interquartil dos níveis de E $\beta$ 5 corrigidos pelos níveis de  $\beta$ <sub>2</sub>m.

**A**



**B**



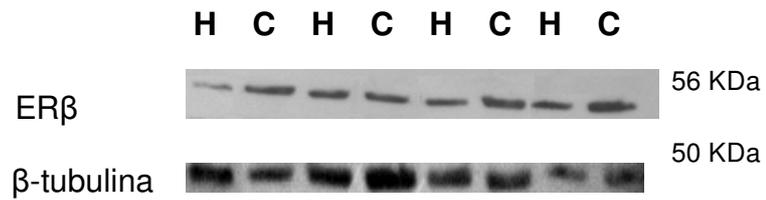
**Figura 13.** Expressão gênica do ER BETA 5 em amostras de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. Em **A**, gel representativo mostrando os produtos amplificados de ER BETA 5 e  $\beta_2$ microglobulina. Em **B**, os dados obtidos por densitometria são expressos em média  $\pm$  erro padrão para  $n= 25$  para cada grupo. \* representa diferença significativa em relação ao grupo hiperplasia com  $P= 0,001$ .

#### **4.6. Expressão protéica do receptor de estrogênio $\beta$ (ER $\beta$ )**

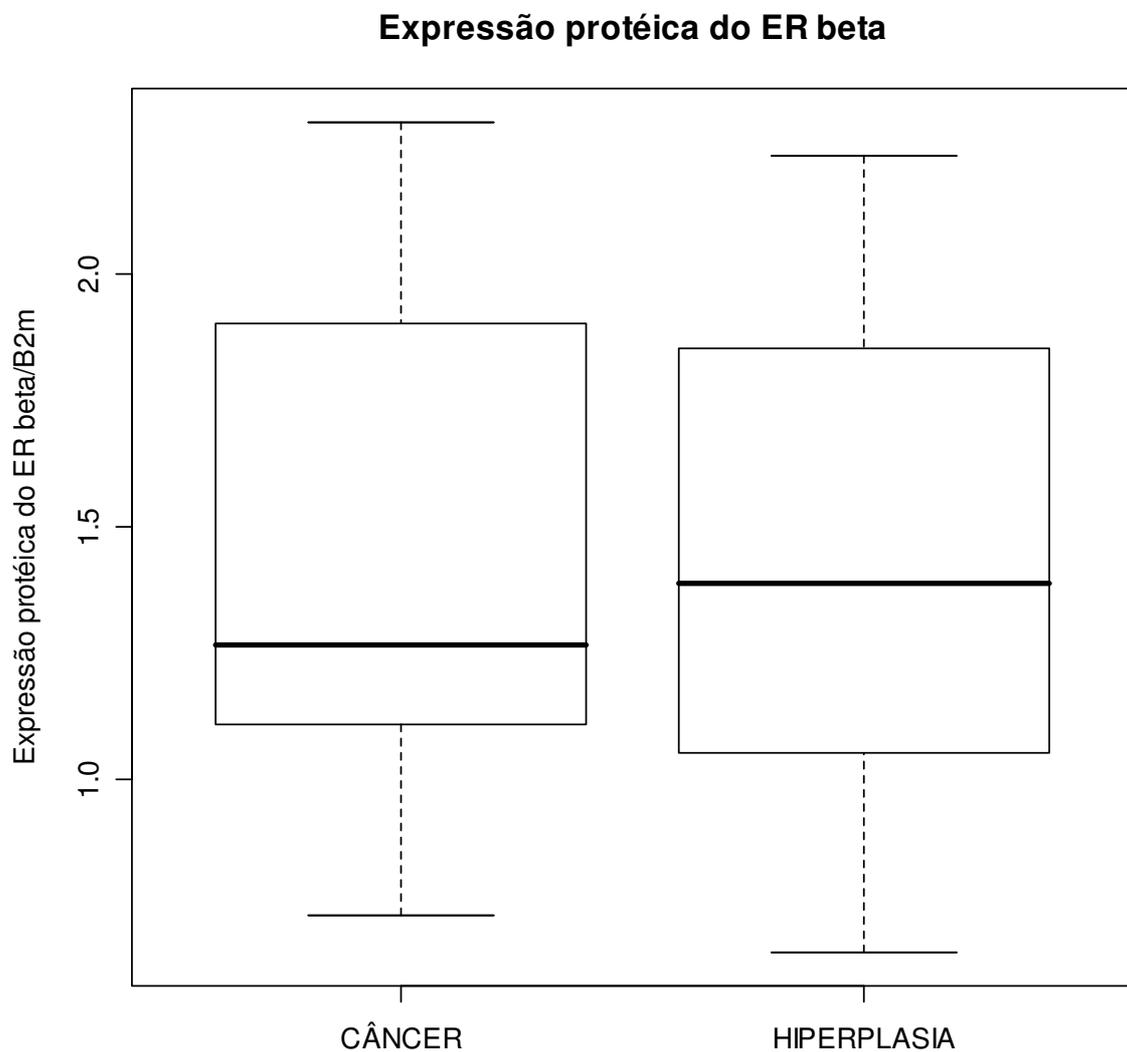
A Figura 14 ilustra os níveis protéicos da proteína ER $\beta$  avaliados pela técnica de Western Blot com um anticorpo policlonal contra os aminoácidos 1-150 do ER $\beta$  humano. O anticorpo anti ER $\beta$  de coelho 56 kDa (Santa Cruz Biotechnology – ER $\beta$  H-150) foi utilizado para analisar a expressão protéica de todas as isoformas do ER $\beta$  em conjunto, uma vez que não foram encontrados anticorpos específicos para cada isoforma. Esse anticorpo liga aos aminoácidos 1-150 do receptor de estrogênio  $\beta$ , região comum a todas as isoformas do ER $\beta$ .

A análise da imagem da autorradiografia, após a incubação das membranas com solução para quimioluminescência não mostrou diferença significativa da expressão da proteína ER $\beta$  nas amostras de câncer de próstata com mediana 1,26 (1,06-2,08) quando comparado com o tecido de hiperplasia prostática benigna com mediana 1,38 (1,02-1,86). Os dados foram obtidos através da análise densitométrica semi-quantitativa das bandas e representados graficamente como mediana e intervalo interquartil dos níveis protéicos de ER $\beta$  corrigidos por uma banda de  $\beta$ -tubulina.

