

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia - UFRGS

Tese de doutorado

**Polimorfismo CAG e GGC do receptor de androgênios e a expressão de
correguladores em homens com câncer de próstata e hiperplasia prostática
benigna.**

Vanderlei Biolchi

Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva

Junho 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia - UFRGS

Tese de doutorado

**Polimorfismo CAG e GGC do receptor de androgênios e a expressão de
correguladores em homens com câncer de próstata e hiperplasia prostática
benigna.**

Tese de Doutorado apresentado ao PPG em Fisiologia como pré-requisito obrigatório para a obtenção do título de Doutor em Ciências Básicas da Saúde: Fisiologia

Vanderlei Biolchi

Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva

Junho 2010

“Dedico este trabalho a todas as pessoas que acreditam e buscam o conhecimento através da ciência”

"Tudo faz sentido, tudo tem uma explicação, o detalhe é que para muitos, não evoluímos o suficiente para entendê-los"

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Fisiologia; Professores e Funcionários.

À Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum da Silva, minha orientadora, por ter me aceitado na realização desse projeto, pelo exemplo como pesquisadora, pelo constante estímulo, dedicação, principalmente, pela confiança e amizade.

Ao serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por permitir a realização desse projeto, em especial ao Dr. Brasil Silva Neto e Milton Berguer, pelo grande auxílio prestado, fundamental para a realização deste projeto.

Ao professor Edison Capp, pela oportunidade de realizar o estágio de doutorado no exterior, experiência pela qual foi fundamental para meu amadurecimento como pesquisador e como pessoa.

Aos colegas de Laboratório Aline Amaral, Aline Damo, Ana Luiza Ferrari, Ana Paula Santin, Bruna Amorim, Caroline Hillebrand, Diego Pianta, Fernanda Seibel, Gustavo Dias Ferreira, Patrícia Martiny, Tiago Fontanive, Vanessa Lora e Vivian Giesel, pela amizade e convívio durante a realização desse trabalho.

Agradecimento especial a Gisele Branchini e Lolita Schneider Pizzolato, pela amizade e profissionalismo, as quais foram muito importantes pela realização do doutorado.

Aos meus amigos Adriane Pozzobon, Alan Poppl, Alex Sander Araújo, Eduardo Sanches, Daiane Janner, Karina Casali, Mariane Bertagnolli, Rafael Orcy, Ricardo Pellegrino, Simone Radavelli, Sheila Lecke, Tiago Martins, Viviane Elsner, pela amizade e agradável companhia.

Aos meus amigos do Centro Universitário Metodista - IPA, importantes como fonte de amizade e profissionalismo.

Aos meus amigos de convívio pessoal, sempre presentes durante o período do doutorado.

Às pessoas que de alguma forma me auxiliaram durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Anselmo e Tercila, pelo amor, afeto, carinho e pelo empenho para me propiciar uma boa educação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE ABRACIATURAS	16
JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	22
INTRODUÇÃO	23
Câncer de Próstata	23
Hiperplasia Prostática Benigna	25
Androgênios.....	26
<i>Mecanismo de Ação dos Hormônios Esteróides.....</i>	<i>28</i>
Receptor de Androgênio	31
<i>Polimorfismo CAG e GGC.....</i>	<i>33</i>
Correguladores	36
<i>SHP.....</i>	<i>37</i>
<i>FHL2</i>	<i>39</i>
<i>SCR-1, AIB-1, GRIP1.....</i>	<i>40</i>
OBJETIVOS.....	42
Objetivo Geral	42
Objetivos Específicos.....	42
MATERIAIS E MÉTODOS	44
Delineamento do Estudo: Estudo transversal.....	44
Crerios de Inclusão e Exclusão:.....	44
População em Estudo:	45
Cálculo Amostral	46
Coleta das Amostras Teciduais.....	46
Exame Anatomopatológico.....	48
Armazenamento das Amostras	48
Análise Molecular	48
<i>Extração de DNA.....</i>	<i>48</i>

<i>Reação de PCR para a amplificação das repetições CAG e GGC</i>	49
<i>Análise dos Polimorfismos CAG e GGC do Receptor de Androgênio:</i>	52
<i>Extração de RNA</i>	52
<i>Quantificação do RNA</i>	53
<i>PCR a partir da Transcrição Reversa (RT-PCR)</i>	54
<i>Síntese de DNA Complementar (cDNA)</i>	54
<i>qRT-PCR: Quantificação em Tempo Real</i>	55
<i>Curva de Padronização</i>	56
<i>Curva de Normalização</i>	57
Análise de Proteínas	59
<i>Extração de Proteínas</i>	59
<i>Western blott</i>	60
<i>Revelação das Autorradiografias</i>	62
Análise Estatística	62
Considerações Éticas	63
Locais de Realização do Projeto	64
Fontes de Financiamento	64
RESULTADOS (1ª parte)	65
RESULTADOS (2ª parte)	75
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA 1ª PARTE	105
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA 2ª PARTE	112
CONCLUSÕES	131
REFERÊNCIAS	133
ANEXO 1	153
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - HPB	153
ANEXO 2	154
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - CaP	154
ANEXO 3	155
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles	155
ANEXO 4	156
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	156

ANEXO 5.....	158
Artigo	158

RESUMO

Introdução. O câncer de próstata (CaP) é o mais comum em homens nos Estados Unidos. Em 2010, foram estimados 192.280 novos casos de CaP e 27.360 mortes nos Estados Unidos. A incidência estimada de CaP no Brasil é de 52.350 novos casos em 2010, principalmente na região sul. A hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma anormalidade proliferativa associada à idade em homens. A prevalência de HPB é em torno de 14% entre 40 e 50 anos e 43% acima de 60 anos.

A patogênese do desenvolvimento tumoral tem sido associada com a ação dos hormônios esteróides. Os efeitos dos androgênios são mediados pela testosterona e pela dihidrotestosterona (DHT) nas células alvo. Suas ações têm sido demonstradas na morfogênese, diferenciação, proliferação e secreção da glândula prostática. A ligação do androgênio promove a ativação do receptor de androgênio (AR), recrutamento de cofatores, promovendo a transcrição dos genes alvos hormônio-dependentes. Numerosos corre reguladores do AR têm sido descritos como sendo essenciais para a ativação do AR durante a progressão da doença. SHP, FHL2 e o complexo P160 (SRC1, GRIP1 e AIB1) parecem ser importantes corre reguladores do AR.

O polimorfismo CAG e GGC do AR pode alterar a transcrição dos genes responsivos aos androgênios e, potencialmente, atuar no desenvolvimento da HPB e do CaP.

Objetivo. 1. Investigar a associação entre o número de repetições CAG e GGC do AR, os níveis de testosterona e a chance de desenvolver CaP ou HPB em nossa

população. 2. Investigar a expressão de SHP, FHL2, do complexo P160 e do AR em tecidos HPB, CaP e ZPU (zona periuretral proveniente das amostras CaP).

Materiais e Métodos. Foram analisados 344 pacientes oriundos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo 130 CaP, 126 HPB e 88 controles, para analisar o polimorfismo CAG e GGC. O DNA foi extraído a partir do sangue periférico e o gene do AR foi analisado através de análise de fragmento. Cento e dois pacientes submetidos à cirurgia foram utilizados para avaliar as expressões gênicas. Foram avaliados 36 HPB, 66 CaP e 33 ZPU. O RNA foi extraído e as expressões gênicas foram analisadas por PCR em tempo real. Os protocolos e os termos de consentimento foram aprovados pelo comitê de ética local e nacional.

Resultados. As médias do número de repetições CAG e GGC foram semelhantes entre os grupos CaP, HPB e controles. A chance de desenvolver CaP nos indivíduos que possuem um longo alelo para o polimorfismo GGC ($GGC > 18$ e $GGC > 19$) é de 1,96 e 3,30 vezes maior do que o alelo curto ($GGC \leq 18$ e $GGC \leq 19$) ($p=0,035$ e $p=0,007$), respectivamente. A chance de desenvolver HPB em indivíduos que possuem o alelo longo para o polimorfismo GGC ($GGC > 18$) é 2,33 vezes maior ($p=0,008$) do que o alelo curto ($GGC \leq 18$). O risco de desenvolver CaP e HPB em pacientes com a testosterona total $< 4\text{ng/mL}$ foram de 2,80 ($P=0,005$) e 2,78 vezes maior ($P=0,002$), respectivamente, comparado com os pacientes com testosterona total $> 4\text{ng/mL}$. Os níveis séricos de testosterona total em pacientes com $GGC > 19$ foram significativamente menor comparados com pacientes com $GGC \leq 19$ ($P=0,001$).

A expressão gênica de AR foi maior no grupo ZPU e CaP em relação ao grupo HPB ($P=0,033$ e $P<0,001$, respectivamente). A expressão de SHP foi maior no

grupo CaP comparado com o HPB ($P=0,039$). A expressão de FHL2 foi maior no grupo ZPU comparado com o CaP e HPB ($P<0.001$ e $P=0.007$, respectivamente). Dos genes que formam o complexo P160, a expressão de SRC1 foi maior no grupo ZPU comparado com o CaP ($P<0.001$) e HPB ($P=0,005$). GRIP1 foi mais expresso nos grupos CaP e ZPU em relação ao grupo HPB ($P<0,001$ e $P=0.006$, respectivamente) e a expressão de AIB1 foi maior nos grupos CaP e ZPU comparados ao grupo HPB ($P=0,030$ e $P=0.001$, respectivamente). A expressão protéica de FHL2 foi maior no grupo CaP comparado com o grupo HPB ($P=0.023$).

As análises moleculares de AR, GRIP1 e AIB1, mostraram melhores parâmetros diagnósticos do que a análise dos níveis séricos de PSA.

Conclusões. A presença de um número de repetições GGC>18 e GGC>19 do AR foi associada com o aumento da chance de desenvolver CaP. As repetições de GGC>18 também foram associadas com a chance de desenvolver HPB. Níveis baixos de testosterona sérica foram encontrados nos grupos CaP e HPB comparados com os controles. Baixos níveis de testosterona podem aumentar a chance de desenvolver CaP e HPB.

Este estudo demonstra a participação dos genes AR, SHP, FHL2 e do complexo P160 no aumento de proliferação da glândula prostática. AR, FHL2, SRC1, GRIP1 e AIB1 poderão ser uma boa alternativa para acompanhar os pacientes que possuem níveis elevados de PSA, toque alterado e biópsia negativa.

ABSTRACT

Introduction. Prostate cancer (PCa) is the most common cancer in men within the U.S. In 2010, 192,280 new cases were estimated in the U.S., and 27,360 deaths were due to this disease. The estimated incidence of prostate cancer in Brazil is of 52,350 new cases in 2010, mainly in southern regions. Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) is a very frequent age-related proliferative abnormality in men. The prevalence of BPH is around 14 % at the age of 40 to 50 years, and 43% among those 60+.

The pathogenesis of tumor development has been closely associated to the action of steroid hormones. The androgenic effects are mediated by testosterone and dihydrotestosterone (DHT) in the target cells and their action have been demonstrated in morphogenesis, differentiation, cell proliferation and secretions of the prostate gland. The androgen binding promotes the activation of the androgen receptor, recruitment of co-factors, promoting the transcription of hormone-dependent target genes. Several AR-associated coregulators have been shown to be essential for AR activation during disease progression. SHP, FHL2 and P160 complex (SRC1, GRIP1 and AIB1) has been shown as important AR coregulators.

Polymorphic CAG and GGC repeats in the androgen receptor (AR) can alter transactivation of androgen-responsive genes and, potentially, act over BPH and PCa risks.

Purposes. 1. To investigate the association between CAG and GGC repeat length, testosterone levels and the risks of PCa and BPH in a case-control study from a

Brazilian population. 2. To investigate the SHP, FHL2, P160 and AR expressions in BPH, PCa and PUZ (periurethral zone tissue from PCa sample) tissues.

Material and Methods. At Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 344 patients were evaluated; 130 PCa, 126 BPH and 88 healthy controls, to analyze CAG and GGC polymorphisms. DNA was extracted from peripheral leukocytes and the AR gene was analyzed by fragment analysis. Hazard Ratio (HR) and 95% confidence limits were estimated. 102 men undergoing surgical removal were evaluated to analyze gene expressions; 36 BPH, 66 PCa and 33 PUZ. RNA was extracted and gene expression was analyzed by real time RT-PCR. Protocols and informed consent were approved by the local and national ethics committee.

Results. CAG and GGC mean lengths were not different between PCa, BPH and controls. The risk of developing PCa in individuals who have the long allele for GGC polymorphism (GGC > 18 and GGC >19) was 1.96 and 3.30 times higher compared to the short allele (GGC ≤ 18 and GGC ≤ 19) ($P=0.035$ and $P=0.007$), respectively. The risk of developing BPH in individuals who have the long allele for GGC polymorphism (GGC > 18) was 2.33 times higher compared to the short allele (GGC ≤ 18) ($P=0.008$). The risk of developing PCa and BPH in individuals who have the total testosterone < 4ng/mL were 2.80 ($P=0.005$) and 2.78 times higher ($P=0.002$), respectively, compared to individuals with testosterone levels > 4ng/mL. The total testosterone level in patients with GGC >19 was significantly lower in comparison to patients with GGC ≤ 19 ($P=0.001$).

AR mRNA level was higher in PCa and PUZ group than BPH ($P=0.033$ and $P<0.001$, respectively). SHP level was higher in PCa group compared to BPH ($P=0.039$). FHL2 level was higher in PUZ group compared to PCa and HPB ($P<0.001$

and $P=0.007$, respectively). SRC1 showed no difference between PCa and BPH, but PUZ group SRC1 levels was higher compared to PCa ($P<0.001$) and BPH ($P=0,005$). GRIP1 levels were higher in PCa and PUZ group than BPH ($P<0.001$ and $P=0.006$, respectively). AIB1 level was higher in PCa and PUZ group compared to BPH ($P=0.030$ and $P=0.001$, respectively). FHL2 protein expression was higher in PCa group compared to HPB ($P=0.023$).

Molecular analysis of AR, GRIP1 and AIB1 demonstrated better diagnosis parameters compared to serum PSA levels.

Conclusions. Our data suggest that the presence of a long number of GGC polymorphic repeats in the androgen receptor gene is associated with the increased risk of developing PCa and BPH. Serum testosterone levels were lower in PCA and BPH groups when compared to control groups. Low levels of testosterone can increase the risk of PCa and BPH.

This study indicates a larger participation of AR, SHP, FHL2 and P160 genes in the prostate proliferation. AR, FHL2, SRC1, GRIP1 and AIB1 might be analyzed on the future to accomplish some patients who have higher PSA levels, altered digital rectal examination, and negative biopsy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação hormonal	30
Figura 2: Organização genética e funcional do AR	32
Figura 3: Amplificação do produto de PCR em gel de agarose 1,5%.....	51
Figura 4: Curva de melting do gene B2m por qRT-PCR	56
Figura 5: Amplificação do gene B2m por qRT-PCR	57
Figura 6: Distribuição da frequência de repetições CAG em controles, HPB e CaP	68
Figura 7: Distribuição da frequência de repetições GGC em controles, HPB e CaP.....	69
Figura 8: Expressão gênica de AR	78
Figura 9: Expressão gênica de SHP	79
Figura 10: Expressão gênica de FHL2	80
Figura 11: Expressão gênica de SRC1	81
Figura 12: Expressão gênica de GRIP1	82
Figura 13: Expressão gênica de AIB1	83
Figura 14: Expressão protéica de AR.....	85
Figura 15: Expressão protéica de SHP	86
Figura 16. Expressão protéica de FHL2.....	87
Figura 17: Expressão protéica de SRC1	88
Figura 18: Expressão protéica de GRIP1	89
Figura 19: Expressão protéica de AIB1	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTR	Ativador do Receptor da Tireóide e Ácido Retinóico
AD1	Domínio de Ativação 1
AD2	Domínio de Ativação 2
AF-1	Domínio Função de Ativação 1
AF-2	Domínio Função de Ativação 2
AF-5	Domínio Função de Ativação 5
AHPN	Ácido carboxílico 6-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]-2-naftaleno
AIB1	Amplificado do Câncer de Mama 1
Akt	Serina-Treonina Kinase B
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
AR	Receptor de Androgênio
ARA 70	Proteína Associada ao Receptor de Androgênio 70
ARE	Elemento Responsivo ao Androgênio
AR-LBD	Domínio de Ligação do Ligante no AR
AR-NTD	Domínio Variável Amino-Terminal do AR
ASAP	Proliferação Atípica de Pequenos Ácinos
ATP	Adenosina Trifosfato
CAG	Citosina, Adenina, Guanina
CaP	Câncer de Próstata
CBP	Proteína Ligante ao CREB

cDNA	DNA complementar
CI	Intervalo Interquartil
CREB	Proteína Ligadora ao Elemento Responsivo a AMPc
C_T	Ciclo Limiar
CWR22	Linhagem de Câncer de Próstata Humano Xenográfico Androgênio-Dependente
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DEPC	Dietilpolicarbonato
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfato
DTT	Ditiotreitol
ECL	Quimioluminescência Realçada
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ER	Receptor de Estrogênio
ERE	Elemento Responsivo aos Hormônios Esteróides
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FHL-2	<i>Four and a Half Lim Domain 2</i>
FIPE-HCPA	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA
GGC	Guanina, Guanina, Citocina
GGN	Guanina, Guanina, (Citosina ou Guanina ou Timina)
GR	Receptor de Glicocorticóide

GRIP1	Proteína de Interação ao Receptor Glicocorticóide 1
H	Hormônio
HAT	Histona Acetiltransferase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDAC	Histona Desacetilase
HE	Hematoxilina-Eosina
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
HR	<i>Hazard Ratio</i> (Razão de Chance)
HRE	Elemento Responsivo ao Hormônio
IC	Intervalo de Confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
LaBIMET	Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral
LBD	Domínio de Ligação do Ligante
LNCaP	<i>Lymph Node Carcinoma of the Prostate</i>
mg	Miligrama
min	Minuto
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCoA1	Coativador do Receptor Nuclear 1
NCoA2	Coativador do Receptor Nuclear 1

ng	Nanograma
NLS	Sinal de Localização Nuclear
nM	Nanomolar
NR	Receptor Nuclear
NTD	Domínio Variável Amino-Terminal
PC-3	<i>Parental human prostate carcinoma</i>
pCIP	Proteína Associada ao Co-integrador p300/CBP
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
PIN	Neoplasia Intraepitelial
PR	Receptor de Progesterona
PSA	Antígeno Prostático Específico
qRT-PCR	PCR Transcriptase Reversa em Tempo Real
R	Receptor
RAC3	Receptor Associado ao Coativador 3
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
RNAPII	RNA Polimerase do Tipo 2
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor
rpm	Rotações por Minuto
RPM	Rotação por Minuto
RT-PCR	PCR Transcriptase Reversa
RVN	Razão de Verossimilhança Negativa

RVP	Razão de Verossimilhança Positiva
SBMA	Atrofia Muscular Espino-Bulbar
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SHBG	Globulina Ligadora ao Hormônio Sexual
SHP	<i>Small Heterodimer Partner</i>
SRC1	Coativador do Receptor de Esteróide 1
SRC2	Coativador do Receptor de Esteróide 2
SRC3	Coativador do Receptor de Esteróide 3
SRF	Fator de Resposta Sérico
TAFS	Fatores Associados ao TATA
TATA Box	Sequência de DNA do Promotor de Eucariotos
TBP	Proteína de Ligação ao TATA
TBS	Solução Salina de Tris
TE	Tampão Tris-HCl-EDTA
TIF2	Fator Intermediário Transcricional 2
TP	Tecido Prostático
TRAM-1	Molécula Ativadora do Receptor do Hormônio da Tireóide
TRAMP	Adenocarcinoma Transgênico de Câncer de Próstata
Tris-HCl	Tampão Tris-HCl
TTBS	Solução Salina de Tris e Tween
U	Unidade
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VCaP	<i>Vertebral-Cancer of the Prostate</i>

VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
ZPU	Zona Periuretral
β2m	Beta 2 Microglobulina
μg	Micrograma
μM	Micromolar
°C	<i>Grau Celsius</i>

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Nos últimos anos as doenças prostáticas têm chamado a atenção de grupos de pesquisa e de autoridades sanitárias devido aos altos índices de prevalência e suas implicações na qualidade de vida dos pacientes, além dos custos com a saúde pública.

Com o desenvolvimento de técnicas avançadas de biologia molecular, as interações entre os hormônios esteróides e outros fatores reguladores da proliferação, diferenciação e apoptose podem ser mais bem esclarecidas. Na busca de uma maior compreensão destes processos, especialmente dos primeiros eventos da hiperplasia, antes da transformação neoplásica de tecidos sensíveis a hormônios, a análise de lesões benignas prostáticas representa um dos possíveis modelos de estudo. O fato das doenças prostáticas, tanto benignas quanto malignas, apresentarem alta incidência, morbidade e mortalidade, justifica esse crescente interesse.

O estudo das diferentes vias interconectadas no mecanismo de ação hormonal, envolvendo especialmente hormônios sexuais, fatores de crescimento, corretores e co-repressores que regulam a proliferação e/ou diferenciação celular, assim como a identificação de genótipos de maior risco para o desenvolvimento da doença poderão gerar novos caminhos na prevenção primária e secundária das doenças prostáticas.

INTRODUÇÃO

Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em homens, sendo o câncer mais comum em homens nos Estados Unidos e segundo em mortes ¹. Em 2010 foi estimado em 192.280 novos casos de CaP em americanos e 27.360 mortes por esta doença ². O risco de desenvolver a doença é de 1 em cada 6 homens e o risco de morte pela doença é de 1 em 30 ³. Nos Estados Unidos, a incidência anual do câncer de próstata é de 110/100.000 homens brancos e 170/100.000 afro-americanos ⁴. Atualmente, o risco de um americano ter câncer de próstata diagnosticado é de 11% e de morrer da doença é de 3,6% ⁵, sendo o câncer de próstata a segunda causa de morte câncer-específica⁴.

A sua incidência vem aumentando, principalmente pela maior expectativa de vida dos homens, sendo que após os 85 anos, a maioria dos homens apresenta este câncer em sua forma histológica ⁶.

O aumento da prevalência do câncer de próstata também é devido à melhoria nas técnicas diagnósticas, em especial, com o advento do antígeno prostático específico (PSA) ⁷. Entretanto a sua incidência e mortalidade variam em diferentes regiões geográficas, com forte influência regional e também racial ⁴.

No Brasil, o câncer de próstata é o segundo em incidência, sendo superado somente pelos tumores de pele não-melanomas. O número de casos novos de

câncer de próstata estimados no Brasil, em 2010, é de 52.350. Os estados da região Sul e Sudeste apresentam uma frequência maior do tumor ⁸.

No Brasil, a mortalidade tem aumentado de 3,73/100.000 homens em 1979 para 8,93/100.000 em 1999 e 9,47/100.000 em 2003 ^{9, 10}. Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 64% (variando entre 22 e 79%); enquanto que nos países em desenvolvimento a sobrevida média é de 41% (variação de 39 a 43%), sendo a média mundial estimada de 58% ¹¹.

A hereditariedade é um dos fatores envolvidos na etiologia do câncer de próstata visto que homens com um familiar de primeiro grau com esta doença têm um risco duas vezes maior de desenvolvê-la comparados com homens que não têm. Esta chance eleva-se em até 11 vezes se há 2 ou 3 membros da família acometidos. Homens com um irmão com CaP têm maior probabilidade de ter a neoplasia em relação àqueles cujo pai teve a doença ⁴. Idade, etnicidade, fatores alimentares e androgênios têm sido implicados como contribuidores para o risco aumentado de câncer de próstata ¹².

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 Escandinávia. Os afro-americanos apresentam uma incidência 1,5 vezes maior que os caucasianos daquele país e quase três vezes maior que homens de origem asiática ^{13, 14}. O risco de CaP aumenta entre os asiáticos quando eles imigram para a América do Norte, reforçando a idéia de que fatores ambientais atuam conjuntamente com fatores genéticos na carcinogênese ³.

Hiperplasia Prostática Benigna

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é considerada como um fenômeno progressivo, definido como o crescimento contínuo da próstata, levando à intensificação de sintomas e ao aumento do risco de complicações ao longo do tempo, como a retenção urinária aguda¹⁵.

Histologicamente, a HPB consiste no crescimento excessivo do tecido epitelial e fibromuscular da zona de transição da área periuretral da glândula prostática. Quando o tecido fibromuscular é preponderante, os sintomas urinários são freqüentemente irritativos (sintomas de armazenamento) em vez de obstrutivos (sintomas de esvaziamento) e podem estar correlacionados com o grau de estimulação da musculatura lisa pela atividade do sistema nervoso simpático¹⁶.

A HPB é uma anormalidade proliferativa muito freqüente na espécie humana, relacionada com a idade¹⁷. Estimativas da prevalência da HPB são imprecisas devido à não uniformidade dos critérios de diagnóstico da doença¹⁸.

A prevalência da HPB microscópica (sem evidências clínicas) em homens de 25 a 30 anos é de 10%, aumentando para mais de 50% aos 60 anos e atingindo em torno de 90% aos 85 anos. A HPB macroscópica pode ser detectável em torno dos 35 anos e atinge uma prevalência de mais de 50% aos 85 anos¹⁹. Estudos mais recentes mostram que a prevalência da HPB encontra-se em torno de 40 a 50% aos 50 anos e de aproximadamente 80% aos 70 anos de idade^{17, 20}. Dados da Associação Européia de Urologia mostram que a HPB é tão prevalente quanto à hipertensão e a diabetes na população de mesma faixa etária¹⁷. Dados da Associação Americana de Urologia confirmam que aproximadamente 50% dos

homens entre as idades de 51 e 60 anos e 90% dos homens acima de 80 anos desenvolvem HPB (<http://www.urologyhealth.org/search> acessado em 05/05/2010). Infelizmente, não dispomos de dados a respeito da incidência de HPB na população brasileira.

A incidência da HPB varia entre diferentes populações étnicas e países. As taxas mais baixas de incidência da HPB estão entre os países asiáticos ^{21, 22}. O mesmo achado foi visto em asiático-americanos ²³. Por outro lado, têm sido observadas taxas de incidência da HPB mais elevadas em populações africanas ²⁴. A população brasileira apresenta características étnicas altamente heterogêneas, com grande miscigenação entre europeus, africanos e ameríndios na sua constituição. Populações consideradas como sendo de raça branca, através de características físicas, apresentam uma significativa fração de traços genéticos característicos de africanos e ameríndios. O mesmo foi observado quando se tentou identificar indivíduos da raça negra através da observação de características fenotípicas. A exceção foi encontrada na população da cidade de Veranópolis/RS onde existe uma manutenção dos traços genéticos que caracterizam ancestralidade européia ^{25, 26}. Em virtude dessas observações, a correlação entre a etiologia da HPB e a raça na população brasileira torna-se uma tarefa difícil, senão sem relevância clínica.

Androgênios

A patogênese tumoral tem sido estreitamente associada à ação de hormônios esteróides ²⁷⁻³⁹. Estes hormônios exercem sua ação através de receptores nucleares, que são fatores de transcrição e regulam a expressão de genes alvo de uma maneira dependente do ligante.

As ações dos androgênios têm sido amplamente demonstradas na próstata humana, seja por sua importância na morfogênese, diferenciação, proliferação celular ou nas secreções da glândula prostática ⁴⁰⁻⁴⁷. A regulação desses processos requer a ativação de genes responsivos e dependentes da ativação do complexo androgênio-receptor ^{29, 48-54}.

Os efeitos dos androgênios são mediados pela testosterona e dihidrotestosterona (DHT) nas células. A ligação destes ligantes induz o receptor de androgênio (AR) a assumir uma configuração que conduz à ativação (ou inibição) transcricional e permite a transmissão de sinais extracelulares em respostas intracelulares, pela ativação de elementos promotores responsivos e o recrutamento de cofatores ⁵¹.

Além da ação do hormônio, complexos formados por co-ativadores ou co-repressores, causam uma modificação local da estrutura da cromatina e também participam da regulação da expressão gênica ^{51, 55}. A expressão gênica do AR pode ser regulada em múltiplos níveis por mecanismos de transcrição, pós-transcrição e pós-tradução ⁵⁶, e com isto alterar os mecanismos de regulação da proliferação celular.

Mecanismo de Ação dos Hormônios Esteróides

No tecido-alvo, a testosterona é convertida em DHT no citoplasma pela ação da enzima 5α -redutase, ligando-se ao AR, configurando a primeira etapa da ativação do receptor. A ligação do androgênio ao AR, permite que o receptor mude para uma conformação mais compacta, capaz de ligar-se ao DNA, como demonstrado em experiências por proteólise ⁵⁷. A ligação do androgênio promove a hiperfosforilação do AR por um processo comum nos receptores nucleares e outros fatores de transcrição. Quando inativado, o AR já se encontra num estado fosforilado, mas novos locais são fosforilados quando o AR é ativado ⁵⁸. Para mediar o efeito hormonal, o receptor necessita interagir com sequências específicas curtas do DNA ⁵⁹, chamadas de elementos responsivos ao hormônio (HRE), que estão localizados na região promotora dos genes.

Após a ligação do complexo hormônio-receptor em suas sequências específicas (ARE), o AR pode recrutar todos os componentes da maquinaria transcricional, particularmente a RNA polimerase do tipo II (RNAPII). O DNA não está sempre acessível na sua forma descondensada e, neste caso, é necessário recrutar os fatores nucleares transcricionais que interagem com os receptores nucleares. Suas atividades enzimáticas (por exemplo, acetilases) induzem a descompactação local da cromatina, o que permite o acesso da RNAP II e também permite que a maquinaria geral transcricional alcance o promotor do gene-alvo ⁶⁰. Estes corretores formam uma ponte entre a maquinaria transcricional e os

receptores que modulam a transcrição, promovendo a transcrição dos genes alvos hormônios-dependentes (figura 1).

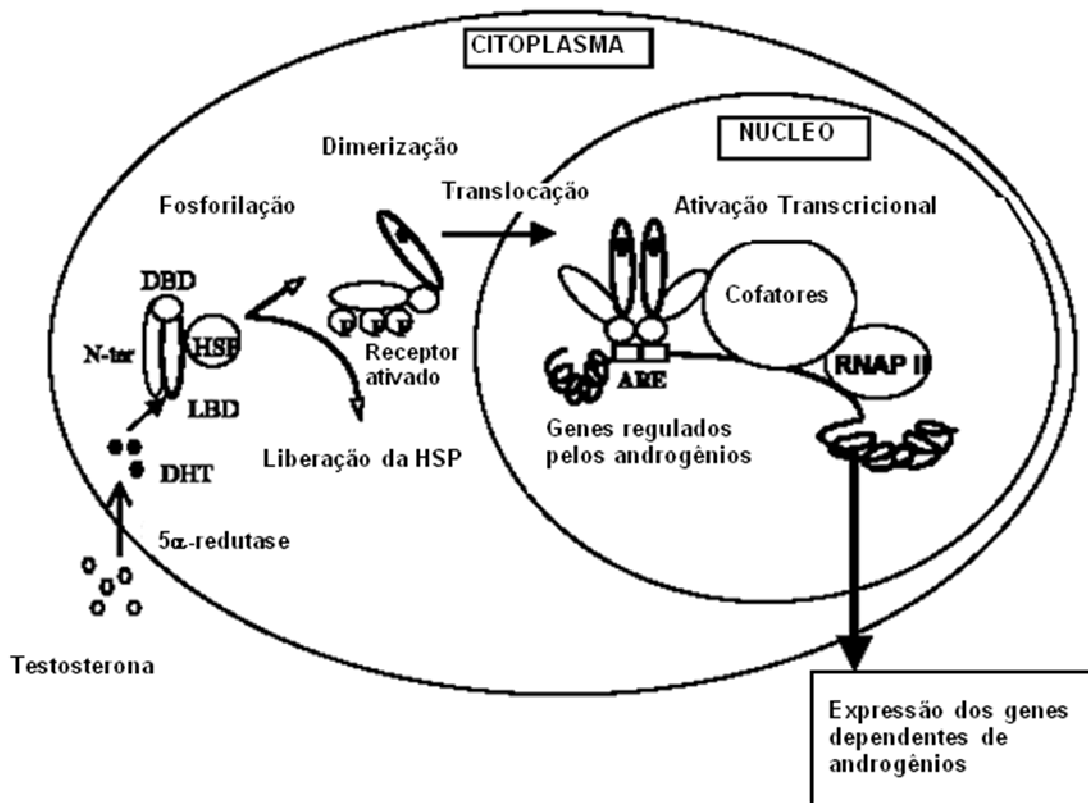


Figura 1 – Mecanismo de ação de hormônios esteróides.

O hormônio esteróide (testosterona) difunde-se para dentro da célula, sendo convertida em dihidrotestosterona pela 5 α -redutase, o qual se liga em receptores específicos no núcleo ou citoplasma da célula-alvo. O complexo hormônio-receptor liga-se a elementos responsivos a hormônios esteróides localizados na fita de DNA (ARE) induzindo a transcrição imediata dos genes precoces. A proteína produzida por estes genes regula a transcrição dos genes estruturais tardios cujos produtos interferem no desenvolvimento celular (Gobinet et al, 2002; modificado).

Receptor de Androgênio

O gene AR humano está localizado no cromossomo X, na posição q11-12, contém 8 exons ⁶¹ e um tamanho aproximado de 90 kb ⁶², sendo um membro da superfamília dos receptores hormonais nucleares ⁶³. A família dos fatores de transcrição dependentes do ligante são proteínas chave na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo embriogênese, desenvolvimento e homeostasia. A clonagem de cDNAs dos receptores nucleares de glicocorticóide ⁶⁴, estrogênio ⁶⁵, mineralocorticóide ⁶⁶ e progesterona ⁶⁷ revelou uma homologia estrutural em três domínios funcionais; um domínio que interage com o DNA, um domínio que interage com o esteróide e um domínio N-terminal. Claramente separados, os domínios tem sido bem caracterizados. O domínio variável N-terminal (NTD), está implicado na ativação transcricional e pode participar no recrutamento de cofatores. Este domínio contém a região de ativação transcricional AF-1, a qual é essencial para a atividade de transativação do AR, e a região AF-5, a qual possui uma forte atividade constitutiva ⁵¹. O domínio de ligação ao DNA tipo-dedo de zinco (DBD) é altamente conservado e promove a interação com o DNA. O domínio de ligação do ligante (LBD), contém uma região de ativação transcricional estritamente dependente do ligante, denominado domínio de função de ativação 2 (AF-2) e funcionalmente interage com fatores intermediários e cofatores nucleares ⁶⁸. Müller e colaboradores sugeriram uma possível interação entre NTD e LBD resultando na formação de uma

nova superfície que facilitaria a interação com cofatores que interagiriam em receptores esteróides/nucleares (NR) ⁵³.

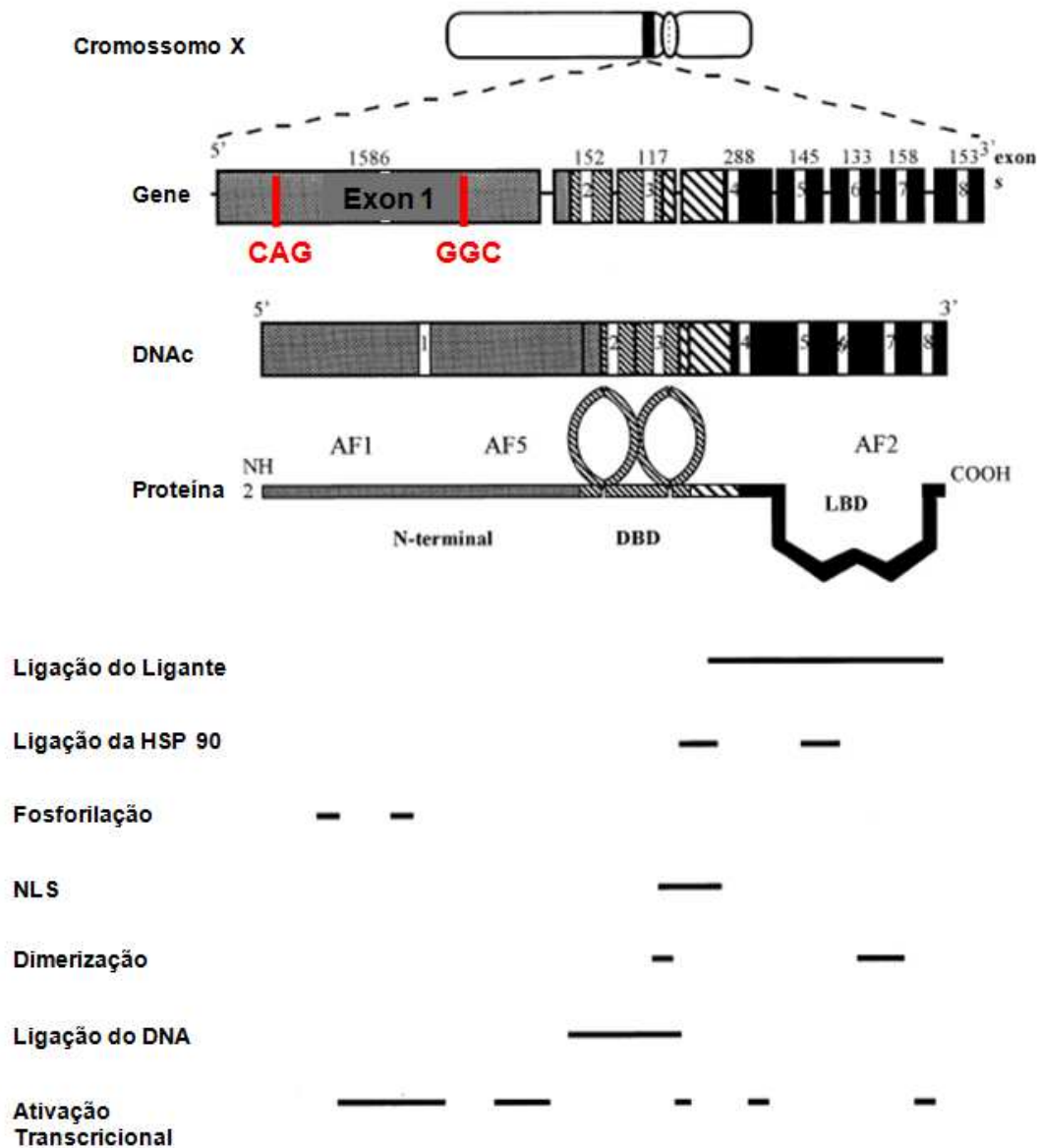


Figura 2: Organização genética e funcional do AR (Gobinet *et al.*, 2002; modificado).

Polimorfismo CAG e GGC

Polimorfismo genético é a ocorrência de variação de natureza genética em uma população para um ou mais *loci* cujos alelos têm frequência inferior a 0,99. Oposto de monomorfismo, ausência de variação ou predominância de um dos alelos cuja frequência é = 0,99 ⁶⁹. Enquanto a maioria das repetições de trinucleotídeos ocorre em seqüências não codificadoras do genoma, portanto sem influência na expressão do gene, aqueles localizados em regiões codificadoras podem influenciar a expressão do gene, modular a estrutura do RNAm e alterar a função das proteínas resultantes ⁷⁰.

O gene AR apresenta duas repetições polimórficas; CAG (que codifica para um trato poliglutamínico) e GGC (que codifica um trato poliglicínico). Ambos estão localizados no éxon 1, no domínio de transativação amino-terminal, uma região regulatória do processo de transcrição ⁶² (figura 2). O número de repetições CAG pode variar de 8 a 31 com média em torno de 20 repetições ⁷¹.

Quando o número de repetições CAG for de 40 ou mais, é caracterizada uma doença ligada ao cromossomo X que promove alterações neurodegenerativas conhecida como atrofia muscular espino-bulbar (SMBA), também conhecida como doença de Kennedy ^{72, 73}. Além da fraqueza progressiva do músculo devido à perda dos neurônios motores cerebrais e da medula espinhal, os homens com esta doença apresentam, frequentemente, sintomas de insensibilidade parcial aos androgênios (ginecomastia e atrofia testicular), indicativos de um mau funcionamento do AR ⁷⁴. Estudos demonstraram que o número de repetições CAG está correlacionado inversamente com o risco de desenvolver câncer de próstata ⁷⁵⁻⁷⁸. Além disso, o

comprimento da repetição CAG foi implicado, de forma herdada, com a insensibilidade aos androgênios, audição prejudicada hereditária, esquizofrenia, hiperplasia prostática benigna, com o risco de desenvolvimento de câncer de mama, de endométrio, de pulmão, de esôfago, de bexiga e do trato biliar, com a infertilidade e com a deficiência na espermatogênese ⁷⁹⁻⁹².

Estudos realizados *in vitro* mostraram uma correlação negativa entre o número de repetições CAG e a atividade transcricional do receptor de androgênios. O número aumentado de CAG reduz a atividade transcricional do AR enquanto que uma redução até zero induz uma atividade aumentada do AR ^{62, 75, 93-96}. Wang e colaboradores sugeriram que alterações nas mudanças conformacionais induzidas pelo ligante aumentam o recrutamento de co-ativadores e isto pode estar relacionado à hiperatividade transcricional do AR associada com o encurtamento do trato poliglutamínico ⁹⁶. Um estudo recente não encontrou esta relação inversa entre o número de repetições CAG e a atividade do AR ⁹⁷.

A variabilidade deste polimorfismo pode ser influenciada pelas diferenças étnicas entre as populações. A prevalência de menor número de repetições CAG é maior entre os afro-americanos e menor entre os asiáticos, sendo intermediária entre os caucasianos. Em homens saudáveis com descendência africana, a média do número de repetições CAG tem sido descrita entre 18 e 20 repetições ^{14, 71}. O mesmo número de repetições foi encontrado em certas subpopulações africanas ⁹⁸. Em caucasianos saudáveis, a média do número de repetições CAG é de 21-22 ^{14, 71} enquanto que em populações asiáticas a média encontrada foi de 22-23 repetições ^{14, 47, 77}.

No Brasil, um estudo de prevalência dos polimorfismos em indivíduos sem câncer de próstata verificou uma média de 20,65 repetições CAG e 22,38 do GGN, não tendo considerado diferenças raciais ⁹⁹. Em outro estudo do tipo caso-controle, que avaliou uma amostra da população brasileira, a média do número de repetições CAG no grupo câncer foi de 21,8 e no grupo controle foi de 22,1, não havendo diferença significativa entre as médias. Não foi encontrada associação entre um número menor de repetições CAG (21 ou menos) e o risco de câncer de próstata. Foi observada uma tendência de um menor número de repetições CAG na raça negra ¹⁰⁰. Brasil e colaboradores encontraram um risco aumentado de desenvolver câncer de próstata em pacientes com o número de repetições CAG inferior a 21 ⁸⁷.

O efeito da extensão do segundo microsatélite do gene do AR, consistindo das repetições GGN [(GGT)3GGG(GGT)2(GGC)4-25], que codifica um trato poliglicínico, não é claro. No entanto, Platz e colaboradores sugeriram que 23 repetições podem representar a seqüência codificadora ótima para a conformação e atividade da proteína do AR ¹⁴. Um desvio no número médio de repetições pode representar uma atividade alterada do AR. Os mesmos autores sugeriram que o menor número de repetições CAG e GGC no gene do AR pode estar associado com um risco aumentado de desenvolver HPB, propondo a investigação desta associação em pacientes com HPB. Uma vez que o AR está localizado no cromossomo X existe somente uma cópia do gene, portanto a presença de ambos os alelos de alto risco (curtos) poderia resultar no encurtamento do gene do receptor de androgênios e alterar consideravelmente sua função ⁸⁴.

Correguladores

Após a ligação do androgênio, o AR está apto para recrutar fatores gerais de transcrição para os promotores de genes alvos. Além de sua interação direta com vários fatores gerais da maquinaria transcricional, tem se tornado claro que a atividade transcricional do AR é regulada através de correguladores, incluindo ambos co-ativadores e co-repressores, por vários mecanismos ¹⁰¹⁻¹⁰³. Co-ativadores são fatores que podem interagir diretamente com o AR e aumentar sua atividade transcricional. Co-repressores são fatores que, associados ao AR, diminuem sua atividade transcricional. Ambos os tipos de correguladores são necessários para uma eficiente modulação da transcrição de genes alvos pelo AR. Conseqüentemente, mutações ou alterações na expressão de correguladores podem alterar a atividade do AR, resultando em alterações nos tecidos alvos do AR. Os correguladores do AR podem ter múltiplas e distintas atividades enzimáticas, como kinases, ATPases, acetilases, desacetilases e proteases ¹⁰⁴.

Correguladores podem ser divididos em dois tipos principais baseado em suas características funcionais ¹⁰⁴. Os correguladores do Tipo I funcionam primeiramente com o receptor nuclear no promotor do gene-alvo para facilitar sua interação com o DNA, através da remodelação da cromatina ou do recrutamento dos fatores gerais da transcrição associados com o complexo da RNA polimerase do tipo II ¹⁰⁵. Os exemplos deste tipo de correguladores são a Proteína Ligadora ao Elemento Responsivo a AMPc (CREB), Proteína Ligadora do CREB (CBP)/p300, os quais possuem atividade histona acetiltransferase (HAT) ^{106, 107} e interagem com a maquinaria basal transcricional ^{108, 109}. Outros correguladores do tipo I incluem a

proteína que se liga à seqüência TATA (TBP), os fatores associados ao TATA (TAFs) ^{110, 111}, o complexo mediador DRIP/TRAP ¹¹²⁻¹¹⁴, e o complexo de remodelagem da cromatina SWI/SNF¹⁰⁵. Os corretores do tipo II funcionam primeiramente por permitir que o receptor nuclear seja capaz de promover a expressão do gene-alvo modulando a conformação apropriada do AR e a ligação do ligante ou facilitando a interação dos domínios amino e carboxi-terminal. Estas ações podem contribuir para a estabilidade da proteína do AR na presença de ligantes agonistas ou influenciar sua distribuição subcelular, tendo por resultado uma influência total na atividade transcricional do AR. Esta categoria inclui os corretores que estabilizam o complexo ligante-ligado ao receptor, tal como ARA70 ^{103, 115}, e os corretores tais como o Filamin ¹¹⁶ que facilitam a translocação do complexo ligante-ligado ao receptor para o núcleo. Entretanto, deve-se levar em consideração que a importância relativa de muitos dos corretores identificados do AR ainda não foi estudada em modelos animais ou humanos, e conseqüentemente sua relevância fisiológica verdadeira, em circunstâncias normais e patológicas, deve ser pesquisada.

SHP

O SHP (*Short Heterodimer Partner*) é uma proteína atípica co-repressora da superfamília dos receptores nucleares, não possuindo o domínio DBD e NTD ¹¹⁷. Esta proteína nuclear é formada por 260 aminoácidos com um peso molecular de 29 kD, contendo um domínio de repressão intrínseca e três domínios LXXXLL-*like*, onde

L é o aminoácido leucina e X é qualquer aminoácido ¹¹⁸. SHP é um co-repressor que inibe a interação entre o AR e seus co-ativadores ¹¹⁹. Essa proteína foi a primeira descrita por essa interação com os receptores nucleares (NRs), incluindo o receptor X retinóide e o ER ¹²⁰⁻¹²³. SHP é expresso em tecidos alvos dos androgênios, sugerindo um papel na regulação do AR ¹²¹. Foi demonstrado que a proteína SHP interage diminuindo a atividade transcricional do AR ^{118, 121}. O motivo LXXLL do SHP medeia a interação entre o AR-LBD e o domínio N-terminal do AR com a proteína SHP, estabilizando a interação SHP-AR. Gobinet e colaboradores demonstraram que o SHP inibe ambos AR-LBD e AF-2 (NTD)-dependente de transativação, evidenciando que, em um primeiro momento, a proteína é capaz de inibir a porção amino-terminal dependente de transativação do receptor esteróide ¹¹⁸. Além disso, foi demonstrado o mecanismo de inibição do AR via competição com cofatores, no qual o aumento da expressão dos co-ativadores FHL2 e TIF2 (GRIP1), neutralizam a inibição do AR mediada pelo SHP. Em outro estudo realizado por Gobinet e colaboradores, foi demonstrado que o SHP medeia a maioria de seu efeito repressor através do recrutamento de histonas desacetilases (HDACs) e sugere que as ações fisiológicas do SHP poderiam ser afetadas por inibidores de HDAC ⁵⁰. Além disso, foi demonstrado que o SHP promove a apoptose via ação mitocondrial ¹²⁴.

FHL2

O coativador transcricional FHL2 (*Four and a Half of LIM-only protein 2*) é um membro da superfamília das proteínas LIM. Proteínas LIM são definidas pela presença de um ou múltiplas cópias de domínios LIM. O domínio LIM é um motivo rico em cisteína com uma sequência consenso $CX_2CX_{16-23}HX_2-CX_2CX_2CX_{16-21}CX(C,H,D)$ que coordenadamente liga dois átomos de zinco e medeia interações proteína-proteína¹²⁵. Baseado no número de domínios LIM e na presença ou não de motivos adicionais, as proteínas LIM podem ser agrupadas em diferentes classes¹²⁵. Uma dessas classes compreende as proteínas somente LIM que são compostas unicamente por até cinco domínios LIM. Uma subclasse de proteínas somente LIM, que contém 4 domínios e meio LIM, foram designadas de proteínas FHL (*four and a half of LIM-only protein*). Os cinco membros dessa subclasse são o FHL1-4 e ACT⁵³. FHL2 foi caracterizado como um coativador do AR e contém uma forte função de transativação autônoma, ligando-se especificamente ao AR *in vitro* e *in vivo*⁵³. FHL2 aumenta, seletivamente, a atividade transcricional do AR¹²⁶ através da interação dependente com domínio AF-2⁵³. A expressão do FHL2 é restrita ao epitélio prostático e ao miocárdio¹²⁷. Em um estudo realizado por Kinoshita e colaboradores comparando a expressão do FHL2 em tecidos normais e com câncer precoce de próstata, foi demonstrado que a expressão do FHL2 encontra-se 2 a 4 vezes mais baixa em câncer de próstata precoce¹²⁸. Por outro lado, um aumento da expressão de FHL2 tem sido encontrado no câncer de próstata avançado^{53, 129, 130}.

SCR-1, AIB-1, GRIP1

SRC-1 (*steroid receptor-coactivator-1*), AIB-1 (*amplified in breast cancer-1*) e GRIP1 (*GR-interacting protein 1*), são co-ativadores dos receptores nucleares, fazendo parte de uma família de proteínas de 160 kDa (p160), as quais se ligam ao domínio LBD, especificamente ao domínio AF-2 do receptor nuclear de uma maneira dependente do ligante através de motivos ricos em leucina dos co-ativadores (motivo LXXLL, onde X é qualquer aminoácido) chamado de “NR boxes”¹³¹⁻¹³³. Entretanto, há outra superfície de recrutamento do complexo p160 no domínio NTD do AR. As proteínas que formam o complexo p160 contêm uma região rica em glutamina (989 - 1240 aminoácidos), a qual forma uma superfície de interação com o domínio AR-NTD^{134, 135}. A atividade do AR é dependente da interação entre os domínios amino e carboxiterminal para sua total atividade. Esta interação é mediada pela formação de uma hélice anfipática através dos aminoácidos amino-terminal do AR-NTD^{101, 136-138}.

Três membros geneticamente distintos da família dos co-ativadores p160 tem sido caracterizados: (1) SRC-1, também conhecido como NcoA-1, (2) AIB1, também conhecido como SRC-2, pCIP, ACTR, TRAM-1 e RAC3 e (3) GRIP1, também conhecido como SRC-3, TIF2 e NcoA-2¹⁰⁴, os quais contêm dois domínios de ativação autônomos: AD1 e AD2.

Estudos *in vitro* têm mostrado que a ativação das proteínas do complexo p160 (SRC-1, AIB1, GRIP1) está correlacionada negativamente com o número de repetições CAG do AR^{93, 139}, demonstrando uma associação entre o número de repetições CAG com a ativação destas proteínas co-ativadoras do complexo p160.

Em amostras de câncer de próstata obtidas de pacientes que não responderam à terapia hormonal, a expressão do SRC-1 foi maior em relação aos pacientes com HPB e carcinoma de próstata androgênio-dependente ¹⁴⁰. Em amostras obtidas de tumores reincidentes, houve maior expressão do cofator GRIP1. O mais interessante é que a expressão do GRIP1 e do SRC-1 em câncer de próstata xenográfico CWR22 diminuiu após a castração e aumentou após uma recidiva do tumor, sendo seguido pelo aumento da expressão de AR ¹⁴⁰. Recentes estudos têm associado a expressão do complexo p160 com o câncer de próstata ^{29, 141-146}.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Investigar a associação da expressão gênica do AR e de seus corretores no tecido prostático com os polimorfismos CAG e GGC do receptor de androgênios em uma amostra da população masculina do Rio Grande do Sul com câncer de próstata ou hiperplasia prostática benigna.

Objetivos Específicos

- Determinar o número de repetições CAG e GGC do AR em pacientes com diagnóstico de câncer de próstata (CaP), hiperplasia prostática benigna (HPB) e controles;
- Determinar a concentração de testosterona total e livre dos pacientes em estudo;
- Verificar a associação entre o número de repetições CAG e GGC do AR e as concentrações de testosterona total e livre;
- Quantificar a expressão gênica e protéica do AR em tecidos de pacientes submetidos à cirurgia para CaP e HPB utilizando a técnica de PCR em tempo real e *western blot*;
- Quantificar a expressão gênica e protéica dos corretores do AR: SHP, FHL2, SRC1, AIB1 e GRIP1 nos mesmos tecidos;
- Verificar se existe correlação entre a expressão do gene do AR e dos genes corretores em estudo, assim como da proteína.

- Verificar se há diferença na expressão dos genes em estudo entre os tecidos CaP e ZPU (zona periuretral obtido da próstata com CaP).
- Verificar se existe a associação entre o número de repetições CAG e GGC do AR, a expressão do AR e a expressão dos corretores FHL2, SHP, SRC1, AIB1 e GRIP1 em pacientes submetidos à cirurgia de CaP e HPB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delimitação do Estudo: *Estudo transversal.*

Crítérios de Inclusão e Exclusão:

Grupo CaP – Pacientes provenientes do ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com idade entre 40 e 85 anos, com diagnóstico de câncer de próstata, que não tenham recebido hormonioterapia ou quimioterapia e que não possuam diagnóstico de outra neoplasia concomitante e pacientes submetidos à cirurgia para CaP no HCPA.

Grupo HPB - Pacientes entre 40 e 85 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 estejam em tratamento com inibidores da 5 α -redutase e que não possuam diagnóstico de neoplasia concomitante, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pacientes submetidos à cirurgia para HPB no HCPA.

Controles – Pacientes provenientes do ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e indivíduos voluntários, com idade entre 40 – 85 anos, com dosagem sérica do PSA menor ou igual a 2,0 ng/mL, volume prostático menor que 30g, exame de toque retal normal e sem diagnóstico de outra neoplasia concomitante.

População em Estudo:

Pacientes com diagnóstico de câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna e grupo controle recrutados no período de setembro de 2004 e setembro de 2007.

Os indivíduos com diagnóstico de CaP e HPB foram recrutados nos turnos de ambulatório do Serviço de Urologia do HCPA, e foram encaminhados a um ambulatório específico para realização desta pesquisa. Os objetivos da pesquisa foram explicados e, após a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1 e 2), foi realizada coleta de 5ml de sangue venoso periférico para avaliação dos polimorfismos e 5ml para dosagem sérica de testosterona total.

Os controles foram recrutados dos ambulatórios de Urologia e Medicina Interna e, uma vez verificados os critérios de inclusão e exclusão, também foram encaminhados ao ambulatório específico desta pesquisa. Após explicação dos objetivos da pesquisa e aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 3), foi realizada coleta de sangue venoso periférico para avaliação dos polimorfismos e dosagens hormonais em estudo (5ml cada).

Além disso, foram recrutados pacientes anterior à cirurgia para CaP e HPB. Os pacientes foram consultados e autorizaram a utilização do material para este estudo. Os objetivos da pesquisa foram explicados e foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 4). O tecido prostático (TP) foi obtido de pacientes masculinos, submetidos à prostatectomia radical por diagnóstico de CaP e por ressecção transuretral da próstata ou prostatectomia aberta por diagnóstico de Hiperplasia Prostática Benigna.

Para a análise do polimorfismo CAG e GGC do AR, todos os pacientes foram inclusos. Para o estudo da expressão gênica e protéica, somente os pacientes submetidos à cirurgia para CaP e HPB participaram da análise.

Cálculo Amostral

O tamanho da amostra foi calculado através do programa PEPI 3, utilizando-se dados do estudo de Silva Neto e colaboradores (2008), que avaliou o polimorfismo CAG numa população brasileira. Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90%, diferença entre as médias de 1 repetição, chegando-se a um N de 68 pacientes por grupo para análise do polimorfismo GGC e 149 para o polimorfismo CAG.

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 (Brum e cols. 2003). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90% e diferença entre as médias de 0,2 unidades arbitrárias, chegando-se a um N de 43 pacientes por grupo.

Coleta das Amostras Teciduais

Prostatovesiculectomia e Prostatectomia Radical: Durante a cirurgia para a retirada do tumor maligno, a próstata era fatiada pelo urologista para detectar o

nódulo tumoral. Depois de localizado, o nódulo era retirado e dividido em duas partes. Uma para ser enviada para a patologia e outra era colocado em um tubo plástico de 2,0 mL que logo era armazenado em Nitrogênio líquido. Além deste, um fragmento da zona periuretral (ZPU), distante do tumor e sem alteração macroscópica foi coletado, dividida em duas partes, sendo uma armazenada em N2 líquido e outra em um frasco com solução de formol para ser analisado pelo patologista.

Prostatectomia à Céu Aberto: Após a retirada do espécime cirúrgico, em campo limpo, pequenos fragmentos da próstata eram picados e colocados em 2 tubos de 2 mL. Em seguida, os tubos eram armazenados em N2 líquido.

Ressecção Transuretral: Durante a retirada dos fragmentos prostáticos, estes eram pinçados e colocados em 2 tubos de 2,0 mL. Logo em seguida, eram armazenados em N2 líquido.

Durante os procedimentos cirúrgicos, sempre que possível, eram coletados 5 mL de sangue com EDTA, para a análise do polimorfismo CAG e GGC do AR e 5 mL de sangue sem anticoagulante para coleta de soro, para as dosagens testosterona, SHBG e Albumina.

Exame Anatomopatológico

O exame anatomopatológico dos espécimes cirúrgicos, bem como a confirmação da presença ou ausência de tecido tumoral nas amostras de tecido tumoral e normal foram realizados através de microscopia óptica pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) por um médico patologista do HCPA.

Armazenamento das Amostras

Após a coleta dos tecidos prostáticos e sanguíneo, os tecidos prostáticos eram transportados, em nitrogênio líquido, para o Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral (LaBIMET) do departamento de Fisiologia da UFRGS, onde eram armazenados em freezer - 80°C, para futuras análises. O sangue coletado com EDTA foi armazenado em temperatura de 4-8°C por até uma semana, para posterior extração de DNA. O tubo de soro foi centrifugado a 3.500 rpm. O soro foi aliqotado em 2 tubos de 2mL e armazenado a -80°C.

Análise Molecular

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir do sangue total coletado em tubos com EDTA dos pacientes dos grupos controle, HPB e CaP. Logo após era realizada a lise de hemácias utilizando 2 volumes de solução para lise de hemácias (NH₄Cl

114 mM, NH_4HCO_3 1mM) sendo incubada a solução entre 4 - 8°C por 30 min. A solução foi centrifugada por 15 min. a 3000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. A etapa de lise de hemácias foi repetida mais uma vez. Em seguida, realizou-se a lise de leucócitos com 1,8 mL de solução de lise de leucócitos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0), 36 μL de SDS a 10% e 30 μL de Proteinase K (10 mg/mL). A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após a incubação, foi adicionada à solução 0,72 mL de solução saturada de NaCl (6M). A solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante e acrescentavam-se 2 volumes de etanol absoluto (gelado) para precipitar o DNA. O DNA foi retirado e colocado em tubo Eppendorf® contendo 0,9 mL de etanol 70% (gelado) e a solução foi centrifugada por 5 minutos a 12000 xg. Repetiu-se essa etapa por mais duas vezes. Após desprezava-se o sobrenadante e o álcool foi evaporado no ar ambiente, ficando, somente, o pellet de DNA no tubo de 2mL. Na etapa final, o pellet foi ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0), utilizando volumes de 50 a 300 μL para a dissolução, dependendo do tamanho do pellet. A amostra foi aquecida por 5 minutos a uma temperatura de 65°C e, logo então, armazenada a uma temperatura de 4 – 8°C.

Reação de PCR para a amplificação das repetições CAG e GGC

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 50 μL para ambas reações. Para a análise do CAG, 1 μL de DNA genômico foi desnaturado a 96°C por

5 minutos na presença de 20 mM de Tris-HCL pH 8,4 com 50 mM de KCL e 1,5 mM de MgCl₂. Após este pré-aquecimento, 1,25 unidade de Taq DNA polimerase foi adicionada junto com o mesmo tampão Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 μM de primers sense e antisense e 0,2 mM de dNTP mix. As reações de PCR foram realizadas utilizando primers específicos da região polimórfica CAG do AR: sense 5' TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC 3'.

Para a análise do GGC, as reações de PCR foram realizadas utilizando o kit Taq DNA Polimerase com solução-Q (Qiagen®), otimizado para reações de PCR ricas em bases citosina e guanina. As reações foram realizadas com 1 μL de DNA genômico, 0,4 μM de primers sense e antisense e 0,2 mM de dNTP, 5μL de 10x Qiagen PCR Buffer e 10 μL de 5x Q-Solution e 31,75 μL de água. Para o polimorfismo GGC foram utilizados os seguintes primers: sense 5' CACGCTCGCATCAAGCTGGAGAAC 3' marcado com corante fluoresceínico FAM e antisense 5' CACACATCAGGTGCGGTGAAGTCGCTTTCC 3'.

As amplificações foram realizadas utilizando termociclador automático (MJ Research, Waltham, MA,USA) nas seguintes condições: Para CAG, desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; desnaturação de 1 min. a 94°C a cada ciclo; 3 ciclos com temperatura de anelamento de 61°C; 3 ciclos com temperatura de anelamento de 59°C e 25 ciclos com temperatura de anelamento de 55°C; extensão à 72°C de 20 segundos a cada ciclo e extensão final de 72°C por 7 min. Para o GGC, desnaturação de 4 minutos a 94°C; 35 ciclos de desnaturação de 1 min. à 94°C; temperatura de anelamento de 55°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 45 segundos. Extensão final de 72°C por 7 min.

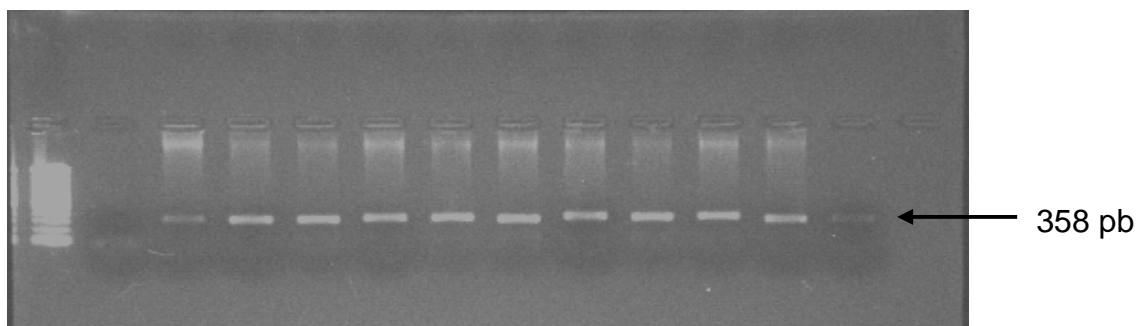


Figura 3 – Amplificação do produto da PCR para o polimorfismo CAG analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Análise dos Polimorfismos CAG e GGC do Receptor de Androgênio

Para cada amostra, o produto da PCR foi diluído em água Milli-Q, 5 ou 10X, dependendo do grau de amplificação das amostras quando visualizadas em gel agarose (1,5%). Logo após, 1 μ L do PCR diluído foi misturado com 10 μ L formamida e 0,3 μ L de um marcador de peso molecular fluorescente 500HD (ROX) (*Size Standard*, Applied Biosystems, Foster City, CA). Após, a solução foi desnaturada à 95°C por 2 minutos, sendo resfriada, logo em seguida, a 0°C por mais dois minutos. Em seguida, as amostras foram retiradas do gelo e transferidas para placa específica, a fim de ser realizada a eletroforese capilar no sequenciador automático ABI 3100 AVANT. A análise do fragmento amplificado foi realizada pelo *software Genemapper* versão 3.5 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)

Extração de RNA

A extração do RNA foi realizada com o reagente Trizol (*Trizol Reagent* 100 mL[®], Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Aproximadamente 100 mg de cada amostra de tecido congelado foi colocado em um tubo plástico de 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL do reagente Trizol para subsequente homogeneização (Omnimix[®]) durante 1 minuto. Após, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos, acrescidas de 0,2 mL de clorofórmio, agitadas em vórtex (*Daiger Vortex – Genie 2*[®], A. Daigger & CO., Inc.) por 15 segundos, incubadas

novamente em temperatura ambiente durante 3 minutos e centrifugadas a 12.000 xg à 4°C por 15 minutos (*Centrifuge 5402*®, Eppendorf). A seguir foi pipetada a fase aquosa de cada amostra para novos tubos plásticos de 2 mL, ao quais foram adicionados 1 mL de isopropanol. Na sequência, as amostras foram incubadas em refrigerador a - 20 °C (*F17 Stock Freezer*®, Prosdócimo) *overnight*.