**A**



**B**

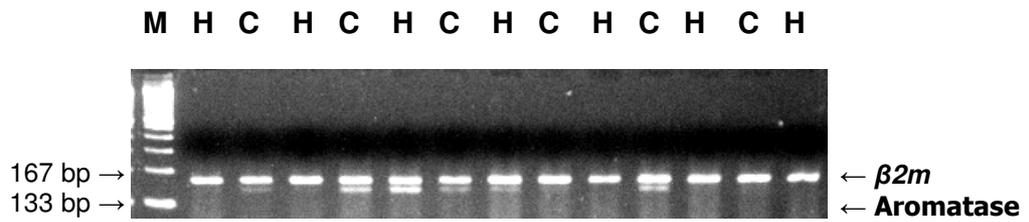


**Figura 14.** Análise dos níveis protéicos de ERβ das amostras de hiperplasia prostática benigna comparadas com as amostras de câncer de próstata. **(A)** Representação das bandas do ERβ em 56 KDa e da β- tubulina em 50 KDa; onde H = hiperplasia e C= câncer **(B)** O gráfico representa a análise densitométrica das bandas e é expresso como a relação ERβ /β-tubulina, demonstrando nenhuma diferença significativa entre os grupos.  $P=0,5$

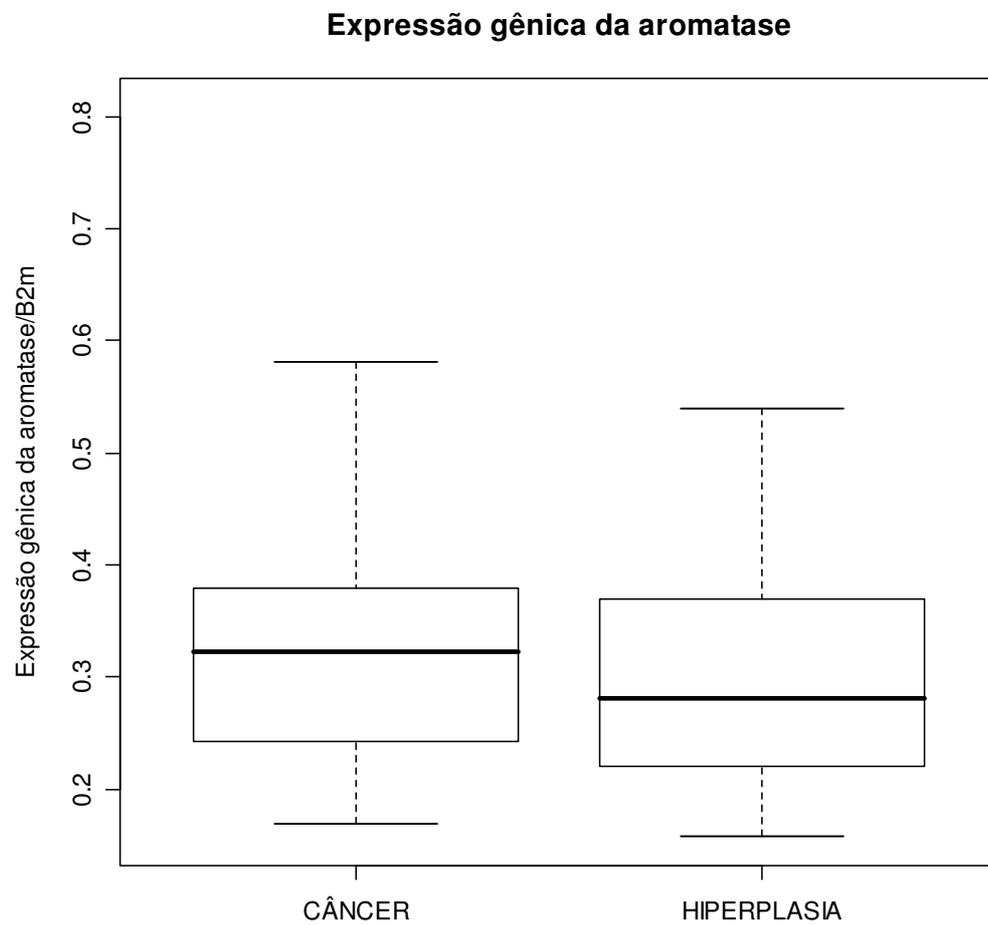
#### **4.7. Expressão gênica da aromatase**

A Figura 15 mostra a imagem do gel de agarose contendo o produto da PCR amplificado com oligonucleotídeos específicos para a aromatase. A expressão gênica da aromatase não mostra diferença significativa entre as amostras de hiperplasia prostática benigna com mediana 0,28 (0,21-0,37) quando comparado com o tecido de câncer de próstata com mediana 0,32 (0,24-0,42). Os dados são representados graficamente como mediana e intervalo interquartil dos níveis de aromatase corrigidos pelos níveis de  $\beta_2m$ .

**A**



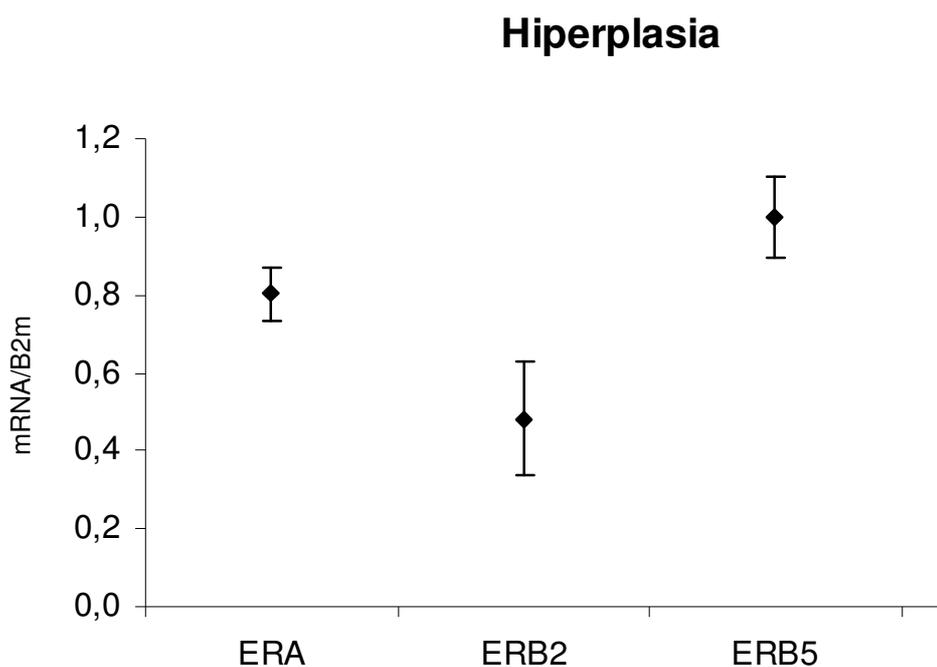
**B**



**Figura 15.** Razão da expressão gênica da aromatase em relação à  $\beta_2$ microglobulina. Em A, gel representativo mostrando os produtos amplificados da aromatase e  $\beta_2$ micro. Em B, os dados obtidos por densitometria são expressos como mediana e intervalo interquartil para  $n= 25$  para cada grupo demonstrando não existir diferença significativa para  $P =0,8$ .

#### 4.8. Comparação da expressão gênica dos receptores de estrogênio na hiperplasia prostática benigna

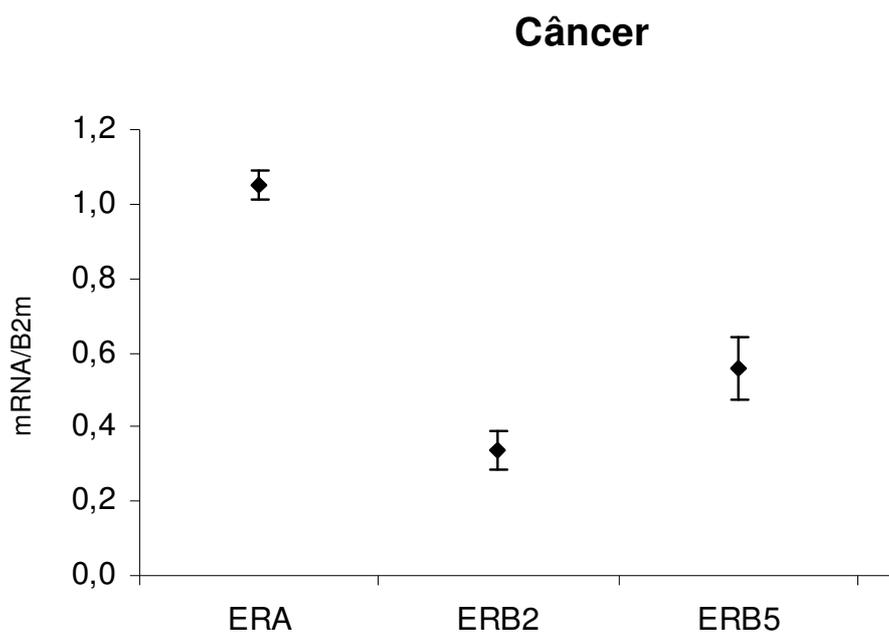
Analisando a expressão gênica dos receptores de estrogênio ER $\alpha$ , ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5 nos pacientes com hiperplasia prostática benigna, observamos uma maior expressão gênica do ER $\beta$ 5 em relação aos outros dois receptores estudados. Além disso, o receptor ER $\alpha$  mostrou ter sua expressão aumentada em relação ao ER $\beta$ 2 nesse grupo.



**Figura 16.** Comparação da expressão gênica dos receptores de estrogênio nos pacientes com hiperplasia prostática benigna. Os dados obtidos são expressos como média e intervalo de confiança (ER $\beta$ 5 > ER $\alpha$  > ER $\beta$ 2).

#### 4.9. Comparação da expressão gênica dos receptores de estrogênio no câncer de próstata

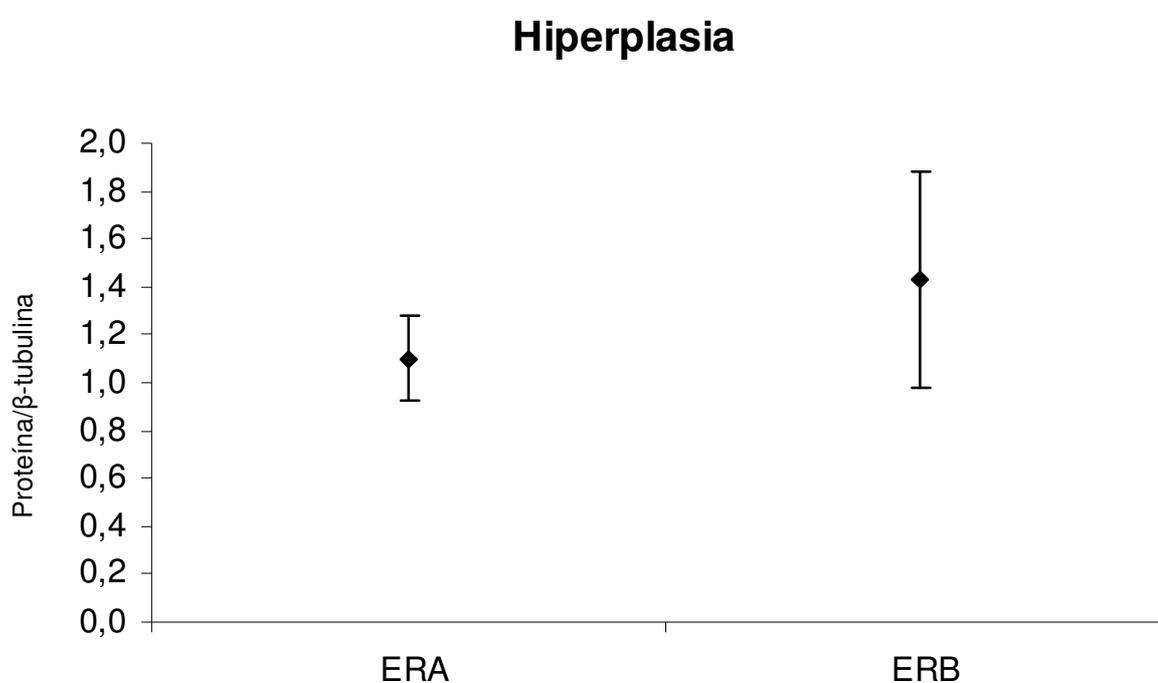
Observando a expressão gênica dos receptores de estrogênio ER $\alpha$ , ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5 nos pacientes com câncer de próstata, obtivemos uma maior expressão gênica do receptor ER $\alpha$  em relação as duas isoformas do receptor de estrogênio ER $\beta$ . Analisando os receptores de estrogênio ER $\beta$ , vimos que o receptor ER $\beta$ 5 apresentou expressão aumentada em relação ao ER $\beta$ 2 nos pacientes com câncer de próstata.



**Figura 17.** Comparação da expressão gênica dos receptores de estrogênio nos pacientes com câncer de próstata. Os dados obtidos são expressos como média e intervalo de confiança (ER $\alpha$  >ER $\beta$ 5 > ER $\beta$ 2).