No dia seguinte cada amostra foi misturada por inversão, centrifugada a 12.000 xg à - 4 °C por 15 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e o precipitado, contendo o RNA, lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. Cada amostra foi então centrifugada a 8.000 xg a - 4°C por 10 minutos.

Novamente o sobrenadante de cada amostra foi desprezado e o precipitado deixado para secar durante 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, de acordo com o volume do precipitado, foi adicionado de 10 a 30 µL de água ultra pura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). As amostras foram então incubadas a 60°C durante 10 minutos e colocadas, em seguida, por 1 minuto no gelo.

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

Quantificação do RNA

Para a quantificação, uma alíquota de 1 µL da solução de RNA de cada amostra foi diluída em 499 µL de água com DEPC e lida em duplicata em um

espectrofotômetro para ácidos nucleicos (*Gene Quant*®, Pharmacia Biotech), 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:

$$[\text{RNA}] = \text{Absorbância}_{260} \times \text{Diluição} \times 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

PCR a partir da Transcrição Reversa (RT-PCR)

Síntese de DNA Complementar (cDNA)

A partir do RNA total extraído, a expressão do RNAm específico para os fatores em estudo foi avaliada indiretamente pela técnica de PCR a partir de transcrição reversa (RT), ou simplesmente, RT-PCR. A síntese do cDNA foi feita a partir de 2 µg do RNA total, utilizando oligonucleotídeo (OligodT) complementar à cauda poli-A característica do RNAm, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. Considerando que a fração do RNAm corresponde a aproximadamente 2 a 3% do RNA total, estima-se que 2 µg de RNA total originam 40 ng de cDNA.

Cada amostra de RNA foi inicialmente desnaturada a 65°C por 5 min. (*PTC-100*®, MJ Research, Inc.) juntamente com 1 µL de dNTPmix (*SuperScript*® *First-Strand*, Invitrogen) e 1 µL de OligodT (*SuperScript*® *First-Strand*, Invitrogen). Em

seguida, a cada amostra foi adicionado 2 µL de 10X PCR Buffer (*SuperScript® First-Strand*, Invitrogen), 4 µL de 25mM MgCl₂ (*SuperScript® First-Strand*, Invitrogen), 2 µL de 0,1M DTT (*SuperScript® First-Strand*, Invitrogen) e 1 µL de Rnase OUT(*SuperScript® First-Strand*, Invitrogen). As amostras foram então incubadas por 2 minutos a 42°C (*PTC-100®*, MJ Research, Inc.). Em seguida foi adicionado 1 µL da enzima transcriptase reversa Superscript-II (*SuperScript® First-Strand®*, Invitrogen) a cada amostra, as quais foram imediatamente incubadas (*PTC-100®*, MJ Research, Inc.) por 50 minutos a 42°C. Após nova desnaturação à 70°C por 15 minutos, cada amostra foi acrescida de 1 µL da enzima Rnase H de *E. coli* (*SuperScript® First-Strand*, Invitrogen) e incubada (*PTC-100®*, MJ Research, Inc.) à 37°C por 20 minutos para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume final de 23 µL de cada amostra, as quais foram armazenadas a -20°C (*F17 Stock Freezer®*, Prosdócimo) até a amplificação por PCR.

qRT-PCR: Quantificação em Tempo Real

Trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência. Entre as variações da técnica disponíveis, optamos pela utilização do corante fluorescente *Sybr Green I* (*Platinum SyberGreen qPCR Supermix UDG 100 reações®*, Invitrogen) que se liga à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1.000 vezes na fluorescência. Como o corante liga-se a qualquer fita dupla de DNA foram realizadas curvas de desnaturação (*melting-Tm*), ou seja, curvas de fluorescência em função da

temperatura. Com isso se consegue a especificidade do produto amplificado, uma vez que a curva de *melting* (T_m) é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos (Figura 4).

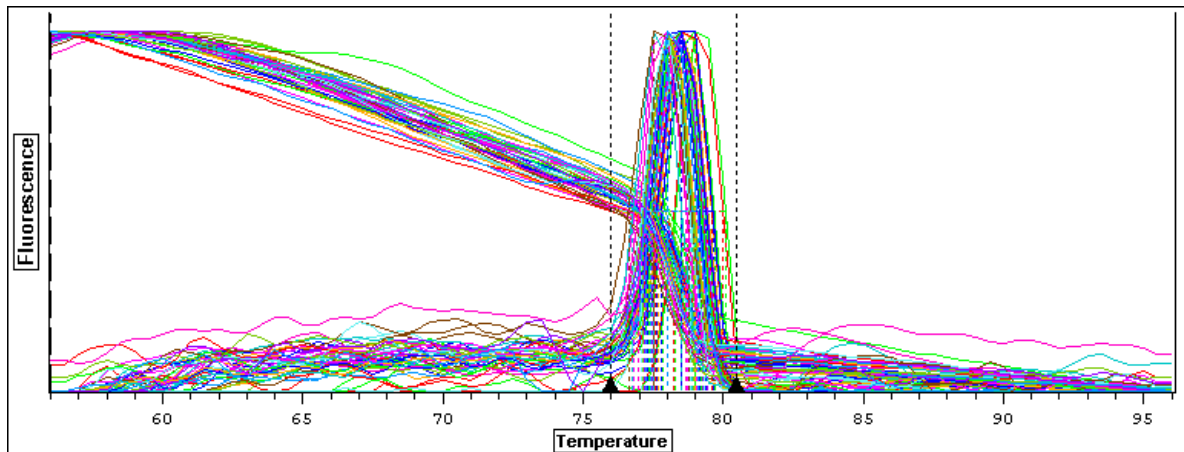


Figura 4: representação da curva de *melting* do gene *B2m* pela PCR em tempo real. O pico em 79°C é específico para o gene.

Curva de Padronização

Para cada gene em estudo foi realizada uma curva de padronização (Figura 5), através das quais foram calculados os valores das amostras. A curva de padronização foi obtida através de reações de RT-PCR que foram feitas a partir de diluições seriadas de um pool de cDNA proveniente de tecidos normais (de 4 ng a 0,0004 ng). As amostras foram diluídas na proporção de 1:10 para a análise dos genes AR, SHP e FHL2. Para a análise do SRC1, GRIP1 e AIB1, as amostras foram diluídas a 1:100. O gene constitutivo B2m foi diluído de acordo com o gene de interesse.

O momento no qual ocorre o aumento exponencial da fluorescência é definido como o C_T (Ciclo Limiar), que é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade de cDNA (ng). Portanto, a curva de padronização é gerada analisando os valores de C_T , num intervalo de 95% de confiança, contra a intensidade da fluorescência do *Sybr green I*, correspondendo ao logaritmo dos ng de cDNA.

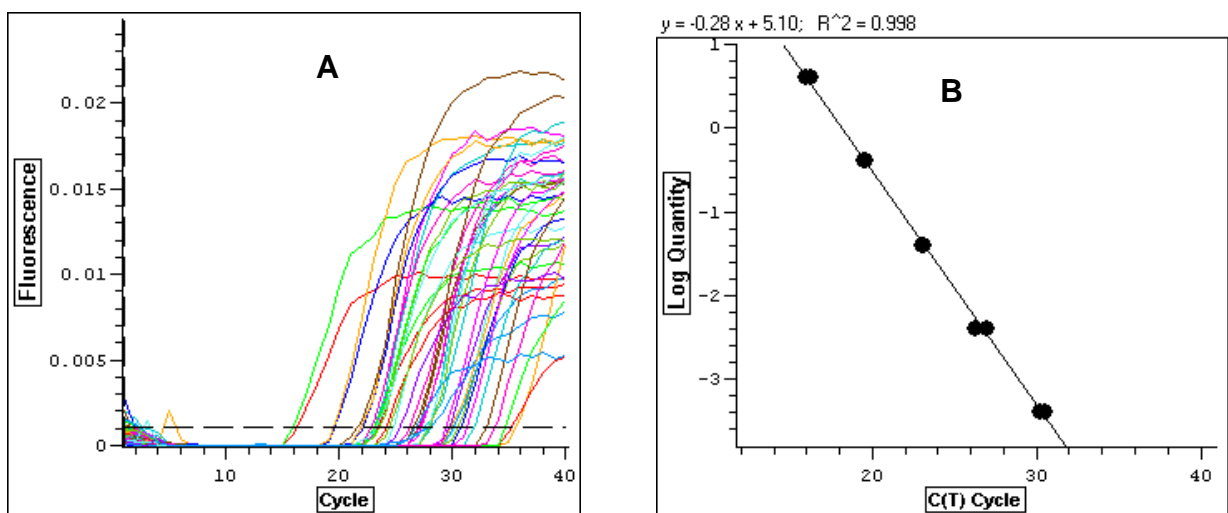


Figura 5: **A.** representação da amplificação do gene *B2m* pela PCR em tempo real. **B.** Representação da curva de diluição para o gene *B2m* para a quantidade de 4, 0,4, 0,04, 0,004, 0,0004 ng de RNAm.

Curva de Normalização

Para evitar variação entre as amostras, uma vez que as mesmas foram obtidas de diferentes indivíduos, foi amplificado simultaneamente ao gene de interesse um gene normalizador. O gene normalizador, também chamado constitutivo, é um gene expresso em níveis constantes em diferentes tecidos de um

organismo, em todos os estágios do desenvolvimento e sem sofrer alteração por tratamentos experimentais ou patologias teciduais. Neste trabalho foi utilizado como gene constitutivo a β_2 -microglobulina (β_2m). A β_2 -microglobulina foi amplificada da mesma forma que os genes de interesse (curva padrão entre 4 ng e 0,0004 de cDNA) (Figura 5). Com o intuito de minimizar as variações de pipetagem foi amplificado o gene normalizador em cada reação de amplificação do gene de interesse.

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas no aparelho *DNA Engine Opticon 2 Real-Time PCR System*[®] (*Bio-Rad*). O volume final das RT-PCR em tempo real foi de 25 μ L por reação, contendo 2 μ L de cDNA diluídos 10X ou 100X, X μ M de *primer sense* e *antisense* (ver quadro 1) , 12,5 μ L de *PlatinunSybrGreen qPCR SuperMix-UDG*[®] (*Invitrogen*) e água ultra pura q.s.p.

As condições das reações foram: 94 °C (2 minutos), 94 °C (50 segundos), Y °C (45 segundos), 72 °C (45 segundos), 45 ciclos com extensão final de 2 minutos à 72 °C e curva de *melting* de 56° à 96° (0,5 °C a cada 10 segundos). Os *primers* usados e a suas temperaturas de anelamento (Y °C) en contram-se abaixo (quadro 1).

Quadro 1: seqüência de pares de base dos *primers sense* e *antisense* dos genes.

Gene	Primer Sense	Primer Antisense	X*	Y* °C
β_2m	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	ACAAGTCTGAATGCTCCACT	0,1	58 ou 60
AR	GCATGGTGAGCAGAGTGCCCTATC	TCCCAGAGTCATCCCTGCTTCAT	0,2	58
SHP	CAGCTATGTGCACCTCATCG	AGCCAGCTCAAAGGTCACAG	0,4	58
FHL2	AAACTCACTGGTGGACAAGC	AGATGAAGCAGGTCTCATGC	0,4	58
SRC1	ATGGTGAGCAGAGGCATGACA	AAACGGTGATGCTCATGTTG	0,2	60
GRIP1	CCCGAATGGCACATACACAGA	TTGGTCGCCATGGACACAT	0,1	60
AIB1	CGTCCTCCATATAACCGAGC	TCATAGGGTCCATTCTGCCG	0,1	60

X* - Concentração dos primers utilizados em nM na reação final.

Y* Temperatura de anelamento para os primers dos genes estudados.

Análise de Proteínas

Extração de Proteínas

Aproximadamente 0,2 gramas de tecido foram homogeneizados individualmente em um homogeneizador por 30 segundos a 7500 rpm, a 4°C na presença de 500 µL de uma solução tampão de lise contendo 50 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM de Na₄P₂O₇ e 2 mM de NaVO₄, 0,1% Triton X-100. O material foi solubilizado por 2 h a 4°C, a pós foi centrifugado durante 10

minutos a 4°C em velocidade de 8000 xg. Foi realizada a dosagem de proteínas do sobrenadante pelo método de Bradford ¹⁴⁷.

Western Blot

Para separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE com uma concentração de poliacrilamida de 6% para a análise de AR, SRC1, GRIP1 e AIB1 e 12% para SHP1 e FHL2. A proteína constitutiva, beta-tubulina, foi utilizada em ambas as concentrações. Aproximadamente 100 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 5 min ¹⁴⁸, e colocadas em cada poço. 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 horas e 30 min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 volts (V). A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular.

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência (Semidry Biorad®) em contato com a membrana de nitrocelulose, com tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 10% metanol, pH 8,3). A transferência foi efetuada de 40min a 1h, com uma diferença de potencial elétrico de 20 a 25V.

As membranas de nitrocelulose foram então incubadas durante 2h em solução bloqueadora (TTBS), contendo 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris,

0,05% Tween 20, pH 7,4, acrescido de 5% de leite em pó (Molico®; Nestlé) para saturar sítios de ligação inespecíficos da membrana de nitrocelulose.

Após o bloqueio, as membranas de NC foram incubadas por, no mínimo, 16 h a 4°C sob agitação constante, com o anticorpo específico para cada proteína (quadro 2) diluído em TTBS e 2,5% de albumina. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS (3 lavagens de 10 minutos cada) e então incubadas com o segundo anticorpo por 2 hora. Após a incubação, as membranas foram lavadas novamente com TBS (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05%, pH 7,4) (3 lavagens de 10 minutos cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimiluminescência (ECL) por 1 min.

Quadro 2. Anticorpos primários utilizados.

Proteína	Peso Molecular	Fabricante	Código	Imagem
Rabbit anti-AR	110kD	Upstate	06-680	
Goat anti-SHP1	26kD	Santa Cruz Biotechnology	sc-15283	
Goat anti-FHL2	32kD	Santa Cruz Biotechnology	sc-23177	
Mouse anti-SRC1	160kD	BD Bioscience	612378	
Mouse anti-GRIP1	160kD	BD Bioscience	610984	
Mouse anti-AIB1	160kD	BD Bioscience	611104	
Mouse anti-beta-Tubulina	50kD	Zymed Laboratories	32-2600	

Os anticorpos secundários utilizados foram: Mouse anti-goat (Santa Cruz; Catálogo: sc-2354), rabbit anti-mouse (Invitrogen; Catálogo: 81-0672) e goat anti-rabbit (Invitrogen; Catálogo: G-21234).

Revelação das Autorradiografias

Após a incubação com solução para quimiluminescência, as membranas de nitrocelulose foram colocadas em contato com o filme fotográfico (*High Performance chemiluminescence Film – Amersham*) de 10 segundos a 2 min. O filme foi revelado no centro de radiologia HCPA (FPM 2100, FUJI X-Ray Processor). A densidade óptica das bandas foi medida por um sistema de processamento de imagem (Image-Master VDS Pharmacia Biotech). A densitometria obtida para cada banda de proteína foi corrigida pela β -tubulina. Os resultados obtidos foram expressos em unidades arbitrárias.

Análise Estatística

Os resultados de expressão gênica e protéica foram avaliados quantitativamente utilizando teste Anova de uma via para análise das amostras com distribuição normal, seguida de post-hoc de Tukey e teste de Kruskal Wallis e de Comparações Múltiplas de Dunn para amostras com distribuição não normal, quando analisados 3 grupos. Teste T ou Mann Whitney, para análise de 2 grupos, quando apropriado. Qui-quadrado, regressão logística binária para cálculo de chance (HR – hazard ratio). Teste de Wilcoxon para amostras pareadas com distribuição não normal. Foi considerado o nível de significância de $P < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando-se o processador de dados SPSS 16.0 (*Statistical Packages for the Social Sciences 16.0*).

Considerações Éticas

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.

Não foi oferecido aconselhamento genético, uma vez que, até o momento, não existem evidências para que se mude o manejo dos pacientes de acordo com as variantes dos polimorfismos ou dos genes estudados, e nem para que se faça alguma abordagem diagnóstica diferente para as pessoas saudáveis que apresentem diferença no número dos polimorfismos. A fase de estudo foi verificar se há um risco associado com o desenvolvimento de HPB ou de câncer de próstata. Não existem estratégias específicas para prevenção ou para abordagem especial dos pacientes de acordo com a variabilidade dos polimorfismos ou diferente expressão dos genes estudados.

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS), tendo sido aprovado com o n°07-533.

Locais de Realização do Projeto

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral , instalado no Departamento de Fisiologia, UFRGS, que dispõe da infra-estrutura adequada para a execução dos procedimentos para análise molecular e no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, instalado no Centro de Pesquisa no HCPA, que dispõe da infra-estrutura para a execução dos procedimentos para a análise protéica.

Fontes de Financiamento

Este projeto contou com financiamento parcial pela FAPERGS, projeto nº 04\1313.7, FIPE-HCPA e CNPq.

RESULTADOS (1ª parte)

Para a análise do polimorfismo CAG e GGC do exon 1 do AR, o DNA genômico de 130 CaP, 126 HPB e 88 controles foram examinados. As principais características da população estudada estão descritas na tabela 1. As médias de idade para os grupos foram $63,46 \pm 7,03$ para CaP, $62,84 \pm 9,15$ para HPB e $56,68 \pm 8,08$ para os controles, variando de 46 a 75 anos, 41 a 82 anos e 41 a 75 anos, respectivamente. Os pacientes do grupo controle são mais jovens que os grupos CaP e HPB ($p < 0,001$), mas estes não são diferentes entre si ($p = 0,823$). Houve a predominância de caucasianos nos grupos avaliados (83,8 % CaP, 89,7 HPB e 82,3% controles).

A mediana da dosagem sérica de PSA foi de 7,16 (5,66 – 10,64) ng/mL no grupo CaP, 1,47 (0,69 – 3,94) ng/mL no grupo HPB e 0,76 (0,55 – 1,05) ng/mL no grupo controle. Os níveis de PSA foram maiores no grupo CaP do que no grupo HPB ($p < 0,001$). Não houve diferença nas concentrações de PSA entre os grupos HPB e controle ($p = 0,566$) (Tabela 1).

O volume prostático foi de 35,30 (28,20 – 44,92) cm³ no grupo CaP, 35,68 (30,00 – 49,00) cm³ no grupo HPB e 20,00 (14,38 – 23,94) cm³ no grupo controle. O volume prostático foi maior nos grupos HPB e CaP em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), não diferindo entre eles ($p = 0,240$) (Tabela 1).

Tabela 1. Principais características da população do estudo do polimorfismo CAG e GGC (n=344).

	CaP (n=130)	HPB (n=126)	Controles (n=88)
Idade (anos) ^a			
Média ± DP	63,46 ± 7,03	62,84 ± 9,15	56,68 ± 8,08
Variação	46 - 75	41 - 82	41 - 75
Raça (caucasianos) ^a	109 (83,8%)	113 (89,7%)	73 (82,3%)
Testosterona Total (ng/mL)	3,81 ± 1,35	4,26 ± 1,45	4,78 ± 1,29
Testosterona Livre (ng/dL)	7,81 ± 2,83	8,30 ± 3,30	8,93 ± 2,96
PSA (ng/mL) ^b	7,16 (5,66 – 10,64)	1,47 (0,69 – 3,94)	0,76 (0,55 – 1,05)
Volume (cm ³) ^b	35,30 (28,20 – 44,92)	35,68 (30,00 – 49,00)	20,00 (14,38 – 23,94)
Repetições CAG			
Média ± DP	21,85 ± 3,24	21,62 ± 2,84	22,11 ± 2,89
Mediana	21,5	21	21,5
Variação	13 - 31	13 - 31	16 - 30
Repetições GGC			
Média ± DP	18,17 ± 2,07	18,16 ± 1,88	17,92 ± 1,43
Mediana	18	18,5	18
Variação	6 - 22	12 - 23	13 - 21
Estadiamento Tumoral ^{a,c}			
T2	63 (57,3%)		
T3+T4 ^d	47 (42,7%)		
Escore de Gleason ^{a,c}			
(Gleason = 6 e 7(3+4))	90 (73,2%)		
(Gleason = 7(4+3) e ≥ 8)	33 (26,8%)		

Valores expressos como ^anúmero de casos e (%), ^bmediana e percentis 25/75.

^cO estadiamento tumoral e o escore de Gleason não foram possíveis de serem obtidos em 10 pacientes (7.7%) e 7 pacientes (5.4), respectivamente.

^dDois pacientes possuem estadiamento tumoral T4.

A média do número de repetições CAG e GGC do éxon 1 do AR foi de $21,85 \pm 3,24$ (variando de 13 - 31) e $18,17 \pm 2,07$ (variando de 6 - 22) no grupo CaP, $21,62 \pm 2,84$ (variando de 13 - 31) e $18,16 \pm 1,88$ (variando de 12 - 23) no grupo HPB e $22,11 \pm 2,89$ (variando de 16 - 30) e $17,92 \pm 1,43$ (variando de 13 - 21), no grupo controle, respectivamente (tabela 1). Não foi encontrada diferença significativa entre as medias de repetições CAG e GGC entre casos e controles. A frequência do número de repetições do polimorfismo CAG e GGC estão mostradas nas figuras 6 e 7, respectivamente.

Baseado no valor das medianas das repetições do grupo controle, a população foi classificada dicotomicamente pelo número de repetições CAG e GGC em diferentes subgrupos, $CAG \leq 22$ e $CAG > 22$ e $GGC \leq 18$ ou $GGC > 18$. Também foi analisado $GGC \leq 19$ e $GGC > 19$. Os grupos CaP e HPB apresentaram uma alta frequência de pacientes com o genótipo $GGC > 18$ e 19 repetições. Nesta análise, 67% e 67,4% dos pacientes com $GGC > 18$, eram do grupo CaP ($p=0,023$) e HPB ($p=0,013$), respectivamente, enquanto 78% e 72,7% dos pacientes que apresentaram $GGC > 19$ eram do grupo CaP ($p=0,004$) e HPB ($p=0,049$) (tabela 2).

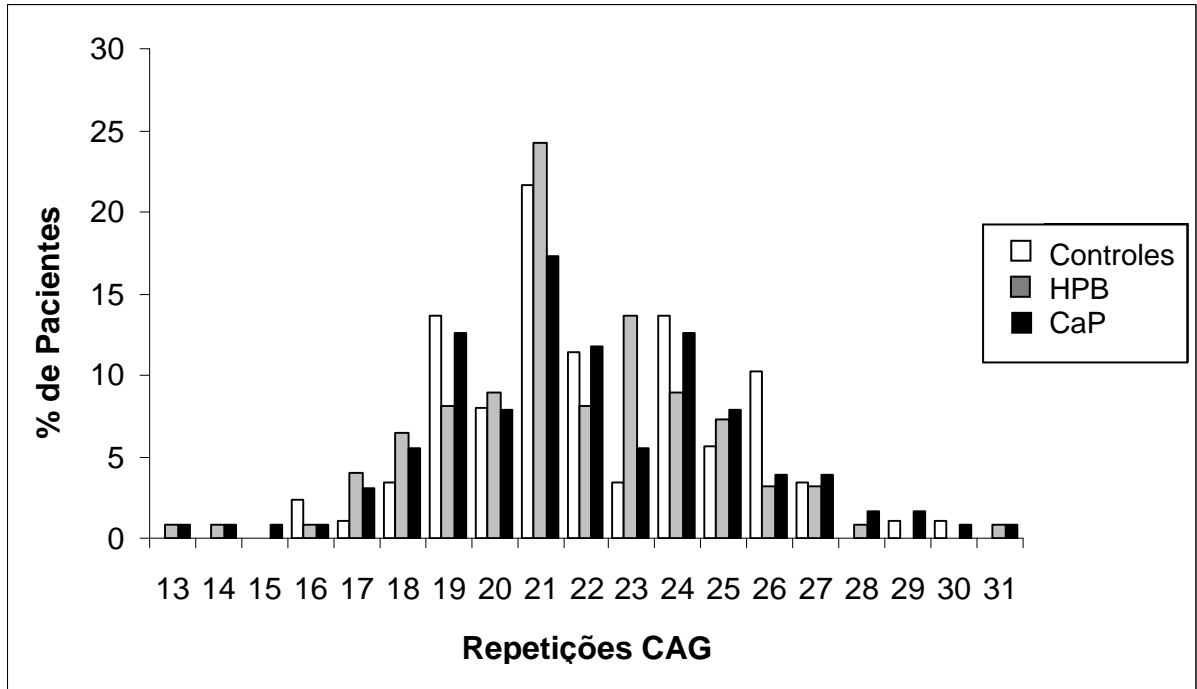


Fig 6. Distribuição da frequência das repetições CAG em controles, HPB e CaP.

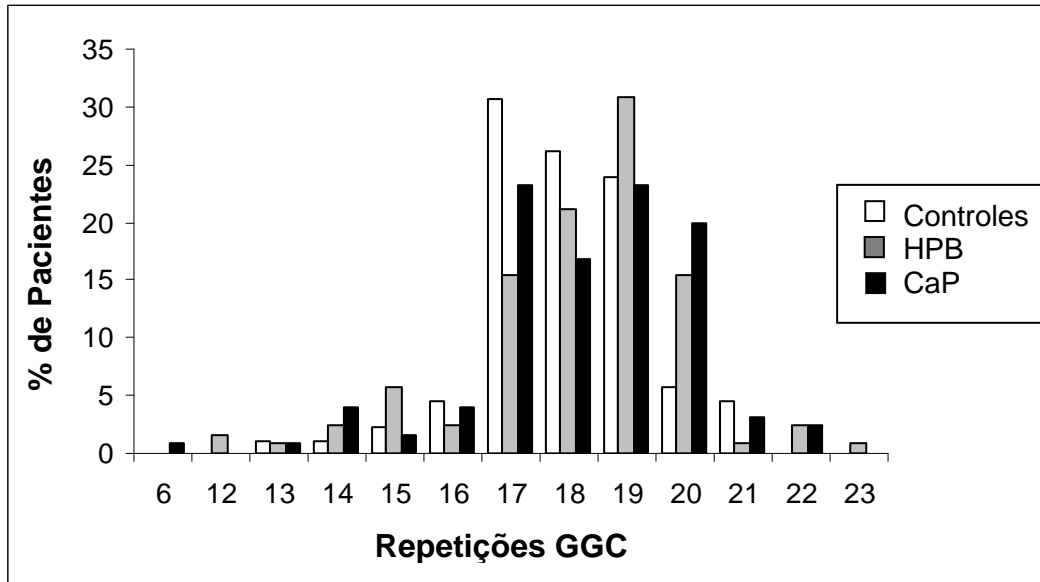


Fig 7. Distribuição da frequência das repetições GGC em controles, HPB e CaP.

Tabela 2. Distribuição da frequência dos genótipos CAG-22, GGC-18, GGC-19 entre CaP, HPB e controles.

Repetições	N	CaP[#]	Controles[#]	p*
CAG ≤ 22	132	78 (59,1 %)	54 (40,9 %)	0,553
CAG > 22	83	49 (59 %)	34 (41 %)	
GGC ≤ 18	122	64 (52,5 %)	58 (47,5 %)	0,023
GGC > 18	91	61 (67 %)	30 (33 %)	
GGC ≤ 19	172	93 (54,1 %)	79 (45,9 %)	0,004
GGC > 19	41	32 (78 %)	9 (22 %)	

	N	HPB[#]	Controles[#]	p*
CAG ≤ 22	131	77 (58,8 %)	54 (41,2 %)	0,513
CAG > 22	81	47 (58 %)	34 (42 %)	
GGC ≤ 18	119	61 (51,2 %)	58 (48,8 %)	0,013
GGC > 18	92	62 (67,4 %)	30 (32,6 %)	
GGC ≤ 19	178	99 (55,6 %)	79 (44,4 %)	0,049
GGC > 19	33	24 (72,7 %)	9 (27,3 %)	

* Valores de p obtido usando o teste qui-quadrado de Pearson 2x2.

Número de pacientes e percentual.

Sabendo que a idade é um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento de CaP e HPB, nós avaliamos a chance dos genótipos descritos acima desenvolverem essas patologias usando a análise de regressão logística, considerando a idade como uma variável contínua neste modelo de regressão (tabela 3). A chance de desenvolver CaP nos indivíduos que possuem um longo alelo para o polimorfismo GGC (GGC > 18 e GGC >19) são de 1,96 (CI 95% 1,05 – 3,67) e 3,30 (CI 95% 1,38 – 7,87) vezes maior do que o alelo curto (GGC ≤ 18 e GGC ≤ 19) (p=0,035 e p=0,007), respectivamente. A chance de desenvolver HPB

em indivíduos que possuem o alelo longo para o polimorfismo GGC (GGC > 18) é 2,33 (CI95% 1,254 – 4,433) vezes maior (p=0,008) do que o alelo curto (GGC ≤ 18).

Tabela 3. Análise do risco de desenvolver CaP e HPB dos genótipos CAG-22, GGC-18, GGC-19.

Repetições	N	CaP HR [#]	CI (95%)	p*
CAG ≤ 22	132			
CAG > 22	83	0,905	0,491 – 1,669	0,75
GGC ≤ 18	122			
GGC > 18	91	1,963	1,050 – 3,671	0,035
GGC ≤ 19	172			
GGC > 19	41	3,300	1,385 – 7,874	0,007
	N	HPB HR [#]	CI (95%)	p*
CAG ≤ 22	128			
CAG > 22	79	0,891	0,488 – 1,627	0,708
GGC ≤ 18	118			
GGC > 18	88	2,334	1,254 – 4,344	0,008
GGC ≤ 19	174			
GGC > 19	32	2,134	0,894 – 5,096	0,088

*Valores obtidos usando a regressão logística binária entre CaP e controles e HPB e controles, corrigido pela idade.

[#]HR - *Hazard Ratio* (Razão de Chances)

A média da concentração de testosterona total foi de $3,81 \pm 1,35$ ng/mL para o grupo CaP, $4,26 \pm 1,45$ ng/mL para o grupo HPB e $4,78 \pm 1,29$ ng/mL para o grupo controle (Tabela 1). A concentração de testosterona total foi menor no grupo HPB (p=0.031) e CaP (p<0.001), comparado com o grupo controle. Não houve diferença

das concentrações de testosterona total entre os grupos HPB e CaP ($p=0,071$). A média dos níveis de testosterona livre foi de $8,93 \pm 2,96$ ng/dL no grupo controle, $8,30 \pm 3,30$ ng/dL no grupo HPB e $7,81 \pm 2,83$ ng/dL no grupo CaP (Tabela 1). Nos grupos HPB ($p=0,574$) e CaP ($p=0,187$) os níveis de testosterona livre não foram diferentes do grupo controle e entre eles. Não foi encontrada diferença nos níveis de testosterona total e livre quando comparados com o escore de Gleason e o estágio tumoral (dado não mostrado).

A população estudada foi classificada dicotomicamente entre níveis de testosterona < 4 e ≥ 4 ng/mL. Nesta análise, dos pacientes com níveis de testosterona total < 4 ng/mL, 60,3% foram do grupo CaP ($p<0,001$) e 66,3% do grupo HPB ($p<0,001$) comparado com o grupo controle (Tabela 4). Quando a testosterona total foi analisada entre todos os pacientes divididos em $GGC \leq 19$ e $GGC > 19$, o nível de testosterona total no grupo com $GGC \leq 19$ foi de $4,36 \pm 1,45$ e no grupo $GGC > 19$ foi de $3,73 \pm 1,24$ ($p=0,001$) (dado não mostrado em tabela).

Tabela 4. Distribuição da frequência dos níveis de testosterona total < 4 e ≥ 4 ng/mL entre CaP, HPB e controles.

Níveis de Testosterona Total	N	CaP[#]	Controles[#]	p*
Testosterona < 4	68	41 (60,3 %)	27 (39,7 %)	< 0,001
Testosterona ≥ 4	86	26 (30,2 %)	60 (69,8 %)	
	N	HPB[#]	Controles[#]	p*
Testosterona < 4	80	53 (66,3 %)	27 (33,7 %)	< 0,001
Testosterona ≥ 4	101	41 (40,6 %)	60 (59,4 %)	

* Valores de p obtido usando o teste qui-quadrado de Pearson 2x2.

Número de pacientes e percentual.