#### 4.10. Comparação da expressão protéica dos receptores de estrogênio na hiperplasia prostática benigna

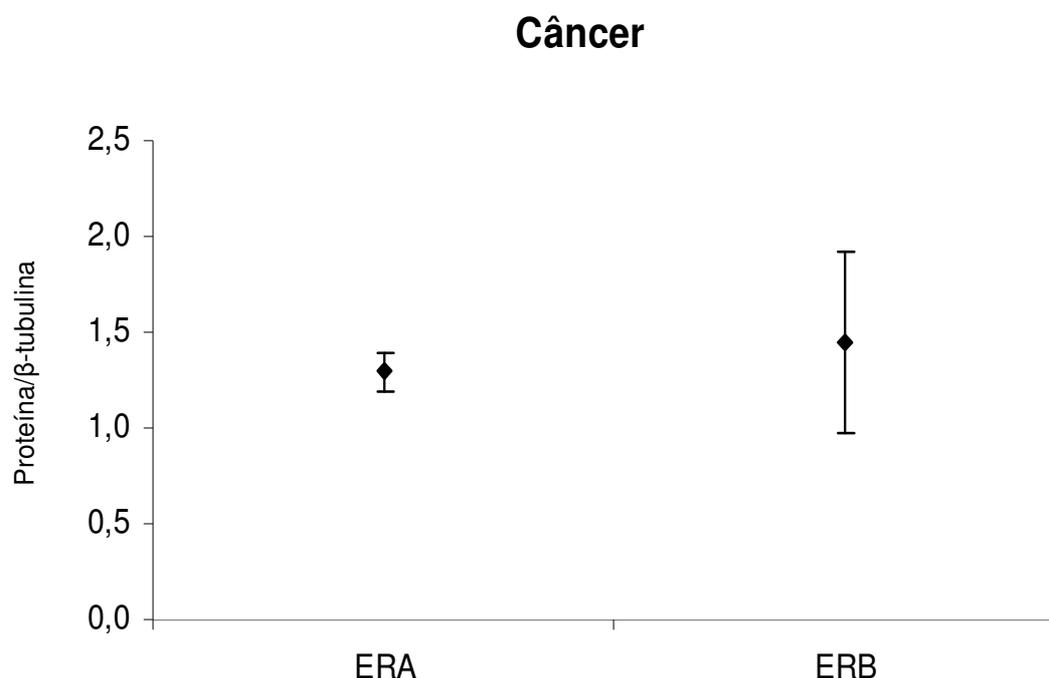
Analisando a expressão protéica dos receptores de estrogênio ER $\alpha$  e ER $\beta$  nos pacientes com hiperplasia prostática benigna não observamos diferença na expressão protéica do receptor ER $\beta$  em relação ao ER $\alpha$ .



**Figura 18.** Comparação da expressão protéica dos receptores de estrogênio nos pacientes com hiperplasia prostática benigna. Os dados obtidos são expressos como média e intervalo de confiança.

#### 4.11. Comparação da expressão protéica dos receptores de estrogênio no câncer de próstata

Observando a expressão protéica dos receptores de estrogênio ER $\alpha$  e ER $\beta$  nos pacientes com câncer de próstata não obtivemos diferença na sua expressão.



**Figura 19.** Comparação da expressão protéica dos receptores de estrogênio nos pacientes com câncer de próstata. Os dados obtidos são expressos como média e intervalo de confiança.

## 5. DISCUSSÃO

Os androgênios são fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento e a progressão da hiperplasia prostática benigna (HPB) e do câncer de próstata (CaP). Apesar disso, os androgênios sozinhos não são suficientes para induzir doenças prostáticas e por isso aumentam as evidências da participação dos estrogênios nesse processo.

A incidência do câncer de próstata aumenta com a idade e é dependente da ação dos androgênios. Entretanto, o desenvolvimento do CaP comumente ocorre na idade em que os níveis séricos e testiculares de testosterona estão em declínio. Em contraste, os níveis de estradiol permanecem inalterados ou se elevam com o aumento da idade masculina. Esses níveis são mantidos através da aromatização dos androgênios adrenais dentro do tecido adiposo periférico que tendem a aumentar em homens idosos e através da síntese de estrogênios na própria glândula prostática pela enzima aromatase (CARRUBA, 2007).

A hipótese de que os esteróides séricos, particularmente altos níveis de testosterona e/ou estradiol são associados com o risco para hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata, tem sido estudada por vários anos. Kristal e colaboradores observaram níveis séricos de estradiol menores e de testosterona maiores em pacientes com HPB em relação a pacientes normais. Quanto à razão estradiol/testosterona não observaram diferença significativa entre os grupos (KRISTAL *et al.*, 2008). Por outro lado, Gann e colaboradores, reportaram uma associação positiva entre o estradiol e a incidência de HPB apenas em homens com baixos níveis de testosterona (GANN *et al.*, 1995).

Neste estudo, os níveis séricos de testosterona e estradiol foram avaliados e se mostraram semelhantes entre os grupos HPB e câncer. Rannikko & Adlercreutz, por outro lado, observaram uma diminuição dos níveis de estradiol em pacientes com CaP em relação aos normais e aos com HPB. Além disso, a razão estradiol/testosterona foi maior no grupo HPB em relação aos outros grupos (RANNIKKO & ADLERCREUTZ, 1983). Nosso trabalho vem ao encontro desse estudo no que diz respeito à razão entre os hormônios, mostrando um aumento dessa relação no nosso grupo HPB em relação ao CaP. Porém esses resultados são controversos, já que evidências epidemiológicas indicam a associação da mudança na relação estradiol/testosterona e o desenvolvimento de câncer de próstata. Essa razão é significativamente maior em homens afro-americanos (que possuem alta incidência de CaP nos EUA) comparados aos americanos caucasianos (HILL *et al.*, 1984; ROSS *et al.*, 1986). Contrariamente, essa relação está diminuída em japoneses que possuem um menor risco de desenvolvimento de câncer de próstata devido aos baixos níveis de estrogênio sérico em relação a holandeses caucasianos (JONG *et al.*, 1991). Devido à grande diversidade étnica brasileira estudo semelhante não é possível. Porém, pelos nossos resultados, podemos supor que o aumento da relação estradiol/testosterona no grupo HPB não se deve ao aumento dos níveis de estradiol nesse grupo e sim por seus níveis de testosterona relativamente menores em relação ao grupo CaP .

É amplamente reconhecido que muitos efeitos clássicos dos hormônios esteróides sexuais são mediados através de receptores específicos intracelulares que pertencem à superfamília dos receptores nucleares. Além disso, há um acúmulo de evidências de que os esteróides, especificamente os estrogênios, e seus receptores podem combinar-se ou agir independentemente, para exercer uma ampla

variedade de ações genômicas e não-genômicas, tanto dependente de ligante quanto independente. Ambos os receptores de estrogênio, tanto o  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) quanto o  $\beta$  (ER $\beta$ ), agem como fatores de transcrição nuclear, mas seus respectivos padrões de regulação gênica e função são diretamente dependentes do tecido em que o receptor é expresso. Na próstata, eles diferem quanto a sua localização, ação proliferativa e de diferenciação e por isso suas expressões no CaP têm sido controversas.

No nosso estudo confirmamos a presença tanto da expressão gênica quanto protéica do receptor de estrogênio ER $\alpha$  nos grupos CaP e HPB. Anteriormente havia sido descrito apenas o receptor de estrogênio ER $\alpha$  no estroma prostático e sugerido que o crescimento do estroma prostático, na HPB, não era mediado via ER $\alpha$  (SCHULSE & CLAUS, 1990). O ER $\alpha$  teve sua expressão gênica e protéica maior no grupo com câncer de próstata em relação ao grupo com hiperplasia prostática benigna. O aumento da expressão gênica de ER $\alpha$  em carcinoma de próstata já havia sido relatado na literatura, quando comparado à hiperplasia ou tecido prostático normal (ITO *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2007), no entanto, esses estudos não avaliaram a expressão protéica. Por outro lado, Pasquali e colaboradores, ao avaliarem amostras de cultura de células de câncer de próstata obtiveram uma alta expressão do ER $\alpha$  porém, essa expressão foi menor quando comparada à próstata normal. Já seus resultados da análise protéica desse receptor no câncer, mostraram expressão bastante diminuída, até mesmo com amostras mostrando ausência desse receptor em relação à próstata normal (PASQUALI *et al.*, 2001). Apesar de várias evidências relacionando esse receptor com proliferação celular e câncer em vários tecidos, o seu papel no câncer e na hiperplasia de próstata benigna ainda não está

bem estabelecido. Conforme os dados da literatura citados acima, os resultados ainda são conflitantes.