Analizamos também a chance dos níveis de testosterona total descritos acima em desenvolver estas patologias usando a análise de regressão nominal, considerando a idade como a variável contínua. A chance de desenvolver CaP nos pacientes que possuem os níveis de testosterona < 4 ng/mL foi 2,80 (HR 2,799, CI95% 1,362 – 5,754) vezes maior (p=0,005) do que os que possuem os níveis ≥ 4ng/mL. A chance de desenvolver HPB nos pacientes que possuem os níveis < 4 ng/mL foi 2,78 vezes maior (p=0,002) do que os que possuem níveis ≥ 4ng/mL (HR 2,786, CI95% 1,470 – 5,280) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise do risco de desenvolver CaP e HPB pelos níveis de testosterona total < 4 e ≥ 4 ng/mL.

Níveis de Testosterona Total	N	CaP HR[#]	CI (95%)	p*
Testosterona < 4	68	2,799	1,362 - 5,754	0,005
Testosterona ≥ 4	86			
	N	HPB HR[#]	CI (95%)	p*
Testosterona < 4	80	2,786	1,470 - 5,280	0,002
Testosterona ≥ 4	101			

* Valores obtidos usando a regressão logística binária entre CaP e controles e HPB e controles, corrigido pela idade.

[#]HR - *Hazard Ratio* (Razão de Chances)

RESULTADOS (2ª parte)

Análise da Expressão Gênica

Para a análise da expressão gênica do AR e de seus corretores, foram utilizadas amostras de tecido prostático de 36 pacientes com HPB, 66 CaP e 33 ZPU. O grupo ZPU provém do tecido da zona periuretral daqueles pacientes submetidos a prostatovesiectomia por diagnóstico de carcinoma prostático. Somente foram utilizados os tecidos em que não havia alterações morfológicas microscópicas quando coradas com hematoxilina-eosina. O grupo ZPU possui um tamanho amostral menor do que o grupo CaP pelas seguintes razões: em 7 espécimes cirúrgicos o câncer estava presente em toda a próstata e 17 amostras apresentaram alterações morfológicas na coloração de hematoxilina-eosina, sendo 9 com alterações malignas, 2 com neoplasia intra-epitelial (PIN) e 6 com proliferação atípica de pequenos ácinos (ASAP). Em 9 amostras, as reações da B2m não funcionaram devido à pouca quantidade de RNA extraída, não havendo mais tecido para posterior extração. As principais características da população estudada podem ser vistas na tabela 6.

As médias de idade para os grupos foram $65,62 \pm 7,86$ para HPB, $63,56 \pm 7,25$ para CaP, variando de 47 a 82 anos e 46 a 74, respectivamente. Não houve diferença de idade entre os grupos ($p=0,208$). Quanto à raça, houve a predominância de caucasianos (97,2 % HPB e 92,4% CaP).

A mediana da dosagem sérica de PSA foi de 4,00 (1,91 – 6,47) ng/mL no grupo HPB e 7,37 (5,20 – 11,21) ng/mL no grupo CaP. Os níveis de PSA foram maiores no grupo CaP em relação ao HPB ($p < 0,001$).

O volume prostático foi de 40 (30 – 57) cm³ no grupo HPB e 39 (30 – 52) cm³ no grupo CaP. Não houve diferença entre o volume da próstata do grupo HPB e CaP ($p = 0,472$).

Tabela 6. Principais características da população estudada (n=102).

	HPB (n=36)	CaP (n=66)
Idade (anos) ^a		
Média ± DP	65,62 ± 7,86	63,56 ± 7,25
Variação	47 - 82	46 - 74
Raça (caucasianos) ^a	35 (97,2%)	61 (92,4%)
PSA (ng/mL) ^b	4,00 (1,91 – 6,47)	7,37 (5,2 – 11,21)
Volume (cm ³) ^b	40 (30 – 57)	39 (30 – 52)
Repetições CAG		
Média ± DP	20,71 ± 3,07	22,43 ± 3,31
Mediana	21	22
Variação	13 - 27	13 - 31
Repetições GGC		
Média ± DP	18,66 ± 2.23	19,02 ± 1.59
Mediana	19	19
Variação	12 – 23	14 - 22
Estadiamento Tumoral ^{a,c}		
T2		37 (59,7%)
T3+T4 ^d		25 (40,3%)
Escore de Gleason ^{a,c}		
(Gleason = 6 e 7(3+3))		43 (68,3%)
(Gleason = 7(4+3) e ≥ 8)		20 (31,7%)

Valores expressos como ^anúmero de casos e (%), ^bmediana e percentis 25/75.

^cO estadiamento tumoral e o escore de Gleason não foram possíveis de serem obtidos para 4 (9.1%) e 3 (4.5%) pacientes

^dUm paciente possui estadiamento tumoral T4.

A média de repetições CAG e GGC foi de 20,71 ± 3,07 (variando de 13 - 27) e 18,66 ± 2,23 (variando de 12 – 23), respectivamente no grupo HPB e 22,43 ± 3,31 (variando de 13 - 31) e 19,02 ± 1,59 (variando de 14 – 22) no grupo CaP. Nesta

segunda parte do trabalho, a análise do polimorfismo CAG e GGC foi somente utilizado para correlacionar com as expressões dos genes em estudo. Para a análise da média de repetições CAG e GGC, os grupos desta segunda parte foram associados aos demais que compõem a primeira parte dos resultados.

A expressão tecidual de RNAm do AR e de seus corre reguladores foi quantificada através de qRT-PCR. A expressão gênica [dada em mediana [(percentil 25% - 75%) unidades arbitrárias] do AR foi de 0,25 (0,06 – 0,85) no grupo HPB, 0,50 (0,25 – 1,43) no grupo CaP e 1,09 (0,62 – 1,75) no grupo ZPU. A expressão do AR foi maior no Grupo CaP ($p=0.033$) e ZPU ($p<0.001$) em relação ao grupo HPB (Figura 8).

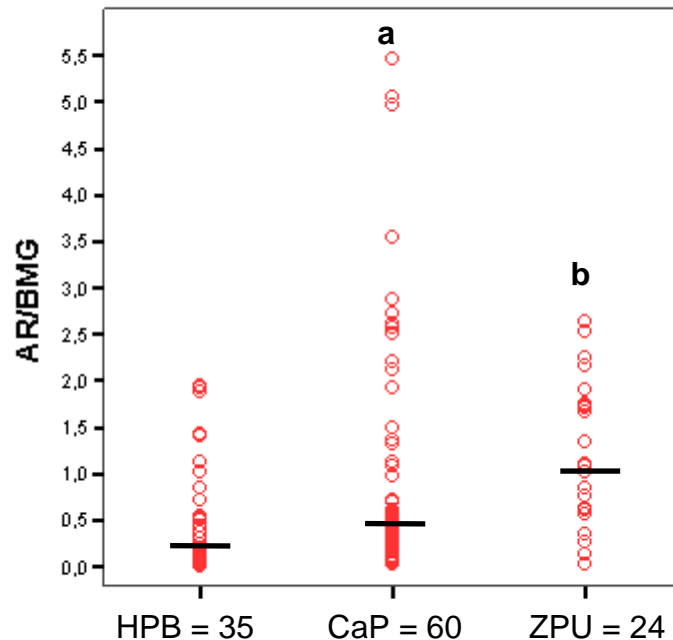


Figura 8. Expressão gênica do AR. Expressão gênica de AR em tecido prostático de pacientes com HPB 0,25 (0,06 - 0,85), CaP 0,50 (0,25 - 1,43), ZPU 1,09 (0,62 - 1,75) , representada como mediana (percentil 25 -75), unidades arbitrárias. a: $p=0,033$ e b: $p<0,001$, em relação ao grupo HPB.

O co-repressor do AR, SHP1, apresentou uma expressão de 8,3 (1,6 – 17,4) no grupo HPB, 25,6 (4,4 – 65,7) no grupo CaP e 6,5 (0,9 – 62,7) no grupo ZPU. Com um $p=0,039$, o grupo CaP teve expressão de SHP maior em relação ao grupo HPB (Figura 9).

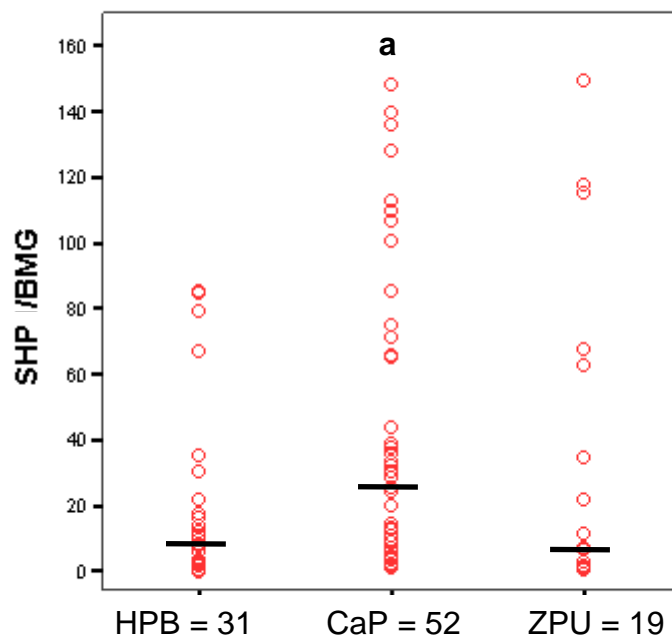


Figura 9. Expressão gênica de SHP. Expressão gênica de SHP em tecido prostático de pacientes com HPB 8,3 (1,6 – 17,4), CaP 25,6 (4,4 – 65,7), ZPU 6,5 (0,9 – 62,7) , representada como mediana (percentil 25 - 75), unidades arbitrárias. a: $p=0,039$ em relação ao grupo HPB.

A expressão gênica do coativador do AR, FHL2, foi maior no grupo ZPU, 2,04 (1,52 – 3,11) em relação ao grupo HPB, 0,80 (0,18 – 1,95) e CaP, 0,91 (0,38 – 2,32), $p=0,007$ e $p<0,001$, respectivamente (Figura 10).

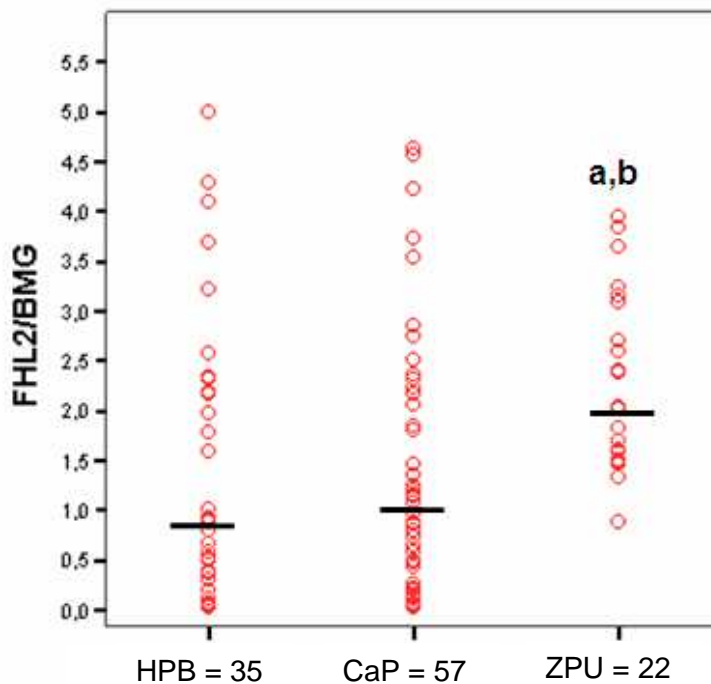


Figura 10 - Expressão gênica de FHL2 em tecido prostático de pacientes com HPB 0,80 (0,18 – 1,95), CaP 0,91 (0,38 – 2,32), ZPU 2,04 (1,52 – 3,11) , representada como mediana (percentil 25 - 75), unidades arbitrárias. a: $p=0,007$ e b: $p<0,001$, em comparação ao grupo HPB e CaP, respectivamente.

O complexo coativador do AR, p160, também apresentou diferença de expressão gênica nos grupos estudados. A expressão gênica de SRC1 em tecido prostático de pacientes com HPB foi de 1,35 (1,00 – 2,12), no grupo CaP foi de 1,60 (1,02 – 2,18) e no grupo ZPU foi de 2,27 (1,50 – 2,69). O grupo ZPU apresentou

expressão gênica maior em relação ao grupo HPB ($p=0,005$) e CaP ($p=0,029$) (Figura 11). A expressão de GRIP1 foi de 0,83 (0,36 – 1,18) no grupo HPB, 1,44 (0,78 – 2,55) no grupo CaP e 1,58 (0,90 – 2,03) no grupo ZPU. Os grupos CaP ($<0,001$) e ZPU ($p=0,006$), apresentaram expressão gênica maior em relação ao grupo HPB (Figura 12). Por fim, a expressão gênica de AIB1 no grupo HPB foi de 0,65 (0,49 – 1,23), no grupo CaP foi de 1,12 (0,56 – 1,85) e no grupo ZPU foi de 1,58 (0,90 – 2,03). A expressão gênica foi maior nos grupos CaP ($p=0,030$) e ZPU ($p=0,001$) em relação ao grupo HPB (Figura 13).

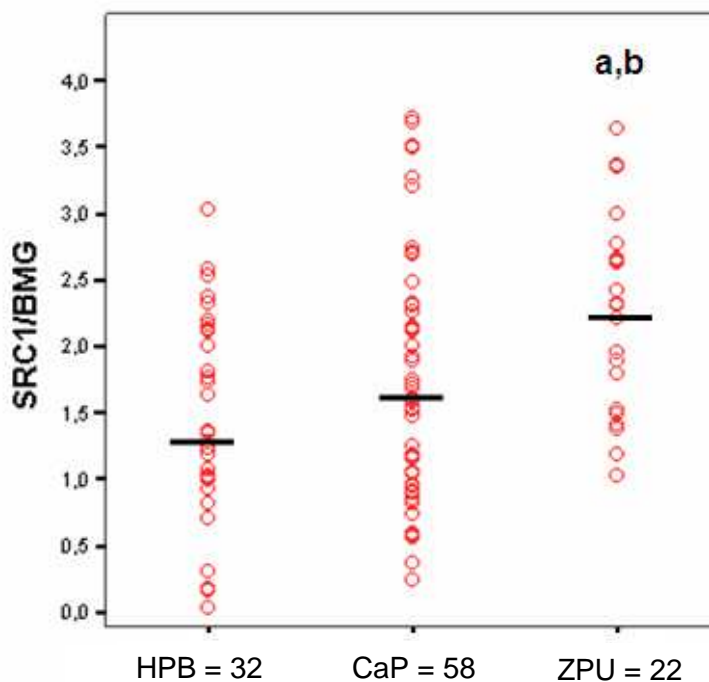


Figura 11. Expressão gênica de SRC1 - Expressão gênica de SRC1 em tecido prostático de pacientes com HPB 1,35 (1,00 – 2,12), CaP 1,60 (1,02 – 2,18), ZPU 2,27 (1,50 – 2,69) , representada como mediana (percentil 25 - 75), unidades arbitrárias. a: $p=0,005$ e b: $p=0,029$, em comparação ao grupo HPB e CaP, respectivamente.

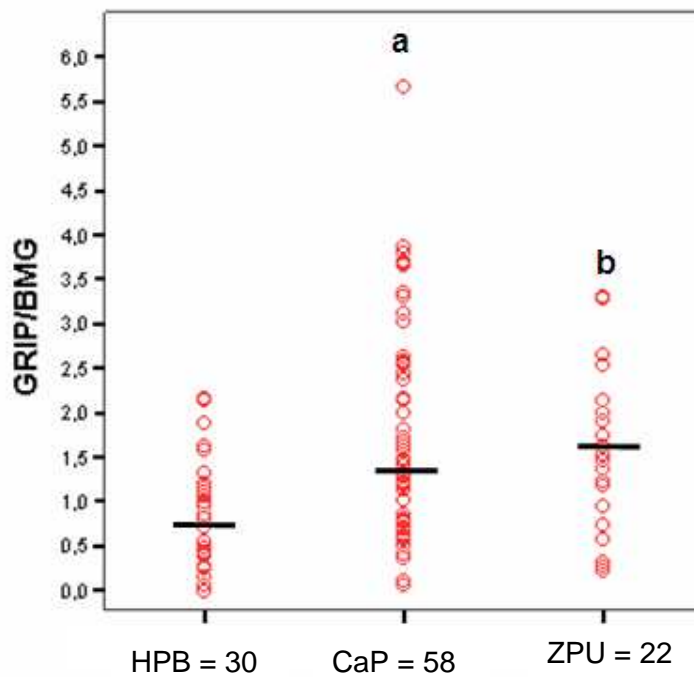


Figura 12. Expressão gênica de GRP1. Expressão gênica de GRIP1 em tecido prostático de pacientes com HPB 0,83 (0,36 – 1,18), CaP 1,44 (0,78 – 2,55), ZPU 1,58 (0,90 – 2,03), representada como mediana (percentil 25 - 75), unidades arbitrárias. a: $p < 0,001$ e b: $p = 0,006$, em relação ao grupo HPB.

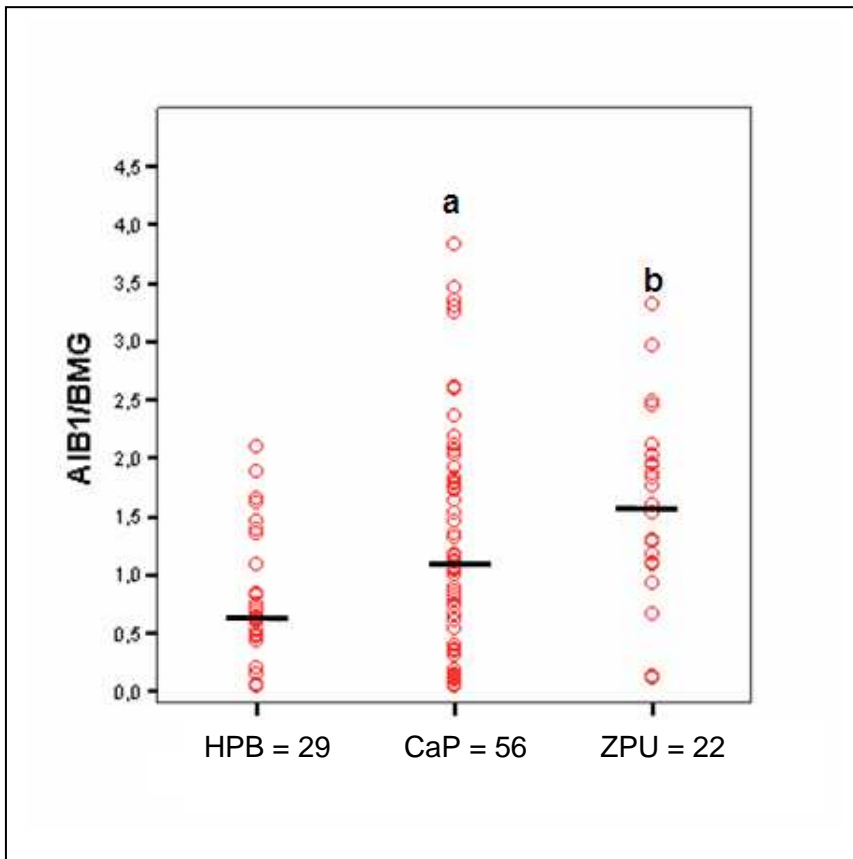


Figura 13. Expressão gênica de AIB1. Expressão gênica de AIB1 em tecido prostático de pacientes com HPB 0,65 (0,49 – 1,23), CaP 1,12 (0,56 – 1,85), ZPU 1,58 (0,90 – 2,03), representada como mediana (percentil 25 - 75), unidades arbitrárias. a: $p=0,030$ e b: $p=0,001$, em relação ao grupo HPB.

A expressão dos genes em estudo foi avaliada de forma pareada, pelo teste de wilcoxon, entre os tecidos de CaP e ZPU. Somente o gene FHL2 apresentou expressão maior no tecido ZPU em relação ao tecido CaP ($p=0.012$). (Dado não mostrado).

Análise da Expressão Protéica

A expressão protéica de AR em tecido prostático de pacientes com HPB foi de $1,14 \pm 0,45$, para CaP $1,05 \pm 0,51$ e para pacientes do grupo ZPU foi de $0,88 \pm 0,29$. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 14).

A expressão da proteína co-repressora do AR, SHP, foi de $0,96 \pm 0,29$ no grupo HPB, $0,91 \pm 0,22$ no grupo CaP e $1,34 \pm 0,62$ no grupo ZPU. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 15).

A expressão do coativador FHL2 no grupo HPB, CaP e ZPU, foi de $0,80 \pm 0,14$, $1,36 \pm 0,10$ e $0,82 \pm 0,05$, respectivamente. O grupo CaP apresentou uma expressão protéica maior em relação ao grupo HPB ($p=0,023$). Apesar de o grupo CaP apresentar aparentemente uma maior expressão que o grupo ZPU, não houve diferença significativa ($p=0,056$) (Figura 16).

A expressão protéica das proteínas do complexo p160 foram semelhantes entre os grupos estudados ($p>0,05$). A expressão de SRC1 no grupo HPB foi de $0,85 \pm 0,14$ e no grupo CaP foi de $1,34 \pm 0,38$ e no grupo ZPU foi de $0,85 \pm 0,08$. A

expressão de GRIP1 no grupo HPB foi de $0,93 \pm 0,14$ e no grupo CaP foi de $1,24 \pm 0,38$ e no grupo ZPU foi de $0,93 \pm 0,24$. Por fim a expressão de AIB1 no grupo HPB foi de $1,02 \pm 0,34$ e no grupo CaP foi de $1,32 \pm 0,26$ e no grupo ZPU foi de $1,08 \pm 0,35$ (Figuras 17, 18 e 19, respectivamente).

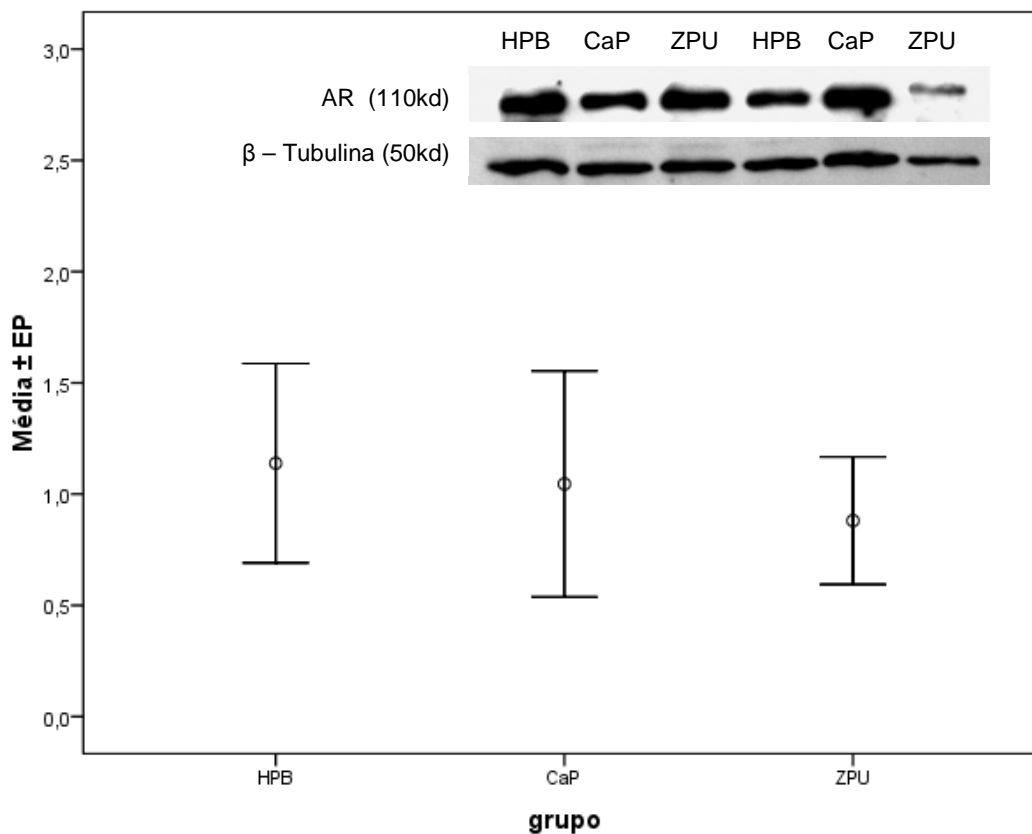


Figura 14. Expressão protéica de AR. Expressão protéica de AR em tecido prostático de pacientes com HPB $1,14 \pm 0,45$, CaP $1,05 \pm 0,51$ e ZPU $0,88 \pm 0,29$, representada como média \pm erro padrão (EP), unidades arbitrárias. $p > 0,05$.

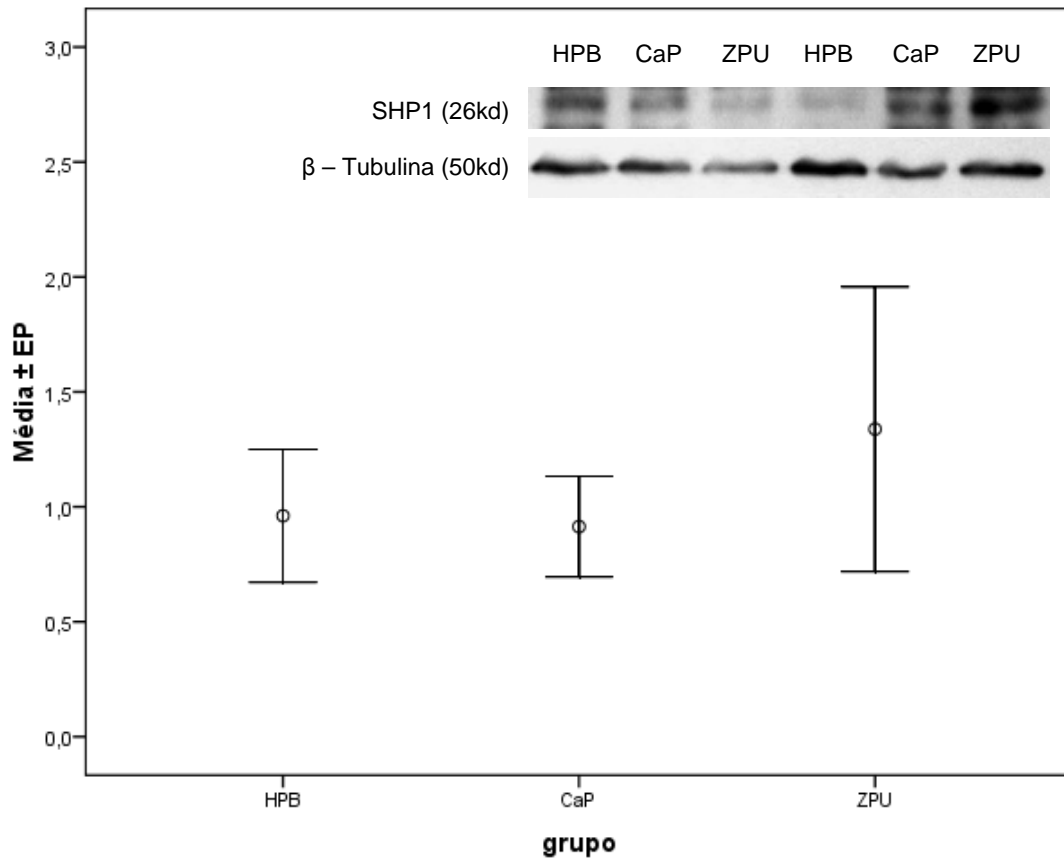


Figura 15. Expressão protéica de SHP. Expressão protéica de SHP em tecido prostático de pacientes com HPB $0,96 \pm 0,29$, CaP $0,91 \pm 0,22$ e ZPU $1,34 \pm 0,62$, representada como média \pm erro padrão (EP), unidades arbitrárias. $p > 0,05$.

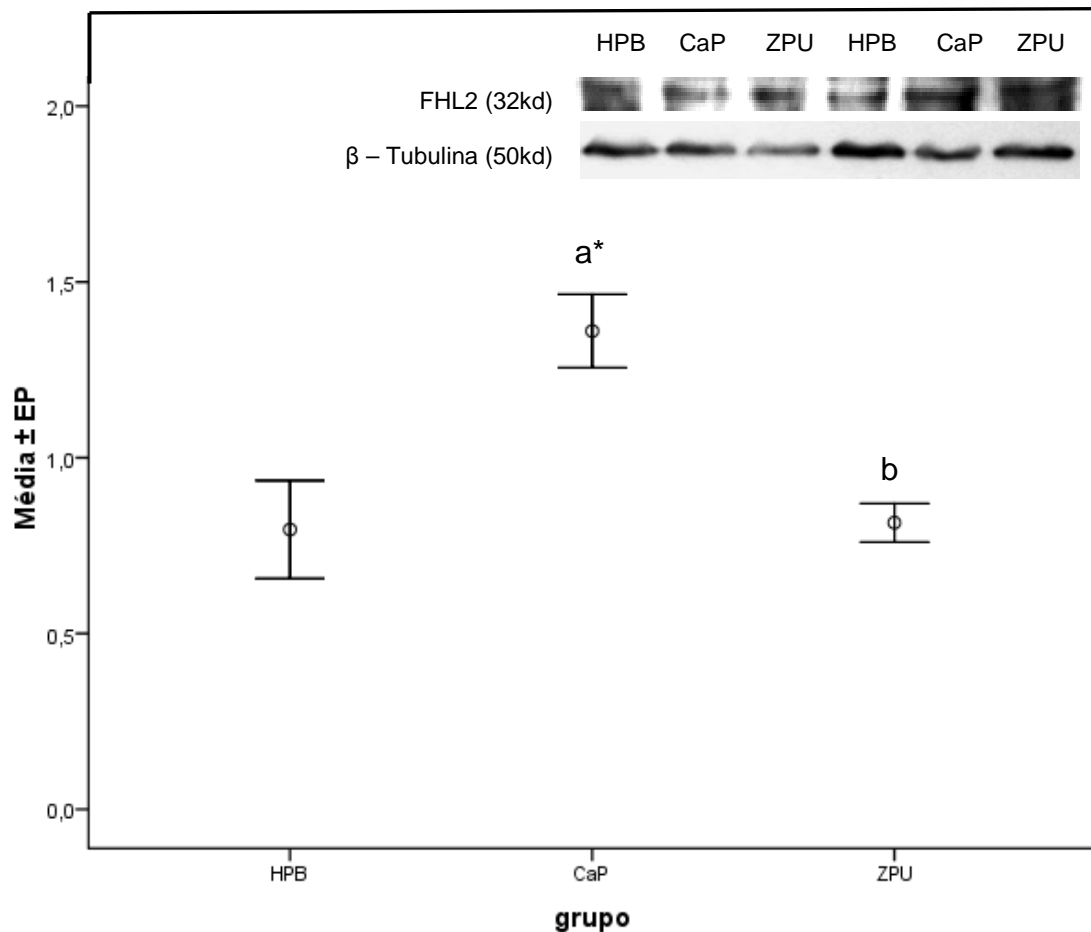


Figura 16. Expressão protéica de FHL2. Expressão protéica de FHL2 em tecido prostático de pacientes com HPB $0,80 \pm 0,14$, CaP $1,36 \pm 0,10$ e ZPU $0,82 \pm 0,05$, representada como média \pm erro padrão (EP), unidades arbitrárias. a*, $p=0,023$ em relação ao grupo HPB; b, $p=0,056$ em relação ao grupo CaP.

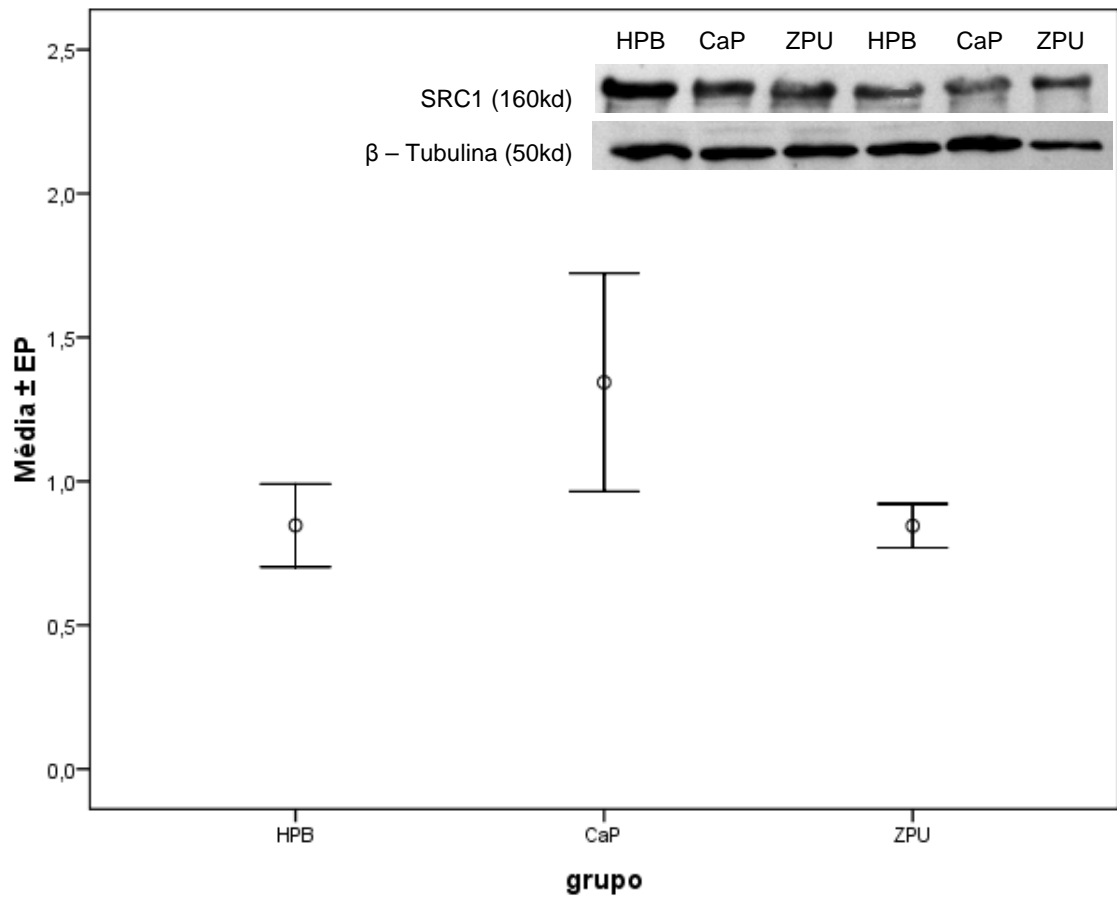


Figura 17. Expressão protéica de SRC1. Expressão protéica de SRC1 em tecido prostático de pacientes com HPB 0,85 \pm 0,14, CaP 1,34 \pm 0,38 e ZPU 0,85 \pm 0,08, representada como média \pm erro padrão (EP), unidades arbitrárias.

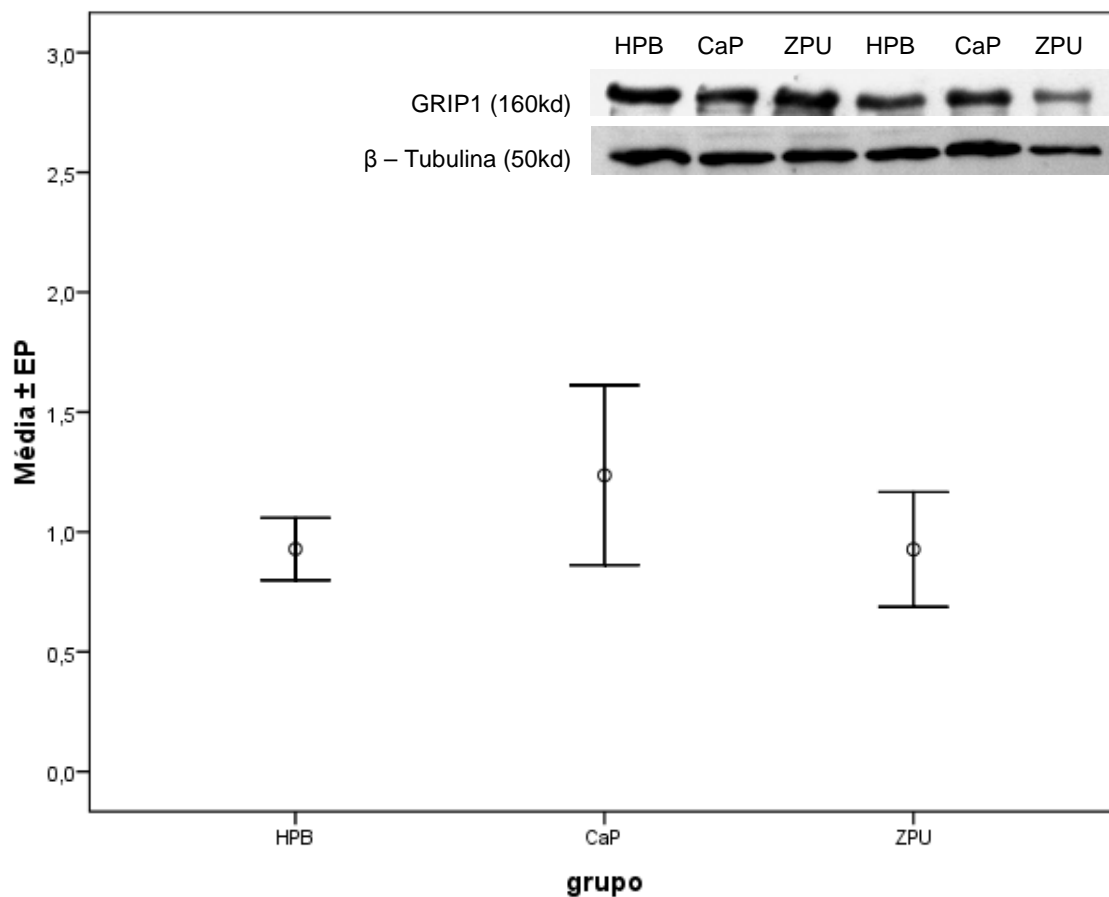


Figura 18. Expressão protéica de GRIP1. Expressão protéica de GRIP1 em tecido prostático de pacientes com HPB $0,93 \pm 0,13$, CaP $1,24 \pm 0,38$ e ZPU $0,93 \pm 0,24$, representada como média \pm erro padrão (EP), unidades arbitrárias.

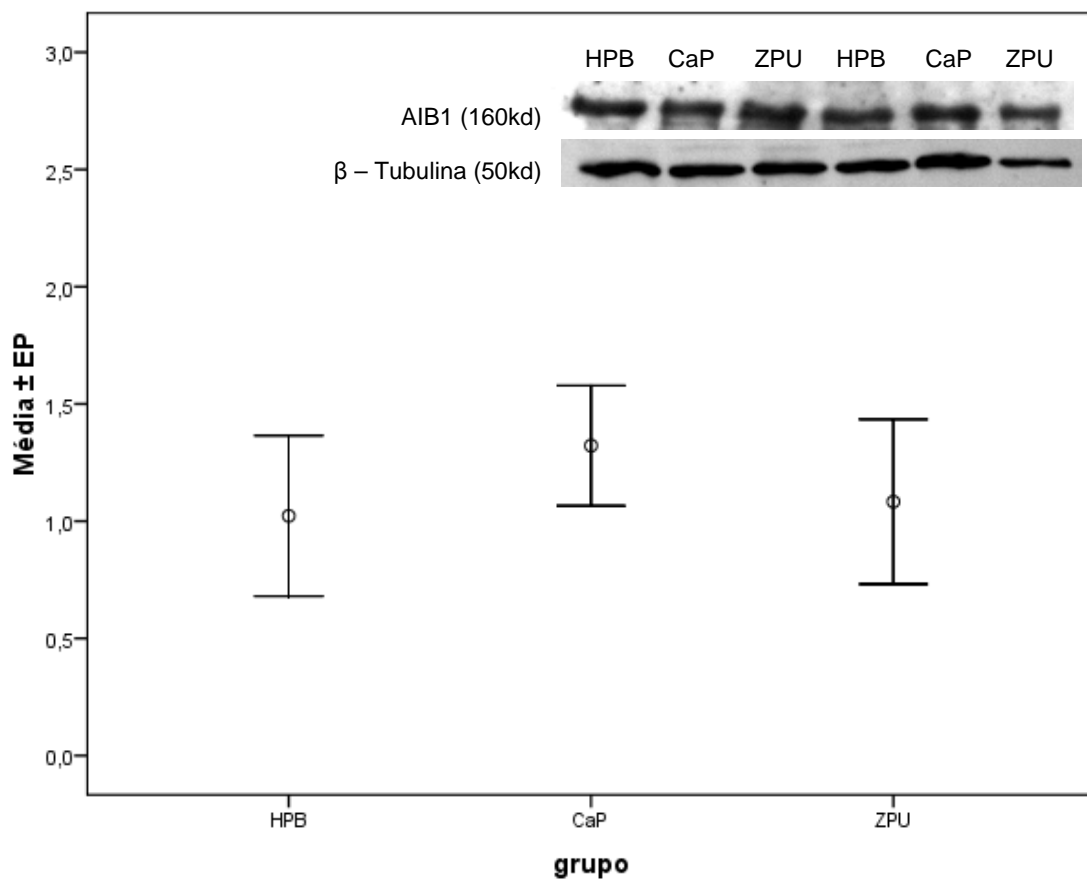


Figura 19. Expressão protéica de AIB1. Expressão protéica de AIB1 em tecido prostático de pacientes com HPB $1,02 \pm 0,34$, CaP $1,32 \pm 0,26$ e ZPU $1,08 \pm 0,35$, representada como média \pm erro padrão (EP), unidades arbitrárias.

Outras Análises

Visto que a HPB e o CaP são distúrbios proliferativos associados com a idade, foi realizado a correlação parcial dos polimorfismos CAG e GGC, genes em estudo, PSA e volume, corrigida pela idade, conforme a tabela 7. O número de

repetições GGC foi correlacionado negativamente com o SRC1 (-0,244; $p=0,026$). O AR foi correlacionado positivamente com o FHL2 (0,232; $p=0,014$), SRC1 (0,255; $p=0,008$) e GRIP1 (0,233; $p=0,017$). O SRC1 foi correlacionado positivamente com o GRIP1 (0,268; $p=0,007$) e AIB1 (0,220; $p=0,029$) e o GRIP1 também foi correlacionado positivamente com AIB1 (0,508; $p<0,001$). O AIB1 foi correlacionado com o PSA (0,230; $p=0,024$).

Tabela 7. Correlação parcial corrigida pela idade.

			CAG	GGC	AR	FHL2	SHP	SRC1	GRIP1	AIB1	PSA	Volume
Idade	CAG	CC		0,089	0,159	-0,029	-0,002	-0,124	0,151	0,032	-0,180	-0,201
		Sig		0,305	0,093	0,760	0,983	0,205	0,126	0,748	0,095	0,081
		N		92	87	87	75	82	80	77	85	74
	GGC	CC	0,089		-0,026	0,137	0,015	-0,244	-0,057	-0,032	0,054	-0,095
		Sig	0,305		0,787	0,154	0,885	0,026	0,571	0,752	0,551	0,311
		N	92		86	75	75	81	79	77	83	73
	AR	CC	0,159	-0,026		0,232	0,185	0,255	0,233	0,099	-0,002	0,005
		Sig	0,093	0,787		0,014	0,071	0,008	0,017	0,321	0,982	0,965
		N	87	86		109	94	105	102	100	103	93
	FHL2	CC	-0,029	0,137	0,232		0,166	0,126	-0,028	-0,159	0,011	0,114
		Sig	0,760	0,154	0,014		0,106	0,199	0,776	0,111	0,910	0,279
		N	87	86	109		94	103	102	100	100	90
	SHP	CC	-0,002	0,015	0,185	0,166		0,002	0,072	0,160	0,135	0,145
		Sig	0,983	0,885	0,071	0,106		0,987	0,497	0,131	0,212	0,207
		N	75	75	94	94		92	89	89	85	75
	SRC1	CC	-0,124	-0,244	0,255	0,126	0,002		0,268	0,220	0,119	0,117
		Sig	0,205	0,026	0,008	0,199	0,987		0,007	0,029	0,239	0,271
		N	82	81	105	103	92		99	97	97	88
	GRIP1	CC	0,151	-0,057	0,233	-0,028	0,072	0,268		0,508	-0,071	0,135
		Sig	0,126	0,571	0,017	0,776	0,497	0,007		0,000	0,484	0,204
		N	80	79	102	102	89	99		99	97	88
	AIB1	CC	0,032	-0,032	0,099	-0,159	0,160	0,220	0,508		0,230	0,057
		Sig	0,748	0,752	0,321	0,111	0,131	0,029	0,000		0,024	0,600
		N	77	77	100	100	89	97	99		94	85
	PSA	CC	-0,180	0,054	-0,002	0,011	0,135	0,119	-0,071	0,230		0,144
		Sig	0,095	0,551	0,982	0,910	0,212	0,239	0,484	0,024		0,121
		N	85	83	103	100	85	97	97	94		115
	Volume	CC	-0,201	-0,095	0,005	0,114	0,145	0,117	-0,135	0,057	0,144	
		Sig	0,081	0,311	0,965	0,279	0,207	0,271	0,204	0,600	0,121	
		N	74	73	93	90	75	88	88	85	115	

- CC: Coeficiente de Correlação
- Sig: Significância (bicaudal)
- N: Número de Pacientes
- Em negrito, resultados com diferença significativa

Foi realizada uma análise de correlação entre as expressões gênicas e protéicas do AR e seus corretores corrigida pela idade (Tabela 8). Foi demonstrado uma correlação positiva entre a expressão gênica de SHP e a proteína AR (0,565; p=0,035) e entre a proteína AR e as proteínas FHL2 (0,232; p=0,014), SRC1 (0,255; p=0,008) e GRIP (0,233; p=0,017). As proteínas do complexo p160 se correlacionaram positivamente. SRC1 e GRIP1 (0,268; p=0,007), SRC1 e AIB1 (0,220; p=0,029) e GRIP1 e AIB1 (0,508; p<0,001).

Tabela 8. Correlação parcial corrigida pela idade.

<i>Proteína</i>	<i>RNAm</i>							<i>Proteína</i>				
	AR	FHL2	SHP	SRC1	GRIP	AIB1	AR	FHL2	SHP	SRC1	GRIP1	AIB1
AR	CC	-0,164	0,039	0,565	-0,033	-0,139	0,279	0,232	0,185	0,255	0,233	0,099
	Sig	0,630	0,901	0,035	0,919	0,667	0,379	0,014	0,071	0,008	0,017	0,321
FHL2	CC	0,158	-0,202	0,229	0,064	0,050	-0,008	0,232	0,166	0,126	-0,028	-0,159
	Sig	0,643	0,507	0,431	0,842	0,876	0,980	0,014	0,106	0,199	0,776	0,111
SHP	CC	0,315	0,163	0,115	0,381	0,067	-0,251	0,185	0,166	0,002	0,072	0,160
	Sig	0,345	0,594	0,694	0,222	0,837	0,431	0,071	0,106	0,987	0,497	0,131
SRC1	CC	-0,286	0,418	0,491	-0,198	-0,266	0,081	0,255	0,126	0,002	0,268	0,220
	Sig	0,394	0,155	0,074	0,536	0,404	0,803	0,008	0,199	0,987	0,007	0,029
GRIP1	CC	-0,551	0,291	0,154	-0,343	-0,235	-0,093	0,233	-0,028	0,072	0,268	0,508
	Sig	0,099	0,415	0,652	0,302	0,486	0,786	0,017	0,776	0,497	0,007	0,000
AIB1	CC	-0,342	0,567	-0,140	-0,192	-0,337	-0,046	0,099	-0,159	0,160	0,220	0,508
	Sig	0,333	0,069	0,665	0,572	0,310	0,894	0,321	0,111	0,131	0,029	0,000

- CC: Coeficiente de Correlação
- Sig: Significância (bicaudal)
- N: Número de Pacientes
- Em negrito, resultados com diferença significativa

Os resultados das expressões gênicas também foram analisados distribuindo os pacientes dicotomicamente pelo resultado do exame anatomopatológico, estadiamento, CAG, GGC e PSA, onde somente foram mostrados os resultados com diferenças significativas. Dividindo pelo anatomopatológico em grupo 1, Gleason $\leq 7(3+4)$ e grupo 2, Gleason $\geq 7(4+3)$ foi encontrada maior expressão gênica de FHL2 no Grupo 1 [1,12 (CI95% 0,26-3,680)] do que no grupo 2 [0,49 (CI95% 0,16-1,60)], $p=0,039$. Para análise do estadiamento, foi dividido em grupo 1 (T1+T2) e grupo 2 (T3+T4). A expressão de AIB1 foi maior no grupo 1 [1,54 (CI95% 0,98-2,75)] em relação ao grupo 2 [1,07 (CI95% 0,36-1,75)], $p=0,034$. O PSA apresentou-se mais elevado no grupo 2 [9,87 (CI95% 5,92-12,66)], em relação ao grupo 1 [6,61 (CI95% 4,95-11,92)], $p=0,018$ (Dados não mostrados).

Os pacientes também foram divididos pelo número de repetições $GGC \leq 18$ e $GGC > 18$ e $PSA \leq 4$ e $> 4 \text{ ng/mL}$, baseados pela mediana do grupo HPB. A expressão gênica de GRIP1 e AIB1 foi maior no grupo $GGC \leq 18$ [1,50 (CI95% 1,04-2,34)] e [1,62 (CI95% 0,67-1,98)] em relação ao grupo $GGC > 18$ [1,18 (CI95% 0,57-1,73)] e [0,94 (CI95% 0,49-1,59)], $p=0,043$ e $p=0,032$, respectivamente. Os níveis de SRC1 foram maiores no grupo $GGC \leq 19$ [1,79 (CI95% 1,22-2,51)] em relação ao grupo $GGC > 19$ [1,49 (CI95% 0,85-2,17)], $p=0,028$. Por fim, o nível do co-repressor do AR, SHP, foi menor no grupo $CAG \leq 21$ [6,12 (CI95% 1,54-21,45)] em relação ao grupo $CAG > 21$ [25,01 (CI95% 4,27-66,25)], $p=0,009$ (Dados não mostrados).

A população foi classificada dicotomicamente pelo valor das medianas das expressões gênicas e da concentração de PSA do grupo HPB (Tabela 9). Nesta análise, 71,4% dos indivíduos com AR superior a 0,25 ($p=0,040$) e 74,1% dos

indivíduos com GRIP1 superior a 0,83 ($p=0,053$), eram do grupo CaP. Dos pacientes do grupo CaP, 84,3% tiveram o nível sérico de PSA superior a 4,00ng/mL ($p<0,001$).

Analisando o grupo ZPU com o HPB (Tabela 9), 88,9% dos indivíduos com AR inferior a 0,25 ($p=0,002$), 100% com FHL2 inferior a 0,80 ($p<0,001$), 88,9% de SRC1 inferior a 1,35 ($p=0,002$), 87,5% de AIB1 inferior a 0,65 e 77,8% de PSA inferior a 4ng/mL ($p<0,001$), pertencem ao grupo HPB. Deste último, 77,6% dos pacientes com PSA superior a 4ng/mL são do grupo ZPU, compostos pelos respectivos pacientes do grupo CaP.

Tabela 9. Distribuição das frequências das expressões gênicas e da dosagem de PSA.

Genes	N	CaP[#]	HPB[#]	p*
AR ≤ 0,25	31	15 (48,4 %)	16 (51,6%)	0,040
AR >0,25	63	45 (71,4%)	18 (28,6%)	
FHL2 ≤ 0,80	44	29 (65,9%)	15 (34,1%)	0,830
FHL2 > 0,80	50	31 (62%)	19 (38%)	
SHP ≤ 8,3	32	17 (53,1%)	15 (46,9%)	0,160
SHP > 8,3	50	35 (70%)	15 (30%)	
SRC1 ≤ 1,35	39	23 (59%)	16 (31%)	0,370
SRC1 > 1,35	50	35 (70%)	15 (30%)	
GRIP ≤ 0,83	29	15 (51,7%)	14 (48,3%)	0,053
GRIP > 0,83	58	43 (74,1%)	15 (25,9%)	
AIB1 ≤ 0,65	30	16 (53,3%)	14 (46,7%)	0,090
AIB1 > 0,65	54	40 (74,1%)	14 (25,9%)	
PSA ≤ 4,00	20	6 (30,0%)	14 (70,0%)	<0,001
PSA > 4,00	70	59 (84,3%)	11 (15,7%)	
	N	ZPU[#]	HPB[#]	p*
AR ≤ 0,25	18	2 (11,1%)	16 (88,9%)	0,002
AR >0,25	40	22 (55%)	18 (45%)	
FHL2 ≤ 0,80	15	0 (0%)	15 (100%)	<0,001
FHL2 > 0,80	41	22 (53,7%)	19 (46,3%)	
SHP ≤ 8,3	26	11 (42,3%)	15 (57,7%)	0,770
SHP > 8,3	23	8 (34,8%)	15 (65,2%)	
SRC1 ≤ 1,35	18	2 (11,1%)	16 (88,9%)	0,001
SRC1 > 1,35	35	20 (57,1%)	15 (42,9%)	
GRIP ≤ 0,83	19	5 (26,3%)	14 (73,7%)	0,083
GRIP > 0,83	32	17 (53,1%)	15 (46,9%)	
AIB1 ≤ 0,65	16	2 (12,5%)	14 (87,5%)	0,002
AIB1 > 0,65	35	21 (60 %)	14 (40%)	
PSA ≤ 4,00	18	4 (22,2%)	14 (77,8%)	<0,001
PSA > 4,00	49	38 (77,6%)	11 (22,4%)	

* Valores de p obtido usando o teste qui-quadrado de Pearson 2x2.

Número de pacientes e percentual.

O câncer de próstata e a HPB são alterações associadas à idade. Visto que o principal mecanismo de crescimento e proliferação da próstata se dá pela ação dos androgênios e que os androgênios diminuem na senescência, a expressão do AR e seus corretores podem passar a responder de alguma forma alterada com o avançar da idade. Para corrigir uma possível alteração associada à idade, a análise de risco foi corrigida por esta. Quando corrigida pela idade (Tabela 10), indivíduos com a expressão de AR superior a 0,25, tiveram uma chance de desenvolver câncer 3 vezes maior [HR 2,997 (CI95% 1,191–7,544)] em relação aos indivíduos com expressão de AR igual ou inferior a 0,25 ($p=0,020$). Pacientes com expressão de GRIP1 superior a 0,65, tiveram uma chance de desenvolver CaP de 2,7 vezes maior [HR 2,734 (CI95% 1,027-7,281)] ($p=0,044$). Quando analisado o PSA com um ponto de corte de 4ng/mL, indivíduos com PSA superior a 4ng/mL tiveram uma chance de 11,6 vezes [HR 11,603 (CI95% 3,453–38,983)] de desenvolver CaP ($p<0,001$).

Em relação ao tecido ZPU, pacientes com um nível de AR superior a 0,25 apresentaram uma chance 12 vezes maior de ter CaP naquele tecido onde a biópsia deu negativa [HR 12,206 (CI95% 2,323–64,125)] ($p=0,003$), 11 vezes [HR 11,100 (CI95% 2,070–59,514)] ($p=0,005$) para SRC1 superior a 1,35; 9,5 vezes [HR 9,469 (CI95% 1,804–49,687)] ($p=0,008$) para AIB1 superior a 0,65 e 10,7 vezes HR 10,736 [CI95% 2,823–40,830)] ($p<0,001$) para PSA superior 4ng/dL.

Tabela 10. Análise de chance para desenvolver CaP e ZPU em relação ao grupo HPB.

Genes	N	CaP HR	CI (95%)	p*
AR ≤ 0,25	31			
AR >0,25	63	2,997	1,191 – 7,544	0,020
FHL2 ≤ 0,80	44			
FHL2 > 0,80	50	0,882	0,366 - 2,129	0,781
SHP ≤ 8,3	32			
SHP > 8,3	50	1,637	0,623 – 4,300	0,317
SRC1 ≤ 1,35	39			
SRC1 > 1,35	50	1,620	0,653 – 4,0119	0,298
GRIP ≤ 0,83	29			
GRIP > 0,83	58	2,734	1,027 – 7,281	0,044
AIB1 ≤ 0,65	30			
AIB1 > 0,65	54	2,253	0,845 – 6,008	0,104
PSA ≤ 4,00	20			
PSA > 4,00	70	11,603	3,453 – 38,983	<0,001
	N	ZPU HR	CI (95%)	p*
AR ≤ 0,25	18			
AR >0,25	40	12,206	2,323 – 64,125	0,003
FHL2 ≤ 0,80	15	#	#	#
FHL2 > 0,80	41			
SHP ≤ 8,3	26			
SHP > 8,3	23	0,535	0,159 - 1,803	0,313
SRC1 ≤ 1,35	18			
SRC1 > 1,35	35	11,100	2,070 – 59,514	0,005
GRIP ≤ 0,83	19			
GRIP > 0,83	32	3,394	0,926 – 11,821	0,065
AIB1 ≤ 0,65	16			
AIB1 > 0,65	36	9,469	1,804 – 49,687	0,008
PSA ≤ 4	18			
PSA > 4	49	10,736	2,823 – 40,830	<0,001

* Valores obtidos usando a regressão logística binária entre CaP e HPB e ZPU e HPB (controles), corrigido pela idade.

Valor impossível de ser calculado. Nenhum paciente do grupo ZPU possui valor de FHL2 ≤ 0.80 para o cálculo ser realizado.

Pensando em uma possível utilização clínica desses marcadores, foi calculado uma curva ROC para os genes AR e seus corretores e para o PSA sérico, a fim de encontrar o valor com melhor resposta para sensibilidade e especificidade entre o grupo HPB e ZPU, com o propósito de utilizar estes resultados para analisar a chance de desenvolver CaP pela análise de uma biópsia negativa de próstata. Para a escolha do valor de corte a partir da curva ROC, foram realizados os cálculos do produto e da soma da especificidade e sensibilidade para cada ponto da curva e o cálculo de Yuden (soma da sensibilidade mais especificidade, menos 1). O ponto que tivesse, pelo menos, os dois valores maiores, seria escolhido para representar o valor de corte. Os valores escolhidos foram: PSA – 5,62, AR – 0,56, SHP – 32,6, FHL2 – 1,17, SRC1 – 1,38, GRIP1 – 1,18 e AIB1 – 0,89.

Baseado no valor de corte da curva ROC a população foi novamente classificada dicotomicamente conforme a tabela 11. Visto que o cálculo da chance de desenvolver CaP se dá pela multiplicação dos verdadeiros positivos para CaP pelos verdadeiros negativos para HPB, dividido pelos falsos negativos para CaP multiplicado pelos falsos positivos para HPB, houve um aumento da significância em todas as amostras analisadas, em virtude da escolha do melhor ponto de corte pela curva ROC. Isto foi confirmado pelo aumento das chances de desenvolver CaP em todos os analisados, variando de 9 a 26 vezes, como mostrado na tabela 12. Isso se deve ao aumento do número de pacientes verdadeiros positivos para CaP e/ou verdadeiros negativos para HPB, ou pela diminuição dos pacientes falso negativos para CaP ou falso positivos para HPB.

Tabela 11. Distribuição das frequências das expressões gênicas e da dosagem de PSA .

&	N	ZPU [#]	HPB [#]	p [*]
AR ≤ 0,56	28	4 (14,3%)	24 (85,7%)	<0,001
AR > 0,56	30	20 (66,7%)	10 (33,3%)	
FHL2 ≤ 1,17	20	1 (5%)	19 (95%)	<0,001
FHL2 > 1,17	36	21 (58,3%)	15 (41,7%)	
SHP ≤ 32,6	38	13 (34,2%)	25 (65,8%)	0,298
SHP > 32,6	11	6 (54,5%)	5 (45,5%)	
SRC1 ≤ 1,38	20	2 (10%)	18 (90%)	<0,001
SRC1 > 1,38	33	20 (60,6%)	13 (39,4%)	
GRIP ≤ 1,18	29	6 (20,7%)	23 (79,3%)	<0,001
GRIP > 1,18	22	16 (72,7%)	6 (27,3%)	
AIB1 ≤ 0,89	24	3 (12,5%)	21 (87,5%)	<0,001
AIB1 > 0,89	27	20 (74,1 %)	7 (25,9%)	
PSA ≤ 4,25	22	7 (31,8%)	15 (68,2%)	<0,001
PSA > 4.25	69	59 (85.5%)	10 (14.5%)	

* Valores de p obtidos usando o teste qui-quadrado de Pearson 2x2.

Número de pacientes e percentual.

& Valores calculados a partir da curva ROC.

Tabela 12. Análise da chance de desenvolver CaP através do tecido ZPU em relação ao grupo HPB.

#	N	ZPU HR	CI (95%)	p*
AR ≤ 0,56	28	14,282	3,603 - 56,618	<0,001
AR > 0,56	30			
FHL2 ≤ 1,17	20	26,672	3,142 – 226,406	0,003
FHL2 > 1,17	36			
SHP ≤ 32,6	38	1,992	0,501 – 7,920	0,328
SHP > 32,6	11			
SRC1 ≤ 1,38	20	16,986	2,964 – 97,332	0,001
SRC1 > 1,38	33			
GRIP ≤ 1,18	29	9,197	2,411 – 35,084	0,001
GRIP > 1,18	22			
AIB1 ≤ 0,89	24	16,632	3,689 – 74,991	<0,001
AIB1 > 0,89	27			
PSA ≤ 4,25	22	12,022	3,689 – 39,181	<0,001
PSA > 4,25	69			

* Valores calculados usando a regressão binária logística entre ZPU e controles, corrigido pela idade.

Valores obtidos a partir da curva ROC.

Avaliando a possibilidade de utilizar esses genes como marcadores no auxílio da detecção de CaP, foi calculado a sensibilidade (proporção de verdadeiros positivos entre todos os doentes), especificidade (proporção de verdadeiros negativos entre todos os sadios), o valor preditivo positivo (VPP) (proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo), valor preditivo negativo (VPN) (proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo), a razão de verossimilhança positiva (RVP) (expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes) e a razão de verossimilhança negativa (RVN)

(expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes) e a acurácia (proporção de acertos de um teste diagnóstico) ¹⁴⁹. Estas análises também foram calculadas para o nível sérico de PSA. Considerando que estes genes poderiam ser utilizados para auxiliar no diagnóstico de CaP, somente foram realizados os cálculos entre o grupo HPB e ZPU, pois foram analisadas as biópsias negativas de próstata para este fim. O valor de corte para cada fator analisado foi obtido a partir da sua curva ROC. Quando comparado o grupo ZPU e HPB (Tabela 13), os resultados para a sensibilidade foram PSA 89,4 %, AR 83,3%, SHP 31,6%, FHL2 95,5%, SRC1 90,1%, GRIP1 72,7% e AIB1 87%. Os resultados para especificidade foram, PSA 60%, AR 70,6%, SHP 83,3%, FHL2 55,9%, SRC1 58,1%, GRIP1 79,3% e AIB1 75%. Valor preditivo positivo (VPP): PSA 85,5%, AR 66,7%, SHP 54,5%, FHL2 58,3%, SRC1 60,6%, GRIP1 72,7% e AIB1 74,1% e de valor preditivo negativo (VPN): PSA 68,2% AR 85,7%, SHP 65,8%, FHL2 95,0%, SRC1 90,0%, GRIP1 79,3% e AIB1 87,5%. Para a razão de verossimilhança positiva (RVP): PSA 2,23, AR 2,83, SHP 1,89, FHL2 2,16, SRC1 2,17, GRIP1 3,52 AIB1 3,48. Razão de verossimilhança negativa (RVN): PSA 0,18, AR 0,24, SHP 0,82, FHL2 0,08, SRC1 0,16, GRIP1 0,34, AIB1 0,17. Para a acurácia os valores obtidos foram: PSA 81,3%, AR 74,6%, SHP 63,3%, FHL2 71,4%, SRC1 71,7%, GRIP1 76,5% e AIB1 80,4%.

Tabela 13. Parâmetros de diagnóstico para AR, SHP, FHL2, SRC1, GRIP1, AIB1 de tecido ZPU e HPB através de qRT-PCR e PSA sérico.

RNAm ^a	Parâmetro de diagnóstico n° (%)						
	Sensibilidade	Especificidade	VPP ^b	VPN ^b	RVP ^b (vezes)	RVN ^b (vezes)	Acurácia
PSA (4,25) ^c	59/66 (89,4)	15/25 (60,0)	59/69 (85,5)	15/22 (68,2)	2,23	0,18	74/91 (81,3)
AR (0,56) ^c	22/24 (83,3)	24/34 (70,6)	20/30 (66,7)	24/28 (85,7)	2,83	0,24	44/59 (74,6)
SHP (32,6) ^c	6/19 (31,6)	25/30 (83,3)	6/11 (54,5)	25/38 (65,8)	1,89	0,82	31/49 (63,3)
FHL2 (1,17) ^c	21/22 (95,5)	19/34 (55,9)	21/36 (58,3)	19/20 (95,0)	2,16	0,08	40/56 (71,4)
SRC1 (1,38) ^c	20/22 (90,1)	18/31 (58,1)	20/33 (60,6)	18/20 (90,0)	2,17	0,16	38/53 (71,7)
GRIP (1,18) ^c	16/22 (72,7)	23/29 (79,3)	16/22 (72,7)	23/29 (79,3)	3,52	0,34	39/51 (76,5)
AIB1 (0,89) ^c	20/23 (87,0)	21/28 (75,0)	20/27 (74,1)	21/24 (87,5)	3,48	0,17	41/51 (80,4)

^a RNAm Valores da expressão gênica ^b VPP (valor preditivo positivo), VPN (valor preditivo negativo), RVP (razão de verossimilhança positivo), RVN (razão de verossimilhança negativo).