O balanço entre os receptores de estrogênio ER $\alpha$  e ER $\beta$  é considerado de fundamental importância uma vez que estudos apontam o envolvimento dos estrogênios e seus receptores no desenvolvimento de muitos tipos de tumores malignos (MATTHEWS & GUSTAFSSON, 2003) Quando os ERs são co-expressos, o ER $\beta$  exibe uma ação inibitória sobre a expressão gênica mediada pelo ER $\alpha$  (PAECH *et al.*, 1997). Por esse motivo, é necessário o estudo em conjunto do ER $\beta$ , mais especificamente, das isoformas ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5 que possuem maior expressão em tecido prostático, conforme estudo de Moore e colaboradores (MOORE *et al.*, 1998).

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar a presença da expressão gênica das isoformas do receptor de estrogênio ER $\beta$  2 e ER $\beta$ 5 tanto nas amostras de próstata com câncer quanto nas amostras de pacientes com hiperplasia benigna. Esse resultado é novo, já que a avaliação da expressão gênica por PCR das isoformas do receptor de estrogênio ER $\beta$  em próstata foram estudadas apenas de forma qualitativa em tecido prostático normal e em linhagens de células cancerosas LNCap e PC3 ( MOORE *et al.*, 1998).

Além disso, observamos uma diferença significativa na expressão gênica do receptor de estrogênio ER $\beta$ 5 no grupo com hiperplasia prostática benigna em relação ao grupo com CaP. Na avaliação da expressão gênica do receptor ER $\beta$ 2 não observamos diferença significativa entre os grupos.

Os níveis protéicos do ER $\beta$  foram avaliados com um anticorpo policlonal que liga aos aminoácidos 1-150 do receptor de estrogênio  $\beta$ , região comum a todas as isoformas do ER $\beta$ . A escolha desse anticorpo foi importante devido ao fato de que

não existem anticorpos específicos para as diferentes isoformas. Na avaliação da expressão protéica do receptor de estrogênio ER $\beta$  entre os grupos câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna não observamos diferença significativa, sugerindo o envolvimento de fatores pós-transcricionais na regulação desse gene, ou a impossibilidade técnica de discriminar suas isoformas através de anticorpo específico.

Existem alguns estudos com próstata em que foi avaliada a expressão gênica do receptor de estrogênio ER $\beta$  de forma total. Pasquali e colaboradores demonstraram maior expressão gênica e protéica do ER $\beta$  em cultura de células de tecido prostático normal em relação à cultura de células de câncer de próstata (PASQUALI *et al.*, 2001). Já Horvath e colaboradores, por imunohistoquímica, mostraram que a imunorreatividade do ER $\beta$  na próstata com câncer é menor em comparação à próstata hiperplásica e este é menor em relação à próstata normal (HORVATH *et al.*, 2001). Mais recentemente, através das técnicas de PCR e Western blot, foi observado em culturas primárias de hiperplasia prostática benigna maior expressão do ER $\beta$  em relação ao ER $\alpha$  comparadas ao controle positivo MCF-7 que expressa ambos receptores (HO *et al.*, 2008).

A única isoforma do receptor ER $\beta$  estudada até então de forma quantitativa na próstata é a ER $\beta$ 2. Nesse estudo de Fujimura e colaboradores feito em amostras de tecido prostático por imunohistoquímica, houve menor expressão desta isoforma no CaP em relação à próstata normal (FUJIMURA *et al.*, 2001).

A análise da expressão das isoformas do receptor de estrogênio ER $\beta$  já está sendo muito estudada em outros tipos de tumores. Pesquisa com endométrio normal e com câncer demonstrou a presença por PCR de ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5 em ambos tecidos, porém apenas o ER $\beta$ 5 teve um aumento significativo na sua expressão gênica no

câncer de endométrio em relação ao tecido normal (SKRYPCZAK *et al.*, 2004). Leygue e colaboradores observaram na mama normal e com câncer a presença da expressão de ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5, estando esses receptores aumentados no tumor em relação à mama normal (LEYGUE *et al.*, 1999). Já Davies e colaboradores demonstraram que a expressão do ER $\beta$ 2 aumentada no câncer de mama está associada com o grau do tumor, tendo maior expressão nos graus I e III (DAVIES *et al.*, 2004). No câncer de cólon, onde foi observada a expressão do ER $\beta$ 2 e do ER $\beta$ 5, ocorre uma diminuição do ER $\beta$ 2 no câncer quando comparado ao cólon normal (CAMPBELL-THOMPSON *et al.*, 2001).

Devido ao fato de que pouco se sabe sobre a expressão gênica do ER $\beta$ 2 e do ER $\beta$ 5 em amostras de câncer e hiperplasia de próstata, nós podemos sugerir, com base em nossos resultados, que o aumento da expressão gênica do ER $\beta$ 5 na HPB parece exercer um papel importante nesta doença. Sobretudo se analisarmos esse dado junto com o resultado da expressão gênica do ER $\alpha$  que está diminuída na HPB. Estudos de Poola e colaboradores, em ovário, mostraram que o ER $\beta$ 5 possui preferência na heterodimerização com o ER $\alpha$ , resultando em alteração na atividade transcricional de ambos receptores (POOLA *et al.*, 2005). A heterodimerização ER $\alpha$ /ER $\beta$ 5 na HPB pode explicar o fato de termos menor expressão protéica de ER $\alpha$  nesse grupo quando comparado com o grupo câncer de próstata. Para reforçar essa idéia, comparando as expressões gênicas das isoformas dos receptores de estrogênio ER $\alpha$ , ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5 no grupo HPB, observamos a seguinte disposição: ER $\beta$ 5 > ER $\alpha$  > ER $\beta$ 2.

Já no câncer de próstata a comparação destes receptores neste grupo mostrou-se bastante diferente mostrando: ER $\alpha$  > ER $\beta$ 5 > ER $\beta$ 2. Neste grupo, tivemos

uma maior expressão gênica do ER $\alpha$  em relação às outras isoformas e isso também se refletiu na expressão protéica.

Esses achados parecem ser de grande importância para o entendimento das doenças prostáticas porque mostram perfis diferentes na expressão gênica desses receptores no câncer de próstata e na hiperplasia prostática benigna. As funções bem estabelecidas de pró-proliferação para o ER $\alpha$  e de anti-proliferação para o ER $\beta$  (e suas isoformas) e o balanço entre a expressão gênica desses receptores no tecido prostático parece ser fundamental para determinar se o crescimento prostático será benigno ou maligno.