^c Valores calculados a partir da curva ROC.

A análise em separado de cada marcador, utilizando a técnica de escolha do melhor ponto pela curva ROC, mostrou que o AR, GRIP1 e AIB1 são melhores marcadores do que o PSA (Dado não mostrado).

Na análise combinada em paralelo dos genes com o PSA entre o grupo ZPU e HPB (Tabela 14), a sensibilidade para o AR, SHP1, FHL2, SRC1, GRIP1 e AIB1 foi de 98,2%, 92,7%, 99,5%, 99,0%, 97,1% e 98,6% e a especificidade foi de 42,4%, 50,0%, 33,5%, 34,9%, 47,1% e 45,0%, respectivamente. Na análise em série, a sensibilidade foi de 74,5%, 28,3%, 85,4%, 80,5%, 65,0% e 77,8% e a especificidade foi de 88,2%, 93,3%, 82,4%, 83,2%, 91,7% e 90,0%, respectivamente.

Tabela 14. Análise em paralelo e em série da sensibilidade e especificidade para AR, SHP1, FHL2, SRC1, GRIP1 e AIB1 de tecido ZPU e HPB através de qRT-PCR e dosagem de PSA sérico.

RNAm ^a	Parâmetro de diagnóstico %		Análise em Paralelo		Análise em Série	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
PSA (4,25) ^b	89,4	60,0				
AR (0,56) ^b	83,3	70,6	98,2	42,4	74,5	88,2
SHP (32,6) ^b	31,6	83,3	92,7	50,0	28,3	93,3
FHL2 (1,17) ^b	95,5	55,9	99,5	33,5	85,4	82,4
SRC1 (1,38) ^b	90,1	58,1	99,0	34,9	80,5	83,2
GRIP (1,18) ^b	72,7	79,3	97,1	47,6	65,0	91,7
AIB1 (0,89) ^b	87,0	75,0	98,6	45,0	77,8	90,0

^a RNAm valores da expressão gênica obtidos a partir da reação em Cadeia da Polimerase a partir da Transcriptase Reversa, em Tempo Real.

^b Valores calculados a partir da curva ROC.

Da mesma forma que o cálculo da curva ROC, a análise em série do PSA com o AR, FHL2, SRC1, GRIP1 e AIB1, se mostrou melhor do que a análise dos marcadores separadamente (Dado não mostrado).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA 1ª PARTE

Os resultados da análise dos polimorfismos CAG e GGC do receptor de androgênio obtidos neste estudo demonstram a existência de uma associação positiva entre o número de repetições GGC e o risco de desenvolver CaP e HPB.

O receptor de androgênios é um fator de transcrição que depende da ligação do hormônio esteróide. Os principais mecanismos de proliferação e de diferenciação das células prostáticas dependem da ação do AR. A variação polimórfica da região regulatória do gene do AR, onde os polimorfismos de maior variação estão localizados (CAG e GGC), podem alterar a atividade transcricional do AR^{62, 93}.

Neste estudo não foi encontrada diferença significativa entre o número de repetições CAG entre os grupos controle, HPB e CaP. Este estudo corrobora com outros estudos da literatura que também não demonstraram diferença significativa deste polimorfismo. Bousema e colaboradores, analisando 98 pacientes com HPB e 61 controles, não encontraram diferença entre a média do número de repetições CAG entre controles e HPB (Bousema e colaboradores, 2000). Contudo, o uso de um grupo de conveniência, como o grupo controle desse estudo (pacientes com predominância em câncer de bexiga), pode representar um viés de seleção, pois podem não ser uma população representativa para as amostras que estão sendo estudadas. Schatzl e colaboradores também não demonstraram diferença na média de repetições CAG do AR, nem uma associação dos parâmetros clínicos e endócrinos em homens com HPB comparado ao número de repetições¹⁵⁰. Em um estudo realizado por Mononen e colaboradores em 1363 finlandeses, também não houve diferença na média do número de repetições CAG entre controles e HPB¹⁵¹.

A associação da susceptibilidade de ter CaP e o polimorfismo do AR, especialmente em um menor número de repetições CAG, tem sido demonstrado^{76, 77, 152-155}. Das e colaboradores, não encontraram diferença na média de repetições CAG em 47 pacientes asiáticos com CaP, 130 HPB e 46 controles, mas encontraram que homens com um número reduzido de repetições CAG e acima de 69 anos no momento do diagnóstico, apresentaram uma tendência de diminuição do risco de desenvolver CaP¹⁵⁶. Além disso, um menor número de repetições CAG do AR associado com o genótipo não-GG do gene do PSA, mostraram uma tendência na diminuição do risco de CaP e uma significativa diminuição do risco de HPB¹⁵⁶. Em um estudo caso-controle envolvendo o risco de CaP em homens afroamericanos (340 controles e 140 CaP), não foi encontrada nenhuma diferença na média do número de repetições CAG e nenhuma evidência na associação entre o número de repetições CAG e GGN com o risco de desenvolver CaP¹⁵⁷.

Acredita-se que a atividade do AR é inversamente proporcional ao número de repetições CAG, demonstrado pela utilização de sistemas de transfecção contendo promotores virais^{62, 71, 75, 95, 157, 158}. No entanto, novos resultados sobre a atividade do AR e o número de repetições CAG têm sido descritos. Nenonem e colaboradores demonstraram em seu estudo que o número de repetições CAG não está inversamente correlacionado com a atividade do AR *in vitro*, quando analisados o número de repetições dentro do intervalo normal encontrado na população (16, 22 e 28 repetições). Nesse estudo usando β -galactosidade como controle de transfecção, o número de repetições CAG igual a 22 teve maior atividade comparado com 16 e 28 repetições CAG, enquanto que usando a técnica renilla-luciferase, o número de

repetições CAG igual a 16 teve atividade similar aos números de repetições CAG 22 e 28 ⁹⁷.

O envolvimento do polimorfismo GGC no desenvolvimento o CaP e HPB tem sido pouco estudado comparado ao CAG. Os estudos de uma associação entre o polimorfismo GGC e o risco de desenvolver CaP tem mostrado resultados conflitantes. Até onde conhecemos, esta é a primeira vez que este polimorfismo é avaliado na população brasileira em busca de uma associação com a HPB. Neste estudo foi encontrado uma associação entre o número de repetições GGC e a chance de desenvolver CaP e HPB, comparado ao grupo controle, quando analisados o GGC>18 e GGC>19 repetições. Como já foi mencionado, há poucos estudos analisando as repetições GGC e o risco de desenvolver CaP e HPB. Alguns estudos tem relatado um menor número de repetições GGN associado com o CaP ^{78, 159, 160}, enquanto outros não demonstram esta relação ¹⁵³.

Edwards e colaboradores, analisando 178 ingleses caucasianos com CaP e 195 indivíduos controles encontraram que o risco relativo de recidiva em homens com o número de repetições GGC maior que 16 foi de 1,74 (CI95% 1,08 – 2,79) ¹⁵⁹. Rodríguez-González e colaboradores, analisando 72 pacientes com CaP e 106 controles demonstraram que GGC maior que 24 repetições foi significativamente menor em casos do que em controles (8,4% vs. 21,6%, $p = 0,01$), enquanto Lange e colaboradores não encontraram associação entre o número de repetições GGC e CaP em uma população afro-americana ¹⁵⁷.

Resultados de estudos sobre ensaios de transfecção tem mostrado que a supressão do intervalo GGN pode resultar em aumento, diminuição ou nenhuma alteração da atividade transcricional do AR ^{161, 162}. Jenster e colaboradores

encontraram que a deleção completa da sequência GGC não afetou substancialmente a atividade do AR, enquanto Gao e colaboradores demonstraram que esta deleção provocou uma diminuição da capacidade (redução de 30%) para ativar o gene da luciferase ¹⁶¹.

Ding e colaboradores sugeriram que o efeito das repetições GGC poderiam ser mais importantes do que o polimorfismo CAG comparando a atividade relativa dos diferentes alelos do AR. Neste estudo, analisando a expressão gênica de AR com vetores possuindo diferentes repetições de GGC dentro do intervalo fisiológico normal (13 – 17 repetições GGC), a expressão protéica de AR foi inversamente correlacionada com o tamanho do trato glicínico ¹⁶³.

Estudos têm mencionado que as repetições CAG e GGC podem estar relacionadas com o grupo étnico. Nas populações afro-americanas, tem sido encontrado a média do número de repetições menor do que em caucasianos ^{14, 71, 152}. O mesmo resultado foi encontrado em certas subpopulações africanas ^{14, 71, 98}, enquanto a população asiática apresentaria um maior número de repetições do que em caucasianos ^{14, 77}. Isso poderia explicar, em parte, a distribuição de frequências de câncer de próstata em diferentes regiões do mundo. Em nosso estudo, devido a pequena e homogênea proporção de indivíduos negros entre os grupos CaP, HPB e controles, não realizamos análises separadas levando em conta este fator.

A análise da raça (ou cor) realizada pelo examinador ou declarada pelo paciente não é suficiente para definir a ancestralidade adequada em nossa população. Na população brasileira, especialmente no sul do Brasil, é particularmente difícil avaliar a raça devido à heterogeneidade genética encontrada e

à sobreposição das características genéticas de europeus, africanos e povos indígenas⁸⁷.

Um achado importante em nosso trabalho foi a diferença dos níveis séricos de testosterona total no grupo CaP e HPB quando comparados ao grupo controle e o risco de desenvolver CaP e HPB quando o nível de testosterona total é superior a 4 ng/mL. Sabendo que os níveis séricos de testosterona total diminuem com a idade e que os pacientes com CaP e HPB são mais velhos do que o grupo controle, as análises de chance e de correlação foram corrigidas pela idade, a fim de eliminar uma possível interferência.

É sabido que a testosterona diminui com a idade, como também é de conhecimento que o risco de CaP e HPB aumentam com esta. Não está claro se o AR começa a responder de forma alterada com o avançar da idade, visto que o risco de desenvolver CaP e HPB em jovens, mesmo com níveis mais altos de testosterona, é baixo comparando com homens mais velhos que possuem níveis de testosterona mais baixos. Brum e colaboradores, analisando a proliferação celular de células epiteliais prostáticas (HNTEP) tratadas com diferentes concentrações de androgênios, encontraram maior proliferação celular com baixos níveis de testosterona ($2 \times 10^{-11} \text{M}$ and $2 \times 10^{-12} \text{M}$) e dihidrotestosterona (10^{-13}M) comparado a altos níveis de androgênios ($2 \times 10^{-5} \text{M}$, $2 \times 10^{-6} \text{M}$, 2×10^{-9} de testosterona e 10^{-8}M de dihidrotestosterona). Nesse estudo, a adição de hidroxiflutamida (inibidor da ligação de androgênios ao AR) na cultura tratada com 10^{-13}M de dihidrotestosterona bloqueou a proliferação induzida pelo androgênio¹⁶⁴.

Nós também encontramos uma diminuição significativa da testosterona total em pacientes com GGC>19 repetições, quando comparado com os pacientes com

GGC<19. Como em nosso estudo encontramos uma chance maior de desenvolver CaP em pacientes com baixos níveis de testosterona e repetições GGC>19, o somatório destes fatores poderiam estar associados com a alteração da atividade do AR, proporcionando uma maior atividade do AR o que daria suporte o achado do risco aumentado de desenvolver o CaP nestes pacientes. Giwercman e colaboradores observaram que o índice de testosterona livre, calculado como testosterona/SHBG, foi maior em homens com GGN>23 quando comparados com os pacientes com GGN<23 (P=0,057) e GGN = 23 (P=0,027) ¹⁶⁵. Em outro estudo com 220 homens suecos, jovens e saudáveis, Ludin e colaboradores, não encontraram diferença nos níveis de testosterona total e livre entre GGN<23, GGN=23 e GGN>23 ¹⁶⁶. Em um recente estudo, Bogaert e colaboradores em 2009, analisando 1476 jovens saudáveis, relataram uma associação positiva entre as repetições GGN e os níveis de testosterona e testosterona livre circulante (p=0,017 e p=0,013, respectivamente) ¹⁶⁷.

Estudos têm investigado a relação entre os níveis de androgênios circulantes e o risco de desenvolver CaP, mas os resultados tem sido inconclusivos. Alguns estudos têm demonstrado um pequeno aumento do risco com níveis de androgênios elevados ¹⁶⁸⁻¹⁷¹, enquanto outros têm mostrado uma pequena diminuição do risco ^{172, 173}.

Em nosso estudo, não encontramos diferença nos níveis de testosterona total e livre entre os pacientes quando dicotomizados pelo escore de Gleason. Alguns estudos têm mostrado que níveis baixos de testosterona sérica estão associadas com o estágio patológico avançado (alto escore de Gleason) e recorrência após prostatectomia radical ^{172, 173}. Kristal e colaboradores analisando 709 controles e 708

pacientes com HPB, encontraram que altos níveis de testosterona estão associados com a diminuição do risco de desenvolver HPB ³¹. Em um estudo realizado por Teloken e colaboradores no Brasil, níveis baixos de testosterona pré-operatório estavam associadas com uma margem cirúrgica positiva na prostatectomia radical ³⁹. Resultado similar foi encontrado por Massengil e colaboradores em uma análise retrospectiva de 879 pacientes tratados com prostatectomia radical em múltiplas instituições. Eles encontraram uma diminuição significativa dos níveis de testosterona em pacientes com CaP não confinadas ao órgão em relação aos pacientes com CaP órgão-confinado e que os níveis baixos de testosterona pré-operatória representariam um preditor significativo para a doença extraprostática ³³.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA 2ª PARTE

O câncer de próstata é o câncer mais comum em homens no mundo e a segunda causa de morte por câncer ^{174, 175}. Cirurgia e radioterapia têm se tornado modalidades de tratamento estabelecidas para a doença confinada à próstata, enquanto a terapia de privação androgênica é a primeira linha de tratamento para pacientes com doença local avançada e metástases ¹⁷⁶.

Fatores de risco para o câncer de próstata incluem a idade, raça, residência geográfica e rearranjos genéticos ¹⁷⁷. Contudo, os androgênios e o AR são necessários para o desenvolvimento do câncer de próstata ¹⁷⁸. A castração química ou cirúrgica para homens com este tipo de câncer, na maioria das vezes leva a uma regressão do tumor, sugerindo a importância dos androgênios no crescimento e manutenção do câncer de próstata ^{179, 180}. Porém, após 12 a 18 meses, o câncer de próstata reaparece como um tumor resistente à castração por uma várias razões ^{179, 181}. Essa recorrência parece estar associada à re-expressão de coativadores do AR, promovendo o aumento da expressão do próprio AR, tornando o câncer recorrente ¹⁴⁰. O recrutamento de vários coativadores e correguladores do AR e fatores gerais de transcrição, promovem a transcrição ou a repressão dos genes alvo ¹⁸².

Neste estudo, encontramos diferença significativa na expressão gênica do AR, estando mais elevada no grupo CaP e ZPU em relação ao grupo HPB, demonstrando um aumento da atividade transcricional do AR nas células malignas e nas células adjacentes ao tumor. Alguns estudos demonstraram o aumento da expressão do AR no câncer de próstata primário e na progressão em ambos os cânceres hormônio-sensíveis e hormônio-refratários ¹⁸³⁻¹⁸⁵. Estudos por

imunohistoquímica mostraram que a expressão de AR é heterogênea no câncer de próstata e que nem sempre está correlacionada com a resposta à terapia de deprivação androgênica ^{184, 185}. Outros estudos têm observado um maior grau de positividade do AR com um maior grau de diferenciação ou escore de Gleason ^{183, 186, 187}, embora este achado não tenha sido consensual ^{184, 188}. Todavia, modelos animais de câncer de próstata têm sugerido que a elevação da expressão de AR pode iniciar o desenvolvimento do CaP ¹⁸⁹ ou pode estar associado com a recorrência do crescimento na presença de baixos níveis de androgênios ¹⁹⁰.

A ablação androgênica é o tratamento padrão para o câncer de próstata avançado ¹⁹¹. Com esse tratamento, inicialmente ocorre a inibição do crescimento do tumor, mas após 12 a 18 meses, o câncer pode retornar se transformando em um câncer de próstata androgênio-independente. Foi mostrado que cânceres de próstata androgênio-independentes aumentam a expressão de várias enzimas envolvidas na esteroidogênese, sugerindo que as células cancerígenas podem produzir androgênios durante a terapia de privação androgênica, demonstrando uma certa dependência androgênica ¹⁹²⁻¹⁹⁴. Estudos também mostram que os níveis plasmáticos de androgênios podem não se correlacionar com os níveis intraprostáticos ^{195, 196} e que após a castração de ratos, os níveis de testosterona e níveis de DHT intraprostáticos permanecem entre 15 e 40% ^{197, 198}. Estes baixos níveis intraprostáticos de DHT seriam suficientes para ativar o AR e ativar a expressão de genes ^{140, 197}. Em um modelo matemático realizado por Eikenberry e colaboradores em 2010, foi sugerido que níveis baixos de androgênios poderiam aumentar a seleção por fenótipos resistentes a terapia hormonal e também tornar os tumores prostáticos mais agressivos. Além disso, o tratamento clínico com um

inibidor da 5 α -redutase, como a finasterida, poderia aumentar a incidência de cânceres resistentes à terapia ¹⁹⁹.

O achado surpreendente deste estudo é o fato do tecido ZPU, apesar de ter morfologia normal, possuir uma expressão aumentada de AR, não diferindo do grupo câncer. Muitos estudos, como o de Linja e colaboradores ²⁰⁰ utilizam o tecido adjacente ao tumor, com morfologia normal, para ser o grupo controle, o qual, segundo nosso estudo, mostra alterações na expressão de genes semelhantes ao câncer de próstata. Pensando nisto, muitos estudos podem não encontrar diferenças devido a não possuírem um bom grupo controle, com exceção daqueles que buscam diferenciar diferentes estágios do tumor. No presente trabalho, o aumento da expressão gênica, não foi confirmado pela expressão protéica. Fatores pós-transcricionais podem alterar a tradução do RNAm ²⁹, com isso o aumento da expressão gênica nem sempre é refletida pela análise de proteínas. Além disso, foram quantificadas as proteínas totais do AR em nosso estudo. Em recente estudo realizado por Heemers e colaboradores em 2010, foi demonstrado que a estimulação androgênica promove o aumento da proteína AR no núcleo e a diminuição desta no citoplasma ²⁹, o que poderia explicar o fato de não termos encontrado diferença entre os grupos.

A transativação do AR envolve uma série de proteínas co-regulatórias ^{36, 201} e numerosas proteínas já foram identificadas por co-regular o AR ^{202, 203}. Estudos mostram que alterações na expressão de corre reguladores do AR podem estar envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata ²⁰³⁻²⁰⁵. Uma vez que os androgênios e o AR são conhecidos por serem importantes na tumorigênese

do câncer de próstata, é possível que eles também possam regular a expressão de corre reguladores²⁰⁶.

Em nosso estudo encontramos um aumento da expressão gênica do inibidor do AR, SHP, no grupo CaP em relação ao grupo HPB, o qual não foi seguido pelo aumento de sua proteína. Na literatura não há estudos *in vivo* avaliando a expressão gênica de SHP em câncer de próstata. Este resultado pode refletir a tentativa de defesa celular pelo aumento da expressão gênica do repressor da atividade do AR, SHP, no tecido CaP. Em virtude da transformação celular para uma célula maligna, o câncer pode ter desenvolvido meios que impeçam a tradução do RNAm do SHP, impedindo a formação da sua proteína, a qual exerceria a atividade supressora do AR.

Em um estudo realizado por Gobinet e colaboradores, foi demonstrado que o SHP inibe até 97% da atividade induzida do AR. Além disso, o SHP interage com o domínio N-terminal do AR, provocando a inibição neste domínio que é dependente de sua transativação, além de inibir o domínio de ligação do ligante (AR-LBD). Nesse mesmo estudo foi demonstrado que a inibição do AR mediada pelo SHP é reversível, visto que o aumento da expressão de coativadores do AR, FHL2 e TIF2, promoveram o aumento da atividade do AR¹¹⁸. Além da ação direta sobre o AR, foi evidenciado que o SHP medeia a maior parte de seu efeito repressivo através do recrutamento de histonas desacetilases, modificando a estrutura da cromatina, diminuindo a atividade transcricional⁵⁰.

No primeiro estudo mostrando o envolvimento do SHP na proliferação e tumorigênese realizado por Zhang e colaboradores em 2008, foi demonstrado que o SHP regula negativamente a tumorigênese *in vivo* e *in vitro* em carcinoma

hepatocelular. Neste estudo, ratos homozigotos deletados para o gene SHP (SHP^{-/-}) de idade entre 12 e 15 meses, desenvolveram espontaneamente carcinoma hepatocelular, acompanhando com o aumento da proliferação do hepatócito e aumento da expressão da ciclina D1, que possui importante função na fase G1 do ciclo celular. Em contraste, o aumento da expressão de SHP em hepatócitos de ratos transgênicos reverteu este efeito. Em análise *in vitro* de fibroblastos embriônicos que não expressavam SHP, foi evidenciado um aumento da proliferação e aumento da expressão gênica e protéica da ciclina D1 ¹¹⁹.

Em recente estudo realizado por Zhang e colaboradores em 2010, foi demonstrado que o SHP também possui atividade citoplasmática, promovendo a regulação da atividade mitocondrial. Nesse estudo, foi evidenciado que o SHP age como um receptor de morte celular que tem como alvo central a mitocôndria, onde se liga com a Bcl-2, induzindo a liberação do *citocromo c* e ativando a apoptose. A apoptose induzido pelo AHPN {ácido carboxílico 6-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]-2-naftaleno} atua aumentando a expressão gênica de SHP e promove sua translocação do núcleo para a mitocôndria. Além disso, a indução da apoptose, pela ativação de SHP, inibiu o crescimento de tumor pancreático em ratos ¹²⁴. Este efeito da translocação do SHP do núcleo para a mitocôndria pode mostrar que as análises citoplasmática e nuclear do SHP podem ser mais importantes que a análise total da proteína, uma vez que a mudança de localização não muda a concentração total da proteína SHP na célula.

Mais do que quantificar o AR, muitos estudos têm analisado os níveis de expressão dos corretores do AR, visto que o AR pode não estar aumentado em pacientes com câncer de próstata em relação a controles. A quantidade expressa de

AR pode não refletir a sua atividade transcricional devido à atuação de corretores, os quais poderiam aumentar ou inibir sua atividade transcricional, sem modificar a quantidade do AR intracelular. Dentre os coativadores do AR, o FHL2 é específico para este e é expresso no miocárdio e na próstata ⁵³.

Em nosso estudo, foi encontrado um aumento significativo da expressão gênica de FHL2 no grupo ZPU em relação ao grupo CaP e HPB, enquanto que somente o grupo CaP teve expressão protéica aumentada em relação ao grupo HPB. Além disso, encontramos uma expressão gênica maior de FHL2 em pacientes com CaP que tiveram escore de Gleason inferior a 7(3+4), em relação à pacientes com escore superior a 7(4+3). Em nosso entendimento, parece que o gene tem um papel importante no início da transformação tumoral, visto que é mais expresso no tecido ZPU, seguido do Gleason de menor intensidade [$\leq 7(3+4)$] e diminuindo no tumor mais agressivo [$>7(4+3)$]. Apesar do tecido periuretral em estudo possuir morfologia normal, esse aumento da expressão de gênica de FHL2 pode significar uma possível tentativa de promover um aumento da proliferação maligna, anterior à perda de diferenciação celular. Como a ação é exercida pela proteína, vimos que o grupo CaP possui maior expressão em relação ao grupo HPB. Dado também encontrado por Müller e colaboradores, no câncer de próstata avançado ⁵³. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que mostram que o aumento da expressão protéica está relacionado com o aumento da atividade transcricional do AR e consequente formação tumoral maligna ^{53, 126, 129, 130}. Em um estudo realizado por Kahl e colaboradores analisando 153 pacientes que foram submetidos à prostatectomia radical, os pacientes foram divididos em um grupo de 112 pacientes sem recorrência de CaP e outro com 41 pacientes recorrentes. Neste estudo não foi

encontrada diferença entre a expressão gênica e protéica de AR e FHL2 entre os grupos, mas quando analisadas as proteínas por imuno-histoquímica foi possível discriminar os dois grupos através do FHL2 nuclear. O FHL2 citoplasmático não apresentou diferença entre os grupos. Neste mesmo estudo, foi encontrado um aumento de aproximadamente 50% de FHL2 nuclear no grupo que teve recorrência em relação ao grupo sem recorrência. Estes autores sugerem que o FHL2 pode servir como um novo biomarcador preditivo para o câncer de próstata com biologia agressiva, pois mesmo não tendo diferença entre os níveis de AR entre os grupos, o grupo com recorrência teria maior atividade do AR em virtude de possuir 50% a mais do coativador FHL2 no núcleo. Tumores de próstata que super-expressam a RhoA-GTPase, promoveriam alteração da localização celular de FHL2. Este aumento do FHL2 nuclear foi correlacionado fortemente com o escore de Gleason ¹³⁰. No presente estudo não foi analisada a recorrência do tumor, pois, foi um estudo transversal.

O FHL2 é um coativador chave do AR, sua expressão aumentada no câncer de próstata foi associada com um mau prognóstico e é fortemente induzida pelos androgênios ¹²⁹. Em um trabalho realizado por Heemers e colaboradores, avaliando a expressão gênica de FHL2 em cultura de células LNCaP tratadas com androgênios, foi demonstrado que a estimulação de FHL2 foi tempo e dose dependente. Estudo realizado por Kollara e colaboradores em 2010, avaliando o efeito dos níveis de FHL2 na atividade transcricional do AR pela técnica da luciferase, demonstrou o efeito positivo na transativação do AR na presença de FHL2 em aproximadamente 2 vezes, o qual foi intensificado em aproximadamente 15 vezes na presença de DHT ¹²⁶.

Ao analisarmos a expressão das proteínas que formam o complexo p160, as quais são coativadores do AR, encontramos uma expressão gênica aumentada de SRC1 no grupo ZPU em relação ao grupo HPB. Os genes GRIP1 e AIB1 tiveram maior expressão no grupo CaP e ZPU em relação ao grupo HPB. A família de proteínas do complexo p160 possui três membros homólogos, SRC-1, GRIP1 e AIB1, que interagem com receptores nucleares e fatores de transcrição específicos. Eles recrutam a remodelação da cromatina e várias enzimas de transcrição para facilitar a organização dos fatores de transcrição para a ativação da transcrição. Estas proteínas são pós-transcricionalmente reguladas por uma série de vias sinalizadoras. Estas modificações pós-transcricionais determinam ou modulam suas estabilidades, localizações subcelulares, funcionalidade específica, atividade co-ativadora e/ou montagem e desmontagem do complexo coativador⁵⁴.

Estudos têm revelado que a expressão dos níveis de RNAm e proteínas de SRC1 estão positivamente correlacionadas com o estágio tumoral^{140, 141, 205}. Um estudo realizado por Linja e colaboradores, encontrou uma diminuição da expressão gênica de SRC1 em tumores refratários quando comparados com grupo de pacientes com HPB e pacientes submetidos à prostatectomia. Contudo o trabalho fica limitado ao pequeno tamanho amostral (9 HPB, 30 prostatectomia e 12 hormônio-refratários)²⁰⁰. Outro problema desse estudo é que o tecido HPB foi obtido da próstata com câncer que, como demonstrado no nosso estudo, corresponde ao grupo ZPU. Este tecido possui alterações celulares diferentes do tecido coletado em cirurgia para HPB, como demonstra nosso estudo. Por outro lado, Mori e colaboradores em 2008 não encontraram diferença significativa entre a expressão gênica de SRC1 e a progressão do tumor¹⁴⁴. Em nosso estudo não encontramos

correlação entre o escore de Gleason e o nível de expressão gênica de SRC1, resultado também encontrado por Li e colaboradores em 2002 avaliando 45 cânceres de próstata primário ²⁰⁷. As expressões protéicas do complexo p160 foram semelhantes em todos os grupos em nosso estudo, os quais também podem ser explicados por uma possível inibição pós-transcricional, ou pelo fato de não fazer a quantificação diferencial das proteínas nucleares e citoplasmáticas. Um estudo realizado por Mäki e colaboradores em 2006, avaliando 205 tumores primários e 49 pacientes resistentes à ablação androgênica, não encontrou diferença significativa na expressão protéica total de SRC1, porém encontrou maior quantidade de SRC1 localizado no núcleo em tumores de próstata independentes de androgênio ¹⁴³. Este estudo, associado ao mesmo achado de Kahl e colaboradores em 2006, que encontraram maior quantidade nuclear de FHL2 ¹³⁰, sugere que a análise de proteínas totais pode não revelar a real importância destas proteínas, por não diferenciar o conteúdo nuclear e citoplasmático.

Em cultura celular de CaP, o SRC1 pode aumentar a proliferação celular mediada pelo AR. Culturas de células LNCaP (androgênio-dependente) tratadas com RNA de interferência para o gene SRC1, tiveram sua proliferação inibida. O mais interessante é que em cultura de células C4-2 (androgênio-independente), também tiveram sua proliferação inibida na ausência de SRC1. Contudo, a redução dos níveis de SRC1 não afetaram o crescimento de células de CaP PC-3 e Du-145 (AR-negativas) ¹⁴¹. Estes resultados demonstram que o SRC1 promove o crescimento de células prostáticas cancerosas pelo aumento da atividade do AR dependente ou não dependente de androgênios.

Em recente estudo por Tien e colaboradores em 2009, a ação do SRC1 em CaP foi investigado *in vivo* em camundongos com adenocarcinoma transgênico de câncer de próstata (TRAMP). Durante a carcinogênese da próstata em camundongos TRAMP, os níveis protéicos de SRC1 permaneceram constantes. Camundongos TRAMP, deletados para o gene (SRC1^{-/-}) exibiam similar iniciação, progressão e metástase do tumor de próstata do que o observado em camundongos TRAMP com o gene selvagem para SRC1. O interessante deste estudo é que ambos os camundongos TRAMP SRC1^{-/-} e SRC1 selvagem, tiveram uma expressão aumentada de AIB1 induzida pela carcinogênese da próstata ¹⁴⁵. Portanto, a ação do SRC1 no processo de carcinogênese em camundongos parece não ser essencial devido à possível compensação do AIB1 ou maior expressão de outros coativadores ¹⁴⁵.

Foi demonstrado um aumento da expressão de GRIP1 em tumores de próstata, mas a frequência deste aumento não tem sido bem caracterizada ⁵⁴. Alguns estudos demonstram que a expressão de GRIP1 em alguns cânceres de próstata foi positivamente associada com uma maior proliferação celular, maior estadiamento tumoral e/ou recorrência da doença ^{140, 142}. Em células de CaP, AR-positivas, níveis elevados de androgênios reprimem a expressão de GRIP1. A depleção de GRIP1 reduz a expressão de AR e inibe a proliferação de células de CaP AR-dependentes e independentes, sugerindo que o GRIP1 também promove o crescimento de células de CaP através de vias dependentes ou independentes do AR ¹⁴². O nosso estudo confirma a hipótese de que as células malignas expressam mais GRIP1 em relação às células hiperplásicas. Além disso, as células do tecido ZPU mostram uma alteração na expressão de GRIP1 semelhante às células

malignas, indicando uma possível transformação maligna, ainda que não demonstrada morfológicamente.

Poucos estudos relatam a expressão do gene AIB1 em tumores de próstata. Em um pequeno estudo realizado por Gnanapragasam e colaboradores, com 6 pacientes HPB e 37 CaP, foi encontrado um aumento da expressão gênica em 38% dos tumores, estando correlacionada com o escore de Gleason e o estadiamento do tumor ²⁰⁸. Em um estudo maior realizado por Zhou e colaboradores em 2005, avaliando 480 pacientes com CaP localizado que tiveram terapia coadjuvante como radioterapia e hormônioterapia, os níveis de AIB1 foram positivamente correlacionados com o aumento dos níveis de PSA, indicando a recorrência do tumor. Além disso, o AIB1 foi correlacionado positivamente com a ativação da via da Akt e com a proliferação das células tumorais ¹⁴⁶. Em cultura de células de CaP, PC-3, o AIB1 ativa a via de sinalização Akt-mTOR e estimula o crescimento celular. A utilização de RNA de interferência para AIB1 diminui a proliferação celular e o crescimento do tumor em camundongos com tumor xenográfico e aumenta a apoptose ^{146, 209}. A ação *in vitro* do AIB1 também foi avaliada no câncer de próstata espontâneo (TRAMP), comparando a iniciação e progressão do tumor em camundongos TRAMP e TRAMP AIB1^{-/-} ²¹⁰. A proteína AIB1 não foi essencial para o crescimento dos tumores androgênicos AR-dependentes. Contudo, altos níveis de AIB1 foram detectados em células de CaP durante a progressão do tumor. O desenvolvimento da hiperplasia epitelial da próstata e a iniciação dos tumores não foram afetados pela perda do AIB1. Entretanto, a perda do AIB1 interrompeu o crescimento e a progressão do tumor de próstata e aumentou o tempo de sobrevivência dos camundongos ²¹⁰.