A importância da expressão gênica se torna ainda mais relevante quando relacionamos a expressão protéica dos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  nos grupos. Para os pacientes com câncer de próstata não obtivemos diferença na expressão protéica dos receptores sendo ER $\alpha$ =ER $\beta$ . O mesmo resultado foi obtido na análise dessas proteínas no grupo hiperplasia prostática benigna. Esses dados parecem conflitantes já que aparentemente parece existir um equilíbrio entre a expressão protéica dos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  em ambos os grupos. Uma explicação provável para esse resultado é que ambos os receptores existem na forma de *splicings* alternativos de pré-mRNA resultando em variados efeitos fisiológicos para a mesma proteína. Os *splicings* alternativos resultantes podem falhar na ligação ao ligante (estrogênios), falhar na translocação para o núcleo, falhar na heterodimerização ou falhar na ligação e no estímulo dos locais de transcrição do ERE ou AP1. Se um *splicing* alternativo falhar em todas essas ações é provável que ele não tenha qualquer efeito sobre o funcionamento celular. Entretanto, se a falha acontecer em uma ou duas dessas funções, poderá ocorrer uma inibição do receptor original por competição pelo ligante ou ele pode formar dímeros com o receptor funcionando tornando-o

inativo ou ligar-se ao DNA sem fazer a transcrição. Efeitos estimulatórios também podem ocorrer quando um *splicing* alternativo adota uma conformação ativa permanente. Devido ao alterado recrutamento de co-fatores e a diferente habilidade de interagir com ERE e locais AP1, eles podem potencializar a transcrição em locais não normais no receptor original. Alternativamente, eles podem agir nos locais similares ao original, mas com um elevado efeito transcricional (TAYLOR *et al.*, 2010).

No nosso estudo a análise da expressão gênica da enzima aromatase não mostrou diferença significativa entre os grupos HPB e CaP. Apesar de extensos estudos relacionando a expressão anormal da aromatase com neoplasias dependentes de estrogênio existem poucos estudos sobre a sua expressão no câncer de próstata principalmente com amostras de tecido prostático. Ellem e colaboradores observaram em culturas primárias de CaP uma maior expressão gênica da aromatase no CaP em relação à cultura de linhagens de células com CaP e HPB (ELLEN *et al.*, 2004). Já Wu e colaboradores trabalharam com cultura de linhagens de células de HPB e CaP, nesse estudo eles observaram aumento da expressão gênica dessa enzima no grupo HPB em relação ao CaP (WU *et al.*, 2007). Nosso trabalho parece demonstrar que a ação estrogênica nas doenças prostáticas não se deve a variações nas expressões da enzima aromatase, que disponibilizaria maior quantidade de hormônio para atuar nos receptores. Mas sim, a diferença na expressão gênica dos receptores de estrogênio entre os grupos e na expressão protéica do ER $\alpha$ .

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram uma maior expressão gênica e protéica do receptor de estrogênio ER $\alpha$  em pacientes com câncer de próstata quando comparados com pacientes com hiperplasia prostática benigna, indicando uma possível participação deste gene no crescimento prostático maligno.

Em relação ao receptor de estrogênio ER $\beta$ , a expressão gênica do ER $\beta$ 5 foi maior na hiperplasia prostática benigna em relação ao CaP sugerindo um papel determinante deste gene na hiperplasia prostática benigna. O ER $\beta$ 2 não apresentou diferença significativa entre os grupos.

A expressão protéica do ER $\beta$  não apresentou diferença significativa entre os grupos. Estes resultados sugerem que fatores pós-transcricionais podem estar envolvidos na regulação do ER $\beta$ .

A expressão gênica da enzima aromatase não mostrou diferença significativa entre os grupos hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Cancer Society, 2009. Disponível na internet no endereço [www.cancer.org/downloads/stt/CFF2009\\_EstCD\\_3.pdf](http://www.cancer.org/downloads/stt/CFF2009_EstCD_3.pdf).
2. American Urological Association 2010. Disponível na Internet no endereço [http://www.urologyhealth.org/search\\_index.cfm?topic=173 & search = benign,prostatic,hyperplasia,epidemiology & searchtype=or](http://www.urologyhealth.org/search_index.cfm?topic=173&search=benign,prostatic,hyperplasia,epidemiology&searchtype=or)
3. BARDIN A; BOULLE N; LAZENNEC G *et al.* Loss of Er $\beta$  expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. **Endoc-Rel Cancer**. 2004. 11:537-551.
4. BARRY M. J.; ROEHRBORN C. G. Benign prostatic hyperplasia. **Bri Mol J** 2001 Nov; 323: 1042-1046.
5. BAUMAN D. R; STECKELBROECK S; PEEHL D. M; PENNING T.M. Transcript profiling of the androgen signal in normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer. **Endocrinol** 2006 Dec; 147 (12): 5806-5816.
6. BENNETT C. L; PRICE D. K; KIM S *et al.* Racial variation in CAG repeat lengths within the androgen receptor gene among prostate cancer patients of lower socioeconomic status. **J Clin Oncol**. 2002; 20:3599-3604.
7. BERGNER C. C; KRAUSE F. S; ZUGOR V *et al.* Polymorphisms of human estrogen receptor (ER) gene alpha and beta in prostate cancer PC-EW and PC-OR cell lines. **Anticancer Res** 2007 Jul-Aug; 27(4A):2071-2074.
8. BONKHOFF H, FIXEMER T. Implications of estrogens and their receptors for the development and progression of prostate cancer. **Pathologe** 2005 Nov; 26(6):461-468.
9. BONKHOFF H, FIXEMER T, HUNSICKER I, REMBERGER K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. **Am J Path** 1999;155 (2):641-647.
10. BOSLAND M. C. Sex steroids and prostate carcinogenesis: integrated, multifactorial working hypothesis. **Ann N Y Acad Sci** 2006 Nov; 1089:168-176.
11. BOYLE P, SEVERI G, GILES GG. The epidemiology of prostate cancer. **Urol Clin North Am**. 2003 May; 30 (2): 209-217.
12. BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976 May; 7 (72): 248-254.