Em recente estudo realizado por Hemmers e colaboradores em 2010, em linhagem de células de CaP, modelos xenográficos, linhagens de células epiteliais de próstata não malignas, tecidos responsivo a androgênios derivados de ratos Wistar e culturas de células LNCaP, foi encontrado uma diminuição da expressão protéica de SRC1, GRIP1 e AIB1, quando tratadas com androgênios. A expressão gênica também foi diminuída pela adição de androgênios. Em células VCaP (androgênio-independente), somente o GRIP1 teve expressão gênica e protéica diminuída, enquanto a expressão gênica de SRC1 foi aumentada e as expressões protéicas de SRC1 e AIB1 foram semelhantes ²⁹. Com isso, foram demonstrados mecanismos diferentes de ação destas proteínas em linhagens dependentes e independentes de androgênios e que fatores pós-transcricionais poderiam influenciar a tradução de genes, demonstrando que a expressão gênica e protéica nem sempre estão correlacionadas. Além disso, nesse estudo foi demonstrado que os androgênios promovem a diminuição dos níveis citoplasmáticos da proteína AR e aumento desta no núcleo. Em relação às proteínas do complexo p160, houve diminuição citoplasmática e nuclear em cultura de LNCaP. Células LNCaP cultivadas sem androgênios tiveram um aumento da expressão gênica e protéicas do complexo p160. Em dois modelos e tumores xenográficos de células de CaP provenientes de linfonodos, em ratos castrados, foi encontrado um aumento da expressão protéica do complexo p160, nem sempre correlacionado com a expressão gênica, no qual os autores sugerem que esta desconexão se dê por efeitos pós-transcricionais. Além disso, os resultados *in vivo* foram antagônicos aos encontrados *in vitro*, pois ratos castrados possuíam menor expressão protéica do complexo p160 quando tratados com testosterona, enquanto que, *in vivo*, a adição de androgênios inibia a expressão

do complexo p160. Para finalizar este estudo, duas linhagens de células prostáticas de origem epitelial, não neoplásica, foram tratadas com androgênios e não houve alteração na expressão gênica e protéica do complexo p160 ²⁹.

Nossos resultados reforçam a existência do aumento da expressão gênica de GRIP1 e AIB1 em pacientes com CaP em relação aos HPB, além de também demonstrar o aumento da expressão destes, acrescido do SRC1, no tecido ZPU, reforçando a hipótese de que este tecido com morfologia normal já possui alterações que podem predispor a uma proliferação maligna. Além disso, estes resultados reforçam a heterogeneidade dos cânceres de próstata, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, necessitando de um esforço coletivo para melhor análise e entendimento dos tumores de próstata.

Quando os corretores p160 foram dicotomizados utilizando como ponto de corte o número de repetições GGC 18 e 19, encontramos maior expressão gênica de GRIP e AIB1 no grupo $GGC \leq 18$ em relação ao grupo $GGC > 18$ e encontramos uma expressão aumentada de SRC1 no grupo $GGC \leq 19$. Não há estudos relacionando as atividades destas proteínas com o polimorfismo GGC. Em um estudo realizado por Irvine e colaboradores analisando a atividade das proteínas do complexo p160 em cultura de células transfectadas com AR de diferentes números de repetições CAG, foi encontrado uma correlação negativa entre o número de repetições e a atividade das proteínas do complexo p160. O menor número de repetições CAG promovia o aumento da atividade destas proteínas ⁹³. Também foi encontrada expressão gênica diminuída do co-inibidor SHP em pacientes com repetições $CAG \leq 21$. Alguns estudos mostram que a atividade do AR é inversamente correlacionada ao número de repetições CAG ^{62, 71, 75, 95, 157, 158}. O gene

SHP poderia estar associado a uma menor inibição do AR e a pacientes com menor número de repetições CAG.

Considerando que o câncer depende da alteração de vários fatores que regulam a atividade transcricional do AR e/ou de outras vias responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação celular, o somatório da expressão destes genes poderia estar relacionado nos eventos responsáveis pela iniciação, desenvolvimento e progressão tumoral.

Realizando uma correlação parcial corrigida pela idade, foram encontradas correlações positivas, *in vivo*, entre a expressão gênica do gene AR e dos coativadores FHL2, SRC1 e GRIP1, demonstrando suas importantes participações no processo de ativação do AR. SRC1, GRIP1 e AIB1 constituem um dos grupos de proteínas co-regulatórias de receptores nucleares, que promovem o aumento transcricional do AR. Isto condiz com a correlação positiva encontrada entre estes correguladores do complexo p160 em nosso estudo. Analisando a expressão gênica com a expressão protéica, foi encontrada uma correlação positiva entre a proteína AR e a expressão gênica do SHP, dado não encontrado quando analisadas as duas proteínas. Este aumento da expressão gênica pode estar associado à tentativa de expressão da proteína co-inibidora do AR, visto que o AR está aumentado no câncer, mas, por fatores pós-transcricionais, o RNAm do SHP não está sendo traduzido em proteína. Analisando as correlações das proteínas, foram encontradas correlações positivas entre o AR e os coativadores FHL2, SRC1 e GRIP1.

Através da frequência das expressões gênicas e da dosagem de PSA sérico, foi calculada a chance de desenvolver CaP, utilizando como parâmetro os valores das medianas do grupo HPB. No tecido com câncer e ainda mais relevante no tecido

ZPU, foram encontradas chances aumentadas de desenvolver câncer de próstata, quando comparados ao grupo HPB, o que pode qualificar estes genes como possíveis marcadores para a formação tumoral maligna. Visto que o propósito de um marcador bioquímico é diagnosticar e acompanhar o processo de alguma alteração fisiológica, foi dado um foco especial para a análise do tecido adjacente. A análise deste tecido se torna importante, pois, no caso de uma biópsia negativa de próstata poderíamos calcular a chance de o indivíduo ter, ou não, câncer de próstata. Para obter o melhor ponto de corte para cada gene e para o PSA sérico, as medianas foram substituídas pelos valores encontrados na curva ROC, como descrito na segunda parte dos resultados. Com exceção da expressão gênica de SHP os genes AR, FHL2, SRC1, GRIP1, AIB1 e o PSA sérico, se demonstraram muito eficientes em prever a chance de ter câncer de próstata, variando de 9 a 26 vezes.

Devidos aos resultados encontrados e estabelecendo o propósito de utilizar estas substâncias como possíveis marcadores moleculares futuramente, foi encontrado que, comparado ao PSA, as expressões dos genes AR, SRC1, GRIP1 e AIB1, apresentam boa sensibilidade e melhor especificidade, além de possuírem um melhor valor preditivo negativo. SHP se mostrou o mais específico, porém com baixa sensibilidade e FHL2 e SRC1 apresentaram maior especificidade, porém com baixa sensibilidade. AR, GRIP1 e AIB1 possuem melhor razão de verossimilhança positivo e FHL2, SRC1 e AIB1, possuem melhor razão de verossimilhança negativo. Comparado ao PSA, a análise da expressão gênica do AR, GRIP1 e AIB1, em uma biópsia negativa, mostraram melhores resultados, utilizando a mesma análise de detecção do melhor ponto de corte da curva ROC.

Visto que não há marcadores com sensibilidade e especificidade de 100%, as substâncias podem ser analisadas em laboratório em conjunto a fim de melhorar a sensibilidade ou a especificidade. Os testes múltiplos podem ser solicitados todos ao mesmo tempo (teste em paralelo), considerando-se o resultado positivo em qualquer um dos testes como evidência da doença, ou serem solicitados sequencialmente (teste em série), onde novos testes são solicitados em função do resultado do teste anterior. Neste caso, todos os resultados devem ser positivos para que se possa estabelecer o diagnóstico da doença.

Os testes em paralelo geralmente são solicitados quando o clínico necessita de um diagnóstico rápido, como em situações de emergência. O resultado positivo é considerado se um dos dois testes for positivo. O resultado negativo dos testes em paralelo somente será considerado se os dois resultarem negativos.

Os testes em série são geralmente utilizados nos processos diagnósticos que não requerem urgência, como no caso dos pacientes de ambulatório ou internados para investigação diagnóstica, que são acompanhados durante um determinado período. Também são utilizados em casos de testes que são muito caros ou oferecem riscos para o paciente. Neste caso, opta-se inicialmente pela utilização do testes mais seguros e somente após um resultado sugestivo é que se utilizam os testes mais caros ou de risco, caso sejam necessários para confirmar a doença. Nesse caso, os testes são aplicados sequencialmente e o segundo destes somente será aplicado se o primeiro resultar positivo, pois na prática clínica, se o primeiro teste resultar negativo, frequentemente não se justifica a realização do segundo teste ¹⁴⁹.

Dentre as duas análises descritas, a análise em série se mostrou melhor, caso fosse utilizada clinicamente. A análise em paralelo oferece melhor sensibilidade, mas baixa especificidade, com isso seria comum encontrar valores falso-positivos. A análise em série apresentou menor sensibilidade do que a em paralelo, contudo a especificidade foi melhor. Além disso, a análise em série com PSA, mostrou melhor resultado que a análise isolada de cada marcador.

Não encontramos expressão gênica, dos genes estudados, maior no grupo HPB em relação aos grupos CaP e ZPU, demonstrando que estes genes podem estar mais associados a uma proliferação maligna do que benigna. Isto não impede que a HPB possua genes mais expressos que o CaP, visto que são anormalidades proliferativas que andam em paralelo e que genes específicos poderiam ser responsáveis por cada uma destas alterações. Até hoje não há estudos conclusivos que indiquem que a HPB pode dar origem ao CaP. Sabendo que o CaP e a HPB são duas anormalidades proliferativas, os mesmos genes podem estar associados na proliferação de ambas, mas com níveis de expressão diferentes. É possível que nossos resultados fossem mais significativos se houvesse a possibilidade de analisar próstatas normais, sem alterações proliferativas, ou com alterações microscópicas, sem evidência clínica, visto que os pacientes controles deste estudo tiveram material coletado quando a próstata hiperplásica apresentava alterações clínicas significativas e, por isso, foram submetidas à cirurgia de retirada.

Com o advento do PSA e o aumento crescente no número de diagnósticos, surgiram dúvidas com relação à real morbidade e mortalidade do CaP. O rastreamento de indivíduos assintomáticos ainda é controverso. Sabe-se que a neoplasia maligna da próstata apresenta comportamento variado, baseado

principalmente no seu estadiamento clínico e classificação anatomopatológica (classificação de Gleason).

Atualmente, há a busca constante por marcadores moleculares específicos do câncer de próstata. A morbidade do exame de biópsia da próstata e dos tratamentos do câncer da próstata (principalmente radioterapia e prostatectomia radical) torna necessário o estabelecimento de métodos mais eficazes não somente para o diagnóstico da neoplasia maligna da próstata, mas também para a seleção mais acurada dos tumores que realmente apresentam relevância clínica, ou seja, que podem levar à morte do paciente. Com o avançar da idade, há uma boa probabilidade de encontrar células neoplásicas, mesmo em pacientes com PSA normal, com isso, muitos pacientes são submetidos à cirurgia por microtumores localizados que não apresentariam risco de morte ao paciente. Deve-se levar em conta que, atualmente, homens com 70 anos se encontram em fase sexual ativa e que este tipo de procedimento cirúrgico invasivo pode trazer uma série de complicações, tanto pelo procedimento cirúrgico em uma idade avançada, quanto para problemas psicológicos e familiares decorrentes de distúrbios eréteis que acometem, aproximadamente, metade dos pacientes submetidos a essa cirurgia.

Ao pesquisarmos novos marcadores moleculares mais sensíveis, específicos e precoces, devemos ter em mente que o uso destes deve ser feito com cautela para não aumentar o número de cirurgias desnecessárias e para que esses marcadores possam auxiliar o médico no melhor acompanhamento do paciente.

Em nosso estudo encontramos que os genes estudados se comportam de maneira diferente entre o tecido com hiperplasia prostática benigna, o tecido com câncer de próstata e o tecido periuretral (morfologicamente normal) da próstata com

câncer. A partir do conhecimento das vias moleculares do desenvolvimento tumoral, há a possibilidade de desenvolver novos caminhos na prevenção das doenças prostáticas.

Os genes AR, FHL2, SRC1, GRIP1 e AIB1, em nosso estudo, apresentaram um alta chance de predizer o CaP através da análise do tecido ZPU, o qual comparo com uma biópsia negativa. Contudo, somente o gene FHL2 obteve uma relação com o estadiamento o tumor e o tecido ZPU e foi o único que obteve aumento da expressão protéica no tecido com câncer. Em virtude desta alta chance, novamente devemos considerar o fato do cuidado da análise dos marcadores moleculares para não promover cirurgias desnecessárias. No entanto, este estudo torna-se importante para o conhecimento das bases moleculares do tumor, o qual, futuramente, a partir do aprimoramento das técnicas, poderá ser mais bem utilizado na clínica.

A partir do conhecimento de genes e proteínas que estão correlacionadas no desenvolvimento ou progressão do tumor e do aprimoramento das técnicas moleculares quantitativas, obteremos um melhor entendimento da fisiologia tumoral e, com isto, ferramentas alternativas que possam auxiliar na prevenção e diagnóstico do câncer de próstata.

CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo a investigar a associação entre o polimorfismo GGC e a chance de desenvolver câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna no Brasil. Nossos resultados sugerem que haplótipos específicos do AR podem atribuir maior chance de desenvolver CaP e HPB.

- Nossos resultados sugerem que o número aumentado de repetições GGC do receptor de androgênios está associado com o aumento da chance de desenvolver CaP e HPB em nossa população.
- Nossos dados sugerem que baixos níveis séricos de testosterona aumentam a chance de desenvolvimento de CaP e HPB.
- Pacientes com maior número de repetições GGC tiveram menor concentração de testosterona.
- Não foram encontradas diferenças do polimorfismo CAG entre os grupos estudados, nem correlações com a testosterona sérica.
- Tecidos prostáticos malignos apresentam expressão gênica maior dos genes AR, SHP, GRIP1 e AIB1 em relação à HPB, indicando sua possível participação no desenvolvimento tumoral maligno.
- O tecido adjacente ao tumor (ZPU) apresentou expressão aumentada dos genes AR, FHL2, SRC1, GRIP1 e AIB1 em relação ao grupo HPB.
- O grupo ZPU apresentou expressão gênica de FHL2 e SRC1 maior que no grupo HPB e CaP.

- A análise pareada do tecido adjacente (ZPU) e do tecido CaP, mostrou uma expressão aumentada do gene FHL2 no tecido adjacente. Isto pode refletir a participação deste gene na iniciação da neoplasia maligna, visto que estas células possuem morfologia normal.
- A proteína FHL2 está mais aumentada no tecido de CaP em relação ao tecido HPB.
- Foram encontradas correlações positivas entre o gene AR e os corretores SRC1, GRIP1 e AIB1. Uma fraca correlação negativa entre o polimorfismo GGC e o gene SRC1 também foi encontrada.
- Comparado ao PSA sérico, as expressões gênicas de AR, GRIP1 e AIB1, mostraram melhores resultados na análise combinada da sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de CaP a partir do tecido ZPU.
- A análise em série mostrou melhor resultado do que a em paralelo e, também, do que a análise dos genes e do PSA sérico isoladamente.

REFERÊNCIAS

1. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E. et al.: Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin, 58: 71, 2008
2. Society, A. C.: What are the key statistics about prostate cancer? , vol. Reference Information. Available at: <http://www.cancer.org/downloads/STT/500809web.pdf>, 2010
3. Nelson, W. G., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B.: Prostate cancer. N Engl J Med, 349: 366, 2003
4. Reiter RE, d. K. J.: Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Walsh: Campbell's Urology, 8th edition: WB Saunders; 2002. p. 3002-3003., 2002
5. Jemal, A., Murray, T., Samuels, A. et al.: Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin, 53: 5, 2003
6. Gronberg, H.: Prostate cancer epidemiology. Lancet, 361: 859, 2003
7. Hankey, B. F., Feuer, E. J., Clegg, L. X. et al.: Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. J Natl Cancer Inst, 91: 1017, 1999
8. INCA: Ministério da Saúde, Brasil. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2010. Available at: <http://www2.inca.gov.br/>. 2010
9. INCA: Ministério da Saúde, Brasil. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2003. Available at: <http://www2.inca.gov.br/>. 2003
10. INCA: (Instituto Nacional do Câncer). Ministério da Saúde, Brasil. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2005. Available at: <http://www.inca.gov.br>. Accessed 11/21/2005., 2005
11. INCA: Ministério da Saúde, Brasil. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2007. Available at: <http://www.inca.gov.br/>, 2007
12. Carter, H. B. P., A.W.: Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Walsh: Campbell's Urology 8th edition: WB Saunders; 2002. p.3055–3064, 2002

13. 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*, 20: 3599, 2002
14. 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*, 92: 2009, 2000
15. Carson, C., 3rd, Rittmaster, R.: The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 61: 2, 2003
16. McNeal, J.: Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am*, 17: 477, 1990
17. Kirby, R. S.: The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology*, 56: 3, 2000
18. Neuhauser, 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*, 64: 201, 2004
19. Oesterling, J. E.: Benign prostatic hyperplasia: a review of its histogenesis and natural history. *Prostate Suppl*, 6: 67, 1996
20. Platz, E. A., Smit, E., Curhan, G. C. et al.: Prevalence of and racial/ethnic variation in lower urinary tract symptoms and noncancer prostate surgery in U.S. men. *Urology*, 59: 877, 2002
21. Denis, L., Morton, M. S., Griffiths, K.: Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol*, 35: 377, 1999
22. Griffiths, K., Denis, L., Turkes, A. et al.: Phytoestrogens and diseases of the prostate gland. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12: 625, 1998
23. Kang, D., Andriole, G. L., Van De Vooren, R. C. et al.: Risk behaviours and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int*, 93: 1241, 2004
24. Dawam, D., Rafindadi, A. H., Kalayi, G. D.: Benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma in native Africans. *BJU Int*, 85: 1074, 2000

25. Marrero, A. R., Das Neves Leite, F. P., De Almeida Carvalho, B. et al.: Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol*, 17: 496, 2005
26. Parra, F. C., Amado, R. C., Lambertucci, J. R. et al.: Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 177, 2003
27. Geck, P., Maffini, M. V., Szelei, J. et al.: Androgen-induced proliferative quiescence in prostate cancer cells: the role of AS3 as its mediator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 10185, 2000
28. Geck, P., Szelei, J., Jimenez, J. et al.: Early gene expression during androgen-induced inhibition of proliferation of prostate cancer cells: a new suppressor candidate on chromosome 13, in the BRCA2-Rb1 locus. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 68: 41, 1999
29. Heemers, H. V., Schmidt, L. J., Kidd, E. et al.: Differential regulation of steroid nuclear receptor coregulator expression between normal and neoplastic prostate epithelial cells. *Prostate*, 2010
30. Imamoto, T., Suzuki, H., Fukasawa, S. et al.: Pretreatment serum testosterone level as a predictive factor of pathological stage in localized prostate cancer patients treated with radical prostatectomy. *Eur Urol*, 47: 308, 2005
31. 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*, 168: 1416, 2008
32. Latil, A., Bieche, I., Vidaud, D. et al.: Evaluation of androgen, estrogen (ER alpha and ER beta), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res*, 61: 1919, 2001
33. Massengill, J. C., Sun, L., Moul, J. W. et al.: Pretreatment total testosterone level predicts pathological stage in patients with localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol*, 169: 1670, 2003
34. Morgentaler, A.: Testosterone deficiency and prostate cancer: emerging recognition of an important and troubling relationship. *Eur Urol*, 52: 623, 2007

35. Morgentaler, A., Rhoden, E. L., Guay, A. et al.: Serum testosterone is associated with aggressive prostate cancer in older men: results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *BJU Int*, 105: 884, 2010
36. Rahman, M., Miyamoto, H., Chang, C.: Androgen receptor coregulators in prostate cancer: mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res*, 10: 2208, 2004
37. Rhoden, E. L., Morgentaler, A.: Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring. *N Engl J Med*, 350: 482, 2004
38. Rhoden, E. L., Morgentaler, A.: Symptomatic response rates to testosterone therapy and the likelihood of completing 12 months of therapy in clinical practice. *J Sex Med*, 7: 277, 2010
39. Teloken, C., Da Ros, C. T., Caraver, F. et al.: Low serum testosterone levels are associated with positive surgical margins in radical retropubic prostatectomy: hypogonadism represents bad prognosis in prostate cancer. *J Urol*, 174: 2178, 2005
40. Avances, C., Georget, V., Terouanne, B. et al.: Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens. *Mol Cell Endocrinol*, 184: 13, 2001
41. Degraff, D. J., Aguiar, A. A., Chen, Q. et al.: Androgen mediated translational and postranslational regulation of IGFBP-2 in androgen-sensitive LNCaP human prostate cancer cells. *Am J Transl Res*, 2: 200, 2010
42. Lamont, K. R., Tindall, D. J.: Androgen regulation of gene expression. *Adv Cancer Res*, 107: 137, 2010
43. Lee, C., Kozlowski, J. M., Grayhack, J. T.: Etiology of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am*, 22: 237, 1995
44. Nakano, K., Fukabori, Y., Itoh, N. et al.: Androgen-stimulated human prostate epithelial growth mediated by stromal-derived fibroblast growth factor-10. *Endocr J*, 46: 405, 1999

45. Niu, Y., Chang, T. M., Yeh, S. et al.: Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails. *Oncogene*, 2010
46. Planz, B., Wang, Q., Kirley, S. D. et al.: Regulation of keratinocyte growth factor receptor and androgen receptor in epithelial cells of the human prostate. *J Urol*, 166: 678, 2001
47. Wang, G., Chen, G., Wang, X. et al.: [The polymorphism of (CAG)_n repeats within androgen receptor gene among Chinese male population]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 18: 456, 2001
48. Brinkmann, A. O., Blok, L. J., de Ruyter, P. E. et al.: Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69: 307, 1999
49. Cude, K. J., Dixon, S. C., Guo, Y. et al.: The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *J Mol Med*, 77: 419, 1999
50. Gobinet, J., Carascossa, S., Cavailles, V. et al.: SHP represses transcriptional activity via recruitment of histone deacetylases. *Biochemistry*, 44: 6312, 2005
51. Gobinet, J., Poujol, N., Sultan, C.: Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol*, 198: 15, 2002
52. Heemers, H. V., Regan, K. M., Schmidt, L. J. et al.: Androgen modulation of coregulator expression in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol*, 23: 572, 2009
53. Muller, J. M., Isele, U., Metzger, E. et al.: FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J*, 19: 359, 2000
54. Xu, J., Wu, R. C., O'Malley, B. W.: Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer*, 9: 615, 2009
55. Hart, S. M.: Modulation of nuclear receptor dependent transcription. *Biol Res*, 35: 295, 2002
56. Kallio, P. J., Pakvimo, J. J., Janne, O. A.: Genetic regulation of androgen action. *Prostate Suppl*, 6: 45, 1996
57. Kuil, C. W., Mulder, E.: Effects of androgens and antiandrogens on the conformation of the androgen receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 761: 351, 1995

58. Kuiper, G. G., Brinkmann, A. O.: Phosphotryptic peptide analysis of the human androgen receptor: detection of a hormone-induced phosphopeptide. *Biochemistry*, 34: 1851, 1995
59. Roche, P. J., Hoare, S. A., Parker, M. G.: A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, 6: 2229, 1992
60. Orphanides, G., Reinberg, D.: A unified theory of gene expression. *Cell*, 108: 439, 2002
61. Lubahn, D. B., Joseph, D. R., Sullivan, P. M. et al.: Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*, 240: 327, 1988
62. Chamberlain, N. L., Driver, E. D., Miesfeld, R. L.: The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res*, 22: 3181, 1994
63. Zhou, Z. X., Wong, C. I., Sar, M. et al.: The androgen receptor: an overview. *Recent Prog Horm Res*, 49: 249, 1994
64. Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S. et al.: Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 318: 635, 1985
65. Green, S., Walter, P., Kumar, V. et al.: Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320: 134, 1986
66. Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G. et al.: Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 237: 268, 1987
67. Misrahi, M., Atger, M., d'Auriol, L. et al.: Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 143: 740, 1987
68. Berrevoets, C. A., Doesburg, P., Steketeer, K. et al.: Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2). *Mol Endocrinol*, 12: 1172, 1998
69. Borém A, V. M.: Glossário de Biotecnologia. Editora Folha de Viçosa, 2005

70. Buchanan, G., Yang, M., Cheong, A. et al.: Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Hum Mol Genet*, 13: 1677, 2004
71. Edwards, A., Hammond, H. A., Jin, L. et al.: Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12: 241, 1992
72. La Spada, A. R., Roling, D. B., Harding, A. E. et al.: Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet*, 2: 301, 1992
73. La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B. et al.: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352: 77, 1991
74. Arbizu, T., Santamaria, J., Gomez, J. M. et al.: A family with adult spinal and bulbar muscular atrophy, X-linked inheritance and associated testicular failure. *J Neurol Sci*, 59: 371, 1983
75. Beilin, J., Ball, E. M., Favaloro, J. M. et al.: Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol*, 25: 85, 2000
76. Giovannucci, E., Stampfer, M. J., Krithivas, K. et al.: The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3320, 1997
77. Hsing, A. W., Gao, Y. T., Wu, G. et al.: Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. *Cancer Res*, 60: 5111, 2000
78. Stanford, J. L., Just, J. J., Gibbs, M. et al.: Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res*, 57: 1194, 1997
79. Castro-Nallar, E., Bacallao, K., Parada-Bustamante, A. et al.: Androgen Receptor Gene CAG and GGN Repeat Polymorphisms in Chilean Men with Primary Severe Spermatogenic Failure. *J Androl*, 2010

80. Hao, Y., Montiel, R., Li, B. et al.: Association between androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 2010
81. Lesperance, M. M., Hall, J. W., 3rd, Bess, F. H. et al.: A gene for autosomal dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment maps to 4p16.3. *Hum Mol Genet*, 4: 1967, 1995
82. Meyer, T. E., O'Brien, T. G., Andreotti, G. et al.: Androgen receptor CAG repeat length and risk of biliary tract cancer and stones. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19: 787, 2010
83. Rebbeck, T. R., Kantoff, P. W., Krithivas, K. et al.: Modification of BRCA1-associated breast cancer risk by the polymorphic androgen-receptor CAG repeat. *Am J Hum Genet*, 64: 1371, 1999
84. Roberts, R. O., Bergstralh, E. J., Cunningham, J. M. et al.: Androgen receptor gene polymorphisms and increased risk of urologic measures of benign prostatic hyperplasia. *Am J Epidemiol*, 159: 269, 2004
85. Saleem, Q., Dash, D., Gandhi, C. et al.: Association of CAG repeat loci on chromosome 22 with schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 6: 694, 2001
86. Shaik, N. A., Govindan, S., Kodati, V. et al.: Polymorphic (CAG)_n repeats in the androgen receptor gene: a risk marker for endometriosis and uterine leiomyomas. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2: 289, 2009
87. Silva Neto, B., Koff, W. J., Biolchi, V. et al.: Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest*, 26: 74, 2008
88. Teng, X. Y., Liu, G. Q., Diao, X. L. et al.: CAG repeats in the androgen receptor gene are shorter in patients with pulmonary, esophageal or bladder carcinoma and longer in women with uterine leiomyoma. *Oncol Rep*, 23: 811, 2010
89. Tong, D. Y., Deng, J., Sun, H. Y. et al.: The Relationship between CAG Repeat Length Polymorphism and Infertility Women in Southern Chinese Han Women. *J Endocrinol Invest*, 2010

90. Wittekindt, O., Jauch, A., Burgert, E. et al.: The human small conductance calcium-regulated potassium channel gene (hSKCa3) contains two CAG repeats in exon 1, is on chromosome 1q21.3, and shows a possible association with schizophrenia. *Neurogenetics*, 1: 259, 1998
91. Yaron, M., Levy, T., Chetrit, A. et al.: The polymorphic CAG repeat in the androgen receptor gene in Jewish Israeli women with endometrial carcinoma. *Cancer*, 92: 1190, 2001
92. Yu, H., Bharaj, B., Vassilikos, E. J. et al.: Shorter CAG repeat length in the androgen receptor gene is associated with more aggressive forms of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 59: 153, 2000
93. Irvine, R. A., Ma, H., Yu, M. C. et al.: Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum Mol Genet*, 9: 267, 2000
94. Kazemi-Esfarjani, P., Trifiro, M. A., Pinsky, L.: Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)_n-expanded neuropathies. *Hum Mol Genet*, 4: 523, 1995
95. Tut, T. G., Ghadessy, F. J., Trifiro, M. A. et al.: Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 3777, 1997
96. Wang, Q., Udayakumar, T. S., Vasaitis, T. S. et al.: Mechanistic relationship between androgen receptor polyglutamine tract truncation and androgen-dependent transcriptional hyperactivity in prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 279: 17319, 2004
97. Nenonen, H., Bjork, C., Skjaerpe, P. A. et al.: CAG repeat number is not inversely associated with androgen receptor activity in vitro. *Mol Hum Reprod*, 16: 153, 2009
98. Kittles, R. A., Young, D., Weinrich, S. et al.: Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: implications for prostate cancer risk. *Hum Genet*, 109: 253, 2001

99. Ribeiro, M. L., Santos, A., Carvalho-Salles, A. B. et al.: Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Braz J Med Biol Res*, 35: 205, 2002
100. Santos, M. L., Sarkis, A. S., Nishimoto, I. N. et al.: Androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer from a Brazilian population. *Cancer Detect Prev*, 27: 321, 2003
101. He, B., Kempainen, J. A., Wilson, E. M.: FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH₂-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem*, 275: 22986, 2000
102. Kang, H. Y., Yeh, S., Fujimoto, N. et al.: Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor. *J Biol Chem*, 274: 8570, 1999
103. Yeh, S., Chang, C.: Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 5517, 1996
104. Heinlein, C. A., Chang, C.: Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev*, 23: 175, 2002
105. Lemon, B., Tjian, R.: Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*, 14: 2551, 2000
106. Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V. et al.: The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87: 953, 1996
107. Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M. et al.: Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389: 194, 1997
108. Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F. et al.: Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. *Genes Dev*, 11: 738, 1997
109. Takeshita, A., Yen, P. M., Misiti, S. et al.: Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology*, 137: 3594, 1996

110. Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y. et al.: Human TAFII30 is present in a distinct TFIIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell*, 79: 107, 1994
111. Mengus, G., May, M., Carre, L. et al.: Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes Dev*, 11: 1381, 1997
112. Fondell, J. D., Ge, H., Roeder, R. G.: Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 8329, 1996
113. Freedman, L. P.: Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell*, 97: 5, 1999
114. Rachez, C., Gamble, M., Chang, C. P. et al.: The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol Cell Biol*, 20: 2718, 2000
115. Yeh, S., Miyamoto, H., Shima, H. et al.: From estrogen to androgen receptor: a new pathway for sex hormones in prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 5527, 1998
116. Ozanne, D. M., Brady, M. E., Cook, S. et al.: Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol*, 14: 1618, 2000
117. Zhang, H., Thomsen, J. S., Johansson, L. et al.: DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem*, 275: 39855, 2000
118. Gobinet, J., Auzou, G., Nicolas, J. C. et al.: Characterization of the interaction between androgen receptor and a new transcriptional inhibitor, SHP. *Biochemistry*, 40: 15369, 2001
119. Zhang, Y., Xu, P., Park, K. et al.: Orphan receptor small heterodimer partner suppresses tumorigenesis by modulating cyclin D1 expression and cellular proliferation. *Hepatology*, 48: 289, 2008

120. Johansson, L., Bavner, A., Thomsen, J. S. et al.: The orphan nuclear receptor SHP utilizes conserved LXXLL-related motifs for interactions with ligand-activated estrogen receptors. *Mol Cell Biol*, 20: 1124, 2000
121. Johansson, L., Thomsen, J. S., Damdimopoulos, A. E. et al.: The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem*, 274: 345, 1999
122. Seol, W., Chung, M., Moore, D. D.: Novel receptor interaction and repression domains in the orphan receptor SHP. *Mol Cell Biol*, 17: 7126, 1997
123. Seol, W., Hanstein, B., Brown, M. et al.: Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner). *Mol Endocrinol*, 12: 1551, 1998
124. Zhang, Y., Soto, J., Park, K. et al.: Nuclear receptor SHP, a death receptor that targets mitochondria, induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Mol Cell Biol*, 30: 1341, 2010
125. Bach, I.: The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*, 91: 5, 2000
126. Kollara, A., Brown, T. J.: Four and a half LIM domain 2 alters the impact of aryl hydrocarbon receptor on androgen receptor transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 118: 51, 2010
127. Liao, G., Chen, L. Y., Zhang, A. et al.: Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J Biol Chem*, 278: 5052, 2003
128. Kinoshita, M., Nakagawa, T., Shimizu, A. et al.: Differently regulated androgen receptor transcriptional complex in prostate cancer compared with normal prostate. *Int J Urol*, 12: 390, 2005
129. Heemers, H. V., Regan, K. M., Dehm, S. M. et al.: Androgen induction of the androgen receptor coactivator four and a half LIM domain protein-2: evidence for a role for serum response factor in prostate cancer. *Cancer Res*, 67: 10592, 2007
130. Kahl, P., Gullotti, L., Heukamp, L. C. et al.: Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res*, 66: 11341, 2006