13. CAMPBELL-THOMPSON M; LYNCH I. J; BHARDWAJ B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER $\beta$  isoforms in colon cancer. **Cancer Res.** 2001. 61:632-640.
14. CARREAU S; LAMBARD S ;DELALANDE C *et al.* Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Repr Biol Endocr** 2003; 35:1-6.
15. CARRUBA G. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. **Ann N Y Acad Sci.** 2006. 1089: 201-217.
16. CARRUBA G. Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. **J Cell Biochem** 2007 Nov; 102 (4):899-911.
17. CERICATTO R; POZZOBON A; MORSH D. M *et al.*, Estrogen receptor-alpha, bcl-2 and c-myc gene expression in adjacent normal breast: association with nodule size, hormone features. **Steroids.** 2005 Mar; 70 (3): 153-160.
18. CHEN G. G; ZENG Q; TSE G. MK. Estrogen and its receptors in cancer. **Med Res Rev** 2008. 28 (6): 954-974.
19. COTRAN R. S; KUMAR V; ROBBINS S.L. **Robbins: Bases Patológicas das Doenças.** 7 ed. RJ:Elsevier, 2005.
20. CURKENDALL SM, JONES JK, DALE G, *et al.* Incidence of medically detected erectile dysfunction and related diseases before and after Viagra™ (sildenafil citrate) (abstr). **Eur Urol** 2000;37(suppl 2):81.
21. DAVIES M. P. A; NEILL P. A; INNES H *et al.* Correlation of mRNA for oestrogen receptor beta splice variants ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2/ER $\beta$ cx and ER $\beta$ 5 with outcome in endocrine-treated breast cancer. **J Mol Endocrinol** 2004. 33:773-782
22. DAWAM D, RAFINDADI AH, KALAYI GD. Benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma in native Africans. **Bri J Uro Int** 2000; 85(9):1074-7.
23. DENIS L; MORTON M.S; GRIFFITHS K. Diet and its preventive role in prostatic disease. **Eur Urol** 1999; 35(5-6):377-387.
24. DEROO B. J; KORACH K. S. Estrogen receptors and human disease. **J Clin Invest**, 2006; 116 (3):561-570.
25. DJAVAN B, REMZI M, ERNE B, MARBERGER M. The pathophysiology of benign prostatic hyperplasia. **Drugs today (Barc).** 2002 Dec; 38 (12):867-876.
26. ELLEN S. J; RISBRIDGER G. P. The dual opposing roles of estrogen in the prostate. **An N Y Acad Sci.** 2009. 1155:174-186.
27. ELLEN S. J; SCHMITT J. F; PEDERSEN J. S *et al.* Local aromatase expression in human prostate is altered im malignancy. **J Clin Endocrinol Metab** 2004. 89:2434-2441.

28. FOWLER K.A; GILL K, KIRMA N *et al.* Overexpression of aromatase leads to development of testicular Leydig cell tumors. **Am J Pathol.** 2000 January; 156(1): 347–353.
29. FOSTER C. S. Pathology of benign prostatic hyperplasia. **Prostate Suppl** 2000; 9:4-14.
30. FUJIMURA T; TAKAHASHI S; URANO T *et al.* Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal truncated splice variant ERbetacx as prognostic predictors in human prostatic cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2001 Dec; 289 (3):692-699.
31. FUJIMURA T; TAKAHASHI S; URANO T *et al.* Increased expression of estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. **Int J Cancer** 2007 Jun;120(11):2325-2330.
32. GANN P. H; HENNEKENS C. H; LONGCOPE C *et al.* A prospective study of plasma hormone levels , nonhormonal factors, and development of benign prostatic hyperplasia. **Prostate.** 1995 Jan; 26 (1):40-49.
33. GRIFFITHS K; DENIS L; TURKES A; MORTON M.S. Phytoestrogens and diseases of the prostate gland. **Baillieres Clin Endocrinol Metab.** 1998; 12(4):625-47.
34. GRÖNBERG H. Prostate cancer epidemiology. **Lancet.** Mar 2003; 361 (9360):859-864.
35. HANKEY B. F; FEUER E. J; CLEGG L. X *et al.* Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer - part 1: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1017.
36. HELDRING N; PIKE A; ANDERSSON S *et al.* Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiol Rev** 2007 July; 87:905-931.
37. HESS R. A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Repr Biol Endoc** 2003; 52:1-14.
38. HILL P; GARBACZEWSKI L; WALKER A. R. Age, environmental factors and prostatic cancer. **Med Hypotheses** 1984; 14 (1):29-39.
39. HO C. K. M; NANDA J; CHAPMAN K. E *et al.* Oestrogen and benign prostatic hyperplasia: effects on stromal cell proliferation and local formation from androgen. **J Endocrinol** 2008. 197:483-491.
40. HO S. M; LEUNG Y. K; CHUNG I. Estrogens and antiestrogens as etiological factors and therapeutics for prostate cancer. **Ann N Y Acad Sci** 2006 Nov; 1089:177-193.

41. HORVATH L. G; HENSHALL S. M; LEE C-S *et al.* Frequent loss of estrogen receptor- $\beta$  expression in prostate cancer. **Cancer Res** 2001 July. 61:5331-5335.
42. IACOPINO F; ANGELUCCI C; LAMA G *et al.* Apoptosis-related gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. **Anticancer Res.** 2006, May; 26 (3A): 1849-1854.
43. IMAMOV O; SHIM G-J; WARNER M *et al.* Estrogen receptor beta in health and disease. **Biol Rep** 2005. 73:866-871.
44. INCA-Instituto Nacional do Câncer- Ministério da Saúde/Brasil. Avaliado em: URL:<http://www.inca.gov.br>
45. INCA-Instituto Nacional do Câncer. **Classificação de tumores malignos.** 6 ed. Ministério da Saúde, 2004.
46. ITO T, TACHIBANA M, YAMAMOTO S, NAKASHIMA J, MURAI M. Expression of estrogen receptor (ER-alpha and ER-beta) mRNA in human prostate cancer. **Eur Urol** 2001 Nov; 40(5):557-563.
47. JONG F. H; OISHI K; HAYES R. B *et al.* Peripheral hormone levels in controls and patients with prostatic cancer or benign prostatic hyperplasia: results from the Dutch-Japanese case-control study. **Cancer Res.** 1991; 51 (13): 3445-3450.
48. JUNQUEIRA L. C; CARNEIRO J. **Histologia Básica.** 10 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2004.
49. KANG D; ANDRIOLE G. L;VAN DE VOOREN R. C *et al.* Risk behaviours and benign prostatic hyperplasia. **Bri J Uro Int** 2004; 93(9):1241-1245.
50. KING K. J; NICHOLSON H. D; ASSINDER S. J. Effect of increasing ratio of estrogen:androgen on proliferation of normal human prostate stromal and epithelial cells, and the malignant cell line LNCaP. **Prostate** 2006 Jan; 66 (1):105-114.
51. KOEHLER K. F; HELGUERO L. A; HALDOSÉN L-A *et al.* Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor  $\beta$ . **Endoc Rev** 2005; 26(3):465–478.
52. KRISTAL A. R; SCHENK J. M; SONG Y *et al.* Serum steroid and sex hormone-binding globulin concentrations and the risk of incident benign prostatic hyperplasia : results from the prostate cancer prevention trial. **Am J Epidemiol** 2008; 168:1416-1424.
53. KROON F. J; MUNDAY P. L; WESTCOTT D. A *et al.* Aromatase pathway mediates sex change in each direction. **Proc R Soc B** 2005; 272:1399-1405.
54. LEAV I; LAU K-M; ADAMS J. Y; MCNEAL J. E *et al.* Comparative studies of the estrogen receptor  $\beta$  and  $\alpha$  and the androgen receptor in normal human prostate glands, displasia, and in primary and metastatic carcinoma. **Am J Pathol** 2001; 159 (1): 79-92.

55. LEUNG Y. K; MAK P; HASSAN S *et al.* Estrogen receptor (ER)- $\beta$  isoforms: a key to understanding ER- $\beta$  signaling. **Proc Natl Acad Sci** 2006 Aug; 103 (35):13162–13167.
56. LEYGUE E ; DOTZLAW H ; WATSON P. H *et al.* Expression of estrogen receptor  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 5 messenger RNAs in human breast tissues. **Cancer Res** 1999. 59:1175-1179.
57. LI W; WU C; FEBBO P. G *et al.* Stromally expressed c-jun regulates proliferation of prostate epithelial cells. **Am J Pathol.** Oct 2007. 171 (4):1189-1198.
58. MARIEB E. N.; HOEHN K. **Anatomia e fisiologia.** 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
59. MATTHEWS J, GUSTAFSSON J. A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. **Mol Intervent** 2003; 3: 281–292.
60. McNEAL J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. **Urol. Clin. North Am.** 1990; 17:477-486.
61. MOORE J. T; MCKEE D; SLENTZ-KESLER K *et al.* Cloning and characterization of human estrogen receptor  $\beta$  isoforms. **Bioch Bioph Res Comm** 1998. 247:75-78.
62. NELSON W. G; DE MARZO A. M; ISAACS W. B. Prostate cancer. **New Engl J Med.** 2003; 349:366-381.
63. NEUHOUSER M.L.; KRISTAL A. R.; PENSON D.F. Steroid hormones and hormone-related genetic and lifestyle characteristics as risk factors for benign prostatic hyperplasia: review of epidemiologic literature. **Urology** 2004; 64(2):201-211.
64. NILSSON S; GUSTAFSSON J-A. Estrogen receptor transcription and transactivation. Basic aspects of estrogen action. **Breast Cancer Res** 2000; 2: 360-366.
65. PAECH K ; WEBB P ; KUIPER G. G *et al.* Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. **Science.** 1997; Sep 5; 227 (5331): 1508-1510.
66. PASQUALI D ; ROSSI V ; ESPOSITO D *et al.* Loss of estrogen receptor  $\beta$  expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:2051-2055.
67. PLATZ E. A; RIMM E. B; WILLETT W. C *et al.* Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:2009–2017.
68. POOLA I; ABRAHAM J; BALDWIN K *et al.* Estrogen receptors Beta4 and Beta5 are full length functionally distinct ER $\beta$  isoforms. **Endocrine** 2005 Aug. 27 (3):227-238.

69. PRAVENOTTI A; MORNATI O; MORNATI P. G *et al.* Estrogen receptor beta (ERbeta) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: studies on the possible mechanism of action in DU 145 cells. **Mol Cell Endocrinol** 2007 Jan; 263(1-2):46-54.
70. RANNIKKO S; ADLERCREUTZ H. Plasma estradiol, free testosterone, sex hormone binding globulin binding capacity, and prolactin in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. **Prostate**. 1983; 4(3): 223-229.
71. REITER R. E; KERNION J. B. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: **Walsh: Campbell's Urology**, 8<sup>th</sup> edition: WB Saunders; 2002. p. 3002-3003.
72. ROSS R; BERNSTEIN L; JUDD H *et al.* Serum testosterone levels in healthy young black and white men. **J Natl Cancer Inst**. 1986; 76 (1):45-48.
73. SCHULZE H; CLAUS S. Histological localization of estrogen receptors in normal and diseased human prostates by immunocytochemistry. **Prostate**. 1990; 16 (4):331-343.
74. SIGNORETTI S, LODA M. Estrogen receptor  $\beta$  in prostate cancer: brake pedal or accelerator? **Am J Pathol** July 2001; 159(1): 13-16.
75. SKRZYPCZAK M; BIECHE I; SZYMCZAK S *et al.* Evaluation of mRNA expression of estrogen receptor  $\beta$  and its isoforms in human normal and neoplastic endometrium. **Int J Cancer** 2004. 110:783-787.
76. SIMPSON, R J. Benign prostatic hyperplasia. **Brit J Gen Pract**. 1997, 47: 235-240.
77. TAKAHASHI Y; PERKINS S. N; HURSTING S. D; WANG T. T. 17Beta-estradiol differentially regulates androgen-responsive genes through estrogen receptor-beta- and extracellular-signal regulated kinase-dependent pathways in LNCaP human prostate cancer cells. **Mol Carcinog** 2007 Feb; 46 (2):117-129.
78. TAYLOR S. E; MARTIN-HIRSH P. L. MARTIN F. L. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. **Cancer Letters** 2010. 288:133-148.
79. THELLENBERG-KARLSSON C; LINDSTRÖN S; MALMER B *et al.* Estrogen receptor beta polymorphism is associated with prostate cancer risk. **Clin Cancer Res** 2006 Mar; 12(6):1936-1941.
80. ZHU Y-S; CAI L-Q; HUANG Y; FISH J *et al.* Receptor isoform and ligand-specific modulation of dihydrotestosterone-induced prostate specific antigen gene expression and prostate tumor cell growth by estrogens. **J Androl** 2005; 26 (4): 500-510.
81. YANG G-S; WANG Y; WANG P *et al.* Expression of oestrogen receptor- $\alpha$  and oestrogen receptor- $\beta$  in prostate cancer. **Chin Med J** 2007; 120 (18):1611-1615.

82. YEH S; MIYAMOTTO SHIMA H *et al.* From estrogen to androgen receptor: a new pathway for sex hormones in prostate. **Proc Natl Acad Sci** May 1998; 95:5527-5532.
83. YIP I; HEBER D; ARONSON W. Nutrition and prostate cancer. **Urol Clin North Am** 1999 May; 26 (2): 403-411.
84. WU Q; ZHOU Y; CHEN L *et al.* Benign prostatic hyperplasia (BHP) epithelial cell line BPH-1 induces aromatase expression in prostatic stroma cells via prostaglandin E2. **J Endocrinol** 2007. 195:89-94.

## Anexo 1

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: Expressão gênica e protéica das isoformas dos receptores de estrogênio e da enzima aromatase em homens com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata

Prezado Senhor:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar à formação desses tumores. Como o Senhor tem o diagnóstico de \_\_\_\_\_ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendado cirurgia, gostaríamos de convidá-la para participar do estudo.

Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir uma coleta de amostra de sangue no dia da sua cirurgia e permitir que após a retirada da peça cirúrgica dois pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético. O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia.

Quanto à coleta sangüínea, o Sr. será submetida à coleta de 10 mL de sangue venoso, no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais. Os riscos envolvidos com essa coleta são mínimos, sendo a ocorrência de pequenos hematomas/equimoses a alteração mais comum.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras por até 5 anos para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (fone: 99969044), o Prof. Dr. Milton Berger (21018286), e Fernanda Seibel (fone: 99724758). Caso o Sr. tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá

nos contatar nos telefones indicados acima. Este projeto foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (fone: 21018290).

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

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

Paciente ou responsável \_\_\_\_\_

Pesquisador \_\_\_\_\_