131. Ding, X. F., Anderson, C. M., Ma, H. et al.: Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol*, 12: 302, 1998
132. Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. et al.: A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387: 733, 1997
133. Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J. et al.: The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, 387: 677, 1997
134. Bevan, C. L., Hoare, S., Claessens, F. et al.: The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol*, 19: 8383, 1999
135. Christiaens, V., Bevan, C. L., Callewaert, L. et al.: Characterization of the two coactivator-interacting surfaces of the androgen receptor and their relative role in transcriptional control. *J Biol Chem*, 277: 49230, 2002
136. Callewaert, L., Verrijdt, G., Christiaens, V. et al.: Dual function of an amino-terminal amphipatic helix in androgen receptor-mediated transactivation through specific and nonspecific response elements. *J Biol Chem*, 278: 8212, 2003
137. Ikonen, T., Palvimo, J. J., Janne, O. A.: Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem*, 272: 29821, 1997
138. Steketee, K., Berrevoets, C. A., Dubbink, H. J. et al.: Amino acids 3-13 and amino acids in and flanking the 23FxxLF27 motif modulate the interaction between the N-terminal and ligand-binding domain of the androgen receptor. *Eur J Biochem*, 269: 5780, 2002
139. Callewaert, L., Christiaens, V., Haelens, A. et al.: Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 306: 46, 2003

140. Gregory, C. W., He, B., Johnson, R. T. et al.: A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res*, 61: 4315, 2001
141. Agoulnik, I. U., Vaid, A., Bingman, W. E., 3rd et al.: Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Res*, 65: 7959, 2005
142. Agoulnik, I. U., Vaid, A., Nakka, M. et al.: Androgens modulate expression of transcription intermediary factor 2, an androgen receptor coactivator whose expression level correlates with early biochemical recurrence in prostate cancer. *Cancer Res*, 66: 10594, 2006
143. Maki, H. E., Waltering, K. K., Wallen, M. J. et al.: Screening of genetic and expression alterations of SRC1 gene in prostate cancer. *Prostate*, 66: 1391, 2006
144. Mori, R., Wang, Q., Quek, M. L. et al.: Prognostic value of the androgen receptor and its coactivators in patients with D1 prostate cancer. *Anticancer Res*, 28: 425, 2008
145. Tien, J. C., Zhou, S., Xu, J.: The role of SRC-1 in murine prostate carcinogenesis is nonessential due to a possible compensation of SRC-3/AIB1 overexpression. *Int J Biol Sci*, 5: 256, 2009
146. Zhou, H. J., Yan, J., Luo, W. et al.: SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res*, 65: 7976, 2005
147. 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*, 72: 248, 1976
148. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680, 1970
149. Medronho, G. L. W. R. R. L. K. V. B. D. M. d. C. R. d. A.: Epidemiologia
In: *Testes diagnósticos*. Edited by Atheneu. Rio de Janeiro: 1 ed, vol. 1, pp. 259-270, 2002
150. Schatzl, G., Madersbacher, S., Gsur, A. et al.: Association of polymorphisms within androgen receptor, 5 α -reductase, and PSA genes with prostate

- volume, clinical parameters, and endocrine status in elderly men. *Prostate*, 52: 130, 2002
151. Mononen, N., Ikonen, T., Autio, V. et al.: Androgen receptor CAG polymorphism and prostate cancer risk. *Hum Genet*, 111: 166, 2002
 152. Balic, I., Graham, S. T., Troyer, D. A. et al.: Androgen receptor length polymorphism associated with prostate cancer risk in Hispanic men. *J Urol*, 168: 2245, 2002
 153. Correa-Cerro, L., Berthon, P., Haussler, J. et al.: Vitamin D receptor polymorphisms as markers in prostate cancer. *Hum Genet*, 105: 281, 1999
 154. Gsur, A., Feik, E., Madersbacher, S.: Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World J Urol*, 21: 414, 2004
 155. Xue, W., Irvine, R. A., Yu, M. C. et al.: Susceptibility to prostate cancer: interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci. *Cancer Res*, 60: 839, 2000
 156. Das, K., Cheah, P. Y., Lim, P. L. et al.: Shorter CAG repeats in androgen receptor and non-GG genotypes in prostate-specific antigen loci are associated with decreased risk of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer Lett*, 268: 340, 2008
 157. Lange, E. M., Sarma, A. V., Ray, A. et al.: The androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and prostate cancer susceptibility in African-American men: results from the Flint Men's Health Study. *J Hum Genet*, 53: 220, 2008
 158. Lundin, K. B., Giwercman, A., Richthoff, J. et al.: No association between mutations in the human androgen receptor GGN repeat and inter-sex conditions. *Mol Hum Reprod*, 9: 375, 2003
 159. Edwards, S. M., Badzioch, M. D., Minter, R. et al.: Androgen receptor polymorphisms: association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. *Int J Cancer*, 84: 458, 1999
 160. Hakimi, J. M., Schoenberg, M. P., Rondinelli, R. H. et al.: Androgen receptor variants with short glutamine or glycine repeats may identify unique subpopulations of men with prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 3: 1599, 1997

161. Gao, T., Marcelli, M., McPhaul, M. J.: Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 59: 9, 1996
162. Jenster, G., de Ruiter, P. E., van der Korput, H. A. et al.: Changes in the abundance of androgen receptor isotypes: effects of ligand treatment, glutamine-stretch variation, and mutation of putative phosphorylation sites. *Biochemistry*, 33: 14064, 1994
163. Ding, D., Xu, L., Menon, M. et al.: Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate*, 62: 133, 2005
164. Silva, I. S., Morsch, D. M., Urnauer, L. et al.: Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocr Res*, 27: 153, 2001
165. Giwercman, Y. L., Abrahamsson, P. A., Giwercman, A. et al.: The 5alpha-reductase type II A49T and V89L high-activity allelic variants are more common in men with prostate cancer compared with the general population. *Eur Urol*, 48: 679, 2005
166. Lundin, K. B., Giwercman, Y. L., Rylander, L. et al.: Androgen receptor gene GGN repeat length and reproductive characteristics in young Swedish men. *Eur J Endocrinol*, 155: 347, 2006
167. Bogaert, V., Vanbillemont, G., Taes, Y. et al.: Small effect of the androgen receptor gene GGN repeat polymorphism on serum testosterone levels in healthy men. *Eur J Endocrinol*, 161: 171, 2009
168. Parsons, J. K., Carter, H. B., Platz, E. A. et al.: Serum testosterone and the risk of prostate cancer: potential implications for testosterone therapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14: 2257, 2005
169. Gann, P. H., Hennekens, C. H., Ma, J. et al.: Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 88: 1118, 1996
170. Heikkila, R., Aho, K., Heliövaara, M. et al.: Serum testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations and the risk of prostate carcinoma: a longitudinal study. *Cancer*, 86: 312, 1999

171. Hsing, A. W., Comstock, G. W.: Serological precursors of cancer: serum hormones and risk of subsequent prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2: 27, 1993
172. Dorgan, J. F., Albanes, D., Virtamo, J. et al.: Relationships of serum androgens and estrogens to prostate cancer risk: results from a prospective study in Finland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7: 1069, 1998
173. Vatten, L. J., Ursin, G., Ross, R. K. et al.: Androgens in serum and the risk of prostate cancer: a nested case-control study from the Janus serum bank in Norway. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6: 967, 1997
174. Levi, F., Lucchini, F., Negri, E. et al.: Continuing declines in cancer mortality in the European Union. *Ann Oncol*, 18: 593, 2007
175. Stewart, S. L., King, J. B., Thompson, T. D. et al.: Cancer mortality surveillance--United States, 1990-2000. *MMWR Surveill Summ*, 53: 1, 2004
176. Huggins, C., Hodges, C. V.: Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol*, 168: 9, 2002
177. Zeigler-Johnson, C. M., Rennert, H., Mittal, R. D. et al.: Evaluation of prostate cancer characteristics in four populations worldwide. *Can J Urol*, 15: 4056, 2008
178. Zhu, M. L., Kyprianou, N.: Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, 15: 841, 2008
179. Chen, Y., Sawyers, C. L., Scher, H. I.: Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 8: 440, 2008
180. De Marzo, A. M., DeWeese, T. L., Platz, E. A. et al.: Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *J Cell Biochem*, 91: 459, 2004
181. Wang, X., Yin, L., Rao, P. et al.: Targeted treatment of prostate cancer. *J Cell Biochem*, 102: 571, 2007
182. Roy, A. K., Tyagi, R. K., Song, C. S. et al.: Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction. *Ann N Y Acad Sci*, 949: 44, 2001

183. Chodak, G. W., Kranc, D. M., Puy, L. A. et al.: Nuclear localization of androgen receptor in heterogeneous samples of normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. *J Urol*, 147: 798, 1992
184. Ruizeveld de Winter, J. A., Janssen, P. J., Sleddens, H. M. et al.: Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am J Pathol*, 144: 735, 1994
185. Sadi, M. V., Walsh, P. C., Barrack, E. R.: Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer. Comparison of receptor content and response to hormonal therapy. *Cancer*, 67: 3057, 1991
186. Lee, D. K., Chang, C.: Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 4043, 2003
187. Takeda, H., Akakura, K., Masai, M. et al.: Androgen receptor content of prostate carcinoma cells estimated by immunohistochemistry is related to prognosis of patients with stage D2 prostate carcinoma. *Cancer*, 77: 934, 1996
188. Hobisch, A., Culig, Z., Radmayr, C. et al.: Androgen receptor status of lymph node metastases from prostate cancer. *Prostate*, 28: 129, 1996
189. Stanbrough, M., Leav, I., Kwan, P. W. et al.: Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10823, 2001
190. Kim, D., Gregory, C. W., French, F. S. et al.: Androgen receptor expression and cellular proliferation during transition from androgen-dependent to recurrent growth after castration in the CWR22 prostate cancer xenograft. *Am J Pathol*, 160: 219, 2002
191. Waltering, K. K., Helenius, M. A., Sahu, B. et al.: Increased expression of androgen receptor sensitizes prostate cancer cells to low levels of androgens. *Cancer Res*, 69: 8141, 2009
192. Holzbeierlein, J., Lal, P., LaTulippe, E. et al.: Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am J Pathol*, 164: 217, 2004

193. Locke, J. A., Guns, E. S., Lubik, A. A. et al.: Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*, 68: 6407, 2008
194. Montgomery, R. B., Mostaghel, E. A., Vessella, R. et al.: Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res*, 68: 4447, 2008
195. Heracek, J., Hampl, R., Hill, M. et al.: Tissue and serum levels of principal androgens in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Steroids*, 72: 375, 2007
196. Marks, L. S., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S.: Prostate tissue androgens: history and current clinical relevance. *Urology*, 72: 247, 2008
197. Mohler, J. L., Gregory, C. W., Ford, O. H., 3rd et al.: The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 10: 440, 2004
198. Nishiyama, T., Hashimoto, Y., Takahashi, K.: The influence of androgen deprivation therapy on dihydrotestosterone levels in the prostatic tissue of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 10: 7121, 2004
199. Eikenberry, S. E., Nagy, J. D., Kuang, Y.: The evolutionary impact of androgen levels on prostate cancer in a multi-scale mathematical model. *Biol Direct*, 5: 24, 2010
200. Linja, M. J., Porkka, K. P., Kang, Z. et al.: Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 10: 1032, 2004
201. Lee, D. K., Chang, C.: Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84: 41, 2003
202. Chmelar, R., Buchanan, G., Need, E. F. et al.: Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *Int J Cancer*, 120: 719, 2007
203. Culig, Z., Comuzzi, B., Steiner, H. et al.: Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 92: 265, 2004
204. Balk, S. P.: Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer. *Urology*, 60: 132, 2002

205. Fujimoto, N., Mizokami, A., Harada, S. et al.: Different expression of androgen receptor coactivators in human prostate. *Urology*, 58: 289, 2001
206. Urbanucci, A., Waltering, K. K., Suikki, H. E. et al.: Androgen regulation of the androgen receptor coregulators. *BMC Cancer*, 8: 219, 2008
207. Li, P., Yu, X., Ge, K. et al.: Heterogeneous expression and functions of androgen receptor co-factors in primary prostate cancer. *Am J Pathol*, 161: 1467, 2002
208. Gnanapragasam, V. J., Leung, H. Y., Pulimood, A. S. et al.: Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer. *Br J Cancer*, 85: 1928, 2001
209. Zhou, G., Hashimoto, Y., Kwak, I. et al.: Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth. *Mol Cell Biol*, 23: 7742, 2003
210. Chung, A. C., Zhou, S., Liao, L. et al.: Genetic ablation of the amplified-in-breast cancer 1 inhibits spontaneous prostate cancer progression in mice. *Cancer Res*, 67: 5965, 2007
211. Sleddens, H. F., Oostra, B. A., Brinkmann, A. O. et al.: Trinucleotide (GGN) repeat polymorphism in the human androgen receptor (AR) gene. *Hum Mol Genet*, 2: 493, 1993
212. Platz, E. A., Giovannucci, E., Dahl, D. M. et al.: The androgen receptor gene GGN microsatellite and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7: 379, 1998
213. Rodriguez-Gonzalez, G., Cabrera, S., Ramirez-Moreno, R. et al.: Short alleles of both GGN and CAG repeats at the exon-1 of the androgen receptor gene are associated to increased PSA staining and a higher Gleason score in human prostatic cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 113: 85, 2009
214. Isom-Batz, G., Bianco, F. J., Jr., Kattan, M. W. et al.: Testosterone as a predictor of pathological stage in clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 173: 1935, 2005

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - HPB

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) e expressão de genes que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver hiperplasia benigna da próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr. tem/teve hiperplasia prostática, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue– na ocasião de sua entrada no estudo. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata. Caso o Sr. venha a ser encaminhado a cirurgia por hiperplasia prostática, por indicação médica, independente deste trabalho, coletaremos também um fragmento do tecido prostático que será retirado para a análise de outros dois genes que podem estar associados ao desenvolvimento de hiperplasia de próstata e à forma com que ela se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras 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 hiperplasia benigna 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.

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.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, o Dr. Brasil Silva Neto e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005, 99969044, 33163671), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável:

Nome

Assinatura

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - CaP

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) e expressão de genes que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver câncer de próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr. tem/teve câncer de próstata, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue– na ocasião de sua entrada no estudo. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata. Caso o Sr. venha a ser encaminhado a cirurgia por hiperplasia prostática, por indicação médica, independente deste trabalho, coletaremos também um fragmento do tecido prostático que será retirado para a análise de outros dois genes que podem estar associados ao desenvolvimento de hiperplasia de próstata e à forma com que ela se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras 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 hiperplasia benigna 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.

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.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, o Dr. Brasil Silva Neto e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005, 99969044, 33163671), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável:

Nome

Assinatura

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver hiperplasia benigna da próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Para sabermos quais polimorfismos estão associados a esta doença, precisamos conhecer sua frequência em pessoas saudáveis para podermos comparar com os pacientes. Através das perguntas que lhe fizemos, do exame de PSA e de toque retal, consideramos que você tem baixa probabilidade de ter hiperplasia ou câncer de próstata, podendo fazer parte do estudo para a comparação. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em genes responsáveis pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata, que podem estar associados ao desenvolvimento da hiperplasia ou do câncer e à forma como ele se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras 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 câncer na próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o Sr.

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.

Eu, _____, fui informado(a) 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.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, o Dr. Brasil Silva Neto, e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005, 99969044, 33163671), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável:

Nome

Assinatura

ANEXO 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: Associação do polimorfismo CAG e GGC do receptor de androgênios e a expressão de correguladores em homens com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata

Prezado Sr.: Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar a formação desses tumores. Como o Sr. tem o diagnóstico de _____ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendado cirurgia, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em uma coleta de amostra de sangue no dia da sua cirurgia e a permitir que após 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 término da cirurgia.

Quanto à coleta sanguínea, o Sr. será submetida à coleta de 10 mL de sangue venoso, no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais e a identificação de 2 polimorfismos em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata, que podem estar associados ao desenvolvimento de tumores prostáticos. 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), o Prof. Dr. Walter José Koff e o MsC Vanderlei Biolchi (fone: 84024050). Caso o Sr. tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (fone: 21018290).

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como 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 _____

ANEXO 5

Artigo

Androgen Receptor GGC polymorphism associated with the high risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia

Vanderlei Biolchi¹, Brasil Silva Neto², Diego Bromfman Pianta¹, Milton Berger², Walter José Koff², Ilma Simoni Brum^{1*}

¹Department of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

²Division of Urology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author: Ilma Simoni Brum, MSc, PhD

Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500 – CEP 90050-170 – Porto Alegre, RS – Brazil

Phone: +55-51-3308-3559 / Fax: +55-51-3316-3656 / e-mail: ilma@ufrgs.br

Runninghead

AR GGC polymorphism associated with the risk of PCa and BPH

One to five key words

GGC Polymorphism

Abstract:

PURPOSE. Polymorphic CAG and GGC repeats in the androgen receptor (AR) can alter transactivation of androgen-responsive genes and potentially, to influence benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa) risk. We investigated the association between CAG and GGC repeat length, testosterone levels and the risk of PCa and BPH in a case-control study from a Brazilian population.

MATERIAL AND METHODS. We evaluated 344 patients; 130 PCa, 126 BPH and 88 healthy controls. DNA was extracted from peripheral leukocytes and the AR gene was analyzed by fragment analysis. Hazard Ratio (HR) and 95% confidence limits were estimated.

RESULTS. CAG and GGC mean lengths were not different between PCa, BPH and controls. The risk of developing PCa in individuals who have the long allele for GGC polymorphism (GGC >19) was 3.30 (CI95% 1.38 – 7.87) (p=0,007) compared to the short allele (GGC ≤ 19). The risk of developing PCa and BPH in individuals who have the total testosterone < 4 ng/mL were 2.799 (CI95% 1,362 – 5,754) (p=0,005) and 2.786 (CI95% 1,470 – 5,280) (p=0,002), respectively. The total testosterone level in patients with GGC >19 was significantly lower in comparison to patients with GGC ≤ 19.

CONCLUSIONS. Our data suggest that the presence of a short number of GGC polymorphic repeats in the androgen receptor gene is associated with the increased risk of developing PCa and BPH. Serum testosterone levels were lower in PCA and BPH groups when compared to control groups. Low levels of testosterone can increase the risk of PCa and BPH.

Key Words: AR, GGC, Polymorphism, Prostate Cancer, Benign Prostatic Hyperplasia

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer in men in the US. In 2009, it was estimated that in the US 192.280 new cases, and 27.360 deaths were due to this disease ². In Brazil, the mortality rate has risen from 3.73/100,000 men in 1979 to 8.93/100.000 men in 1999 and 9.47/100.000 men in 2003. The estimated incidence of prostate cancer is 52.350 new cases in 2010, with predominance in southern regions ⁸. Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) is a very frequent age-related proliferative abnormality in men. The prevalence of BPH is around 14 % at the age of 40 to 50 years, and 43% under 60 years ¹⁷.

The pathogenesis of tumor development has been closely associated with the action of steroid hormones ²⁷. The androgenic effects are mediated by testosterone and dihydrotestosterone (DHT) in the target cells and their action have been demonstrated in morphogenesis, differentiation, cell proliferation and secretions of the prostate gland. The androgen binding promotes the activation of the androgen receptor, recruitment of co-factors, promoting the transcription of hormone-dependent target genes ^{46, 51}.

The human AR gene is located in the chromosome X, at q11-q12 position, which contains 8 exons and an approximate size of 90 kb ⁶². A critical function of the AR gene product is to activate the expression of other genes. The transactivation activity lies in the N-terminal domain of the protein, encoded by exon 1. Two polymorphic microsatellites are located approximately 1.1 kb away in exon 1: a highly polymorphic CAG repeat and a less polymorphic GGC repeat ^{62, 211}.

The CAG repeat encodes a polyglutaminic tract and may vary from 8 to 31 repeats, on average 20 repeats ⁷¹. Alleles of the GGC repeat encode a polyglycinic tract and contain 4 to 21 repeats, 16 repeats being the most common allele ²¹¹.

Studies performed *in vitro* showed a negative correlation between the number of CAG and GGC repeats and the transcriptional activity of the androgen receptor: The increased number of these repeats reduces transcriptional activity in the AR whereas a reduction to zero increases its activity induces increased AR ^{62, 163}. An association between the GGC or GGN repeats [(GGT)₃GGG(GGT)₂(GGC)_n] of the AR and prostate cancer has been suggested ^{160, 212}.

Therefore, the aim of this study was to analyze the frequency of AR GGC and CAG polymorphisms and its association with testosterone levels in a sample of the male population of southern Brazil, with and without BPH or PCa and verify whether these genetic variants can be related to the development of BPH and PCa.

Patients and Methods

Study population

This case-control study was prospectively conducted at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul from September 2004 to January 2009. The study was approved by the local and national Ethics Committee and informed consent was obtained from every subject. Prostate cancer patients and prostate hyperplasia patients were selected from the Urology clinic at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Inclusion criteria were age 40-80 years old, prostate volume larger than 30g (evaluated by abdominal ultrasound to define BPH group), no past or current hormone-ablative therapy or 5 α -reductase inhibitor therapy and no other concomitant neoplasia. The patients were submitted to surgery and the diagnosis of prostatic hyperplasia was confirmed by pathological exam. Factors such as age at diagnosis, race (physician observed), tumor stage and grade, total serum PSA at diagnosis and family history were recorded. Blood was collected for polymorphism analysis and for total serum testosterone. Controls were selected from a prostate cancer prevention program performed since 2004 at the same institution. Inclusion criteria were age 40 – 80 years, prostate volume smaller than 30g, PSA value less than 2.0 ng/mL, normal digital rectal examination and no other concomitant neoplasia.

Genotyping

Genomic DNA for patients and controls was extracted from peripheral blood leukocytes. After erythrocyte lysis, leukocyte lysis was performed using 2ml of specific solution (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0), 36 μ l 10% SDS and 30 μ L of proteinase K (10 mg/mL) and incubated at 37°C for 18 hours. DNA was extracted and precipitated with 70% ethanol and re-suspended with specific buffer TE 10:0.1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 0,1 mM, pH 8.0).

PCR was carried out at a final volume of 50 μ l. One μ l of the genomic DNA was denatured at 96°C for 2 min in the presence of 20 mM Tris-HCl pH 8.4 plus 50 mM KCl and 1.5 mM

MgCl₂. After this hot start, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase was added together with the same Tris-HCl buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 μM sense and antisense primers and 0.2 mM dNTP mix. The primers used for polymorphism amplification were CAG primer 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' (forward) and 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCTCAT-3' (reverse) and GGC primer 5'-CACGCTCGCATCAAGCTGGAGAAC-3' (forward) and 5'-CACACATCAGGTGCGGTGAAGTCGCTTTCC (reverse), both sense primers were labeled with FAM fluorescent dye. Amplifications were performed using an automated thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) applying the following conditions: hot start, 2 min at 96 °C; three cycles of 40 sec at 94 °C, 30 sec at 67 °C and 20 sec at 72 °C; three cycles with the same physical conditions except for the annealing temperature, which was 64 °C; three cycles with an annealing temperature of 61 °C; three cycles with an annealing temperature of 59 °C; and 25 cycles with an annealing temperature of 55 °C. The quality of the PCR products was assessed using 1.5% agarose gel electrophoresis. Each PCR product was diluted in water (10X) for analysis, and 2 μl were mixed with deionized formamide and a fluorescent molecular weight marker [GeneMapper 500HD (ROX) Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA]. After denaturation for 1 min at 95 °C, each sample was submitted to capillary electrophoresis on an ABI 3100-Avant automated sequencer and the PCR products were analyzed with the GeneMapper software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The number of CAG and GGC repeats was calculated from the size of the PCR products, in relation to a series of standards obtained by direct sequencing of PCR products.

Total testosterone was measured using radioimmunoassay, DSL kit (Diagnostic Systems Laboratory Inc., Webster, Texas). PSA and SHBG dosing was performed by electrochemiluminescence, Elecsys 2010 kit (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim, Germany). Free testosterone was calculated by "free testosterone calculator" (<http://www.issam.ch/freetesto.htm>). Albumin was analyzed using colorimetric assay, Roche kit (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim, Germany).

Statistical analysis

Differences between means in continuous variables were analyzed by One-Way Anova test: Tukey pos-hoc multiple comparisons, and for variables without normal distribution, the Kruskal-Wallis test was used, with 95% significance. The genotype frequencies for each polymorphism between cases and controls were tested using standard χ^2 tests. Logistic regression was used to provide odds ratio (OR), 95% confidence intervals (CI) and *P*-values for the risk of each genotype with PCa and BPH. The lengths of CAG and GGC repeats were examined as categorical variables (CAG \leq 22 vs CAG $>$ 22 and GGC \leq 19 vs GGC $>$ 19). The categories were defined based on previous studies in our laboratory. Data analysis was performed using the computer software SPSS for windows (version 16.0).

Results

Characteristics of the studied population are shown in Table 1. Genomic DNA from 130 PCa patients, 126 BPH patients and 88 healthy male controls were examined to determine the number of CAG and GGC repeats. The mean age in the groups were 63.46 ± 7.03 in PCa, 62.84 ± 9.15 in BPH and 56.68 ± 8.08 in control group. PCa and BPH patients were older than in the control group ($p < 0.001$), but did not differ between them ($p = 0.823$). There was a predominance of Caucasians in all groups (83.8 % PCa, 89.7 BPH and 82.3% controls).

The mean number of GGC and CAG repeats in exon 1 of the androgen receptor was 17.92 ± 1.43 and 22.11 ± 2.89 , respectively in the control group, 18.17 ± 1.88 and 21.62 ± 2.84 in the BPH group and 18.17 ± 2.06 and 21.85 ± 3.24 in the PCa group (Table 1). No significant differences were found in GGC or CAG means between cases and controls. The frequency distribution of the number of GGC and CAG polymorphism repeats are shown in figures 1 and 2, respectively.

Based on the median values in the control group groups were classified dichotomically as to the number of GGC and CAG repeats, $GGC \leq 19$ and $GGC > 19$ and $CAG \leq 22$ and $CAG > 22$. The PCa and BPH group presented a higher frequency of genotype $GGC > 19$ repeats, which we consider a higher genotype. On this analysis, 78% of $GGC > 19$ was in the PCa group ($p = 0.004$) and 72.7% in the BPH group ($p = 0.049$) (table 2).

Knowing that age is one of the major risks in PCa and BPH development, we evaluated the hazard of the genotypes describe above using logistic regression analysis, considering age as a continuous variable in the regression model. The hazard of developing PCa in individuals who have the long allele for GGC polymorphism ($GGC > 19$) was 3.30 (CI95% 1.38 – 7.87) ($p = 0,007$) than the short allele ($GGC \leq 19$) (Table 3).

The mean values of total testosterone was 4.78 ± 1.29 ng/mL in the control group, 4.26 ± 1.45 ng/mL in the BPH group and 3.81 ± 1.35 ng/mL in the PCa group (Table 1). Total testosterone was lower in BPH ($p = 0.031$) and PCa ($p < 0.001$) when compared to control group. Total testosterone levels were not different between BPH and PCa group ($p = 0.071$).

The population studied was classified dichotomically as total testosterone levels < 4 and ≥ 4 ng/mL. The frequency distribution of total testosterone levels was different between

patients and controls. Sixty percent of the PCa group and 66.3% of BPH group presented serum total testosterone levels $< 4\text{ng/mL}$ while in the control group the frequency was 39.7 % (Table 4). When total testosterone was analyzed based on GGC repeat, mean total testosterone on $\text{GGC} \leq 19$ group was 4.36 ± 1.45 and $\text{GGC} > 19$ was 3.73 ± 1.24 ($p=0,001$) (data not shown).

We evaluated the hazard of the testosterone levels describe above to develop prostate disease using logistic regression analysis, considering age as a continuous variable in the regression model. The hazard of developing PCa in individuals who have the total testosterone $< 4 \text{ ng/mL}$ was 2.80 times higher ($p=0.005$) than total testosterone $\geq 4\text{ng/mL}$ (OR 2.799, CI% 1.362 – 5.754). The hazard of developing BPH in individuals who have the total testosterone $< 4 \text{ ng/mL}$ was 2.78 times higher ($p=0.002$) than total testosterone $\geq 4\text{ng/mL}$ (OR 2.786, CI% 1.470 – 5.280) (table 5).

The mean values of free testosterone were $8.93 \pm 2.96 \text{ ng/dL}$ in the control group, $8.30 \pm 3.30 \text{ ng/dL}$ in the BPH group and $7.81 \pm 2.83 \text{ ng/dL}$ in the PCa group (Table 1). BPH ($p=0.574$) and PCa ($p=0.187$) free testosterone levels were not different from the control group (Table 1). No difference was found between total testosterone and free testosterone levels regarding to Gleason score or tumor stage.

Discussion

The results of this study in our population support the existence of a positive association between allele length of the AR GGC microsatellite and the risk of developing PCa and BPH.

The androgen receptor is a transactivation factor that depends on the binding of a steroid hormone. This androgen-regulated transactivation activity is a key factor in the proliferation and differentiation of prostate cells. The polymorphic variation of the AR gene regulatory region, where the polymorphisms with the highest variation are located (CAG and GGC) may alter the transcriptional activity of the receptor⁶²

GGC polymorphism involvement in the development of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia has not been extensively studied. Studies on the association of AR-GGN repeat length and prostate cancer risk have produced conflicting results. As far as we know, this is the first time that this polymorphism is evaluated in the Brazilian population, looking for an association with BPH or PCa. In this study, we observed an association between GGC repeat and BPH and PCa hazard, comparing to controls when analyzing GGC >19. Edwards *et al*, analyzing 178 British Caucasian prostate cancer patients and 195 control individuals found that the relative risk of relapse for men with more than 16 GGC repeats was 1.74 (95% CI 1.08-2.79)¹⁵⁹. Rodríguez-González *et al*, analyzing 72 PCa patients and 106 controls has found that GGC alleles larger than 24 repeats were significantly less abundant in cases than in controls (8.4% vs. 21.6%, $p = 0.01$)²¹³.

Results from studies on transient transfection of reporter constructs have shown that deletion of the GGN tract resulted in either no alteration or increased or decreased AR transcriptional activity^{161, 162}. Jenster *et al* found that complete deletion of the (GGC)_n sequence had no substantial effect on AR activity¹⁶², whereas Gao *et al* found that the same mutation resulted in a diminished capacity (30% reduction) to activate the luciferase gene¹⁶¹. Ding *et al*, suggest that the effect of GGC repeat length may be more important than the effect of CAG repeat length when comparing the relative activity of different AR alleles. On that study, analyzing AR cDNA expression vectors with different GGC repeat lengths in the physiological range (13–17 GGCs), AR protein levels were inversely affected by glycine

repeat length. They suggest that hairpin stability may interfere with translation, accounting for the inverse effect of GGC repeat length on AR protein yields ¹⁶³.

In the present study no significant difference was found in the number of CAG repeats among control, BPH and PCa groups. These results corroborate some data from the literature that also did not demonstrate differences between CAG repeat means in BPH patients and controls ^{150, 151}. Association of PCa susceptibility and polymorphism in androgen receptor (AR), specially shorter CAG repeats, has been previously demonstrated ^{77, 152}. In a case-control study, involving the risk of prostate cancer in African-American men (340 controls and 140 PCa), either no difference on CAG repeat means or evidence for an association between AR CAG repeat lengths and prostate cancer risk was found ¹⁵⁷.

Studies suggest that the number of CAG and GGC repeats may be related to the ethnic group. In African-American populations and in certain African subpopulations, a mean number of repeats was demonstrated to be lower than Caucasian population ^{71, 152}, while the Asian population presented a higher mean number of repeats ⁷⁷. This might partly account for the distribution of frequencies of prostate cancer in different regions of the world. In this study, the proportion of black individuals was small and homogeneously distributed among the PCa, BPH groups and control, and that is why we did not perform a separate analysis taking this factor into account. The recording of race (or skin color) performed by the examiner or declared by the patient is not sufficient to define the patient's ancestry adequately in our population. Among the Brazilian population, it is particularly difficult to evaluate race, due to the great genetic heterogeneity found and the overlapping of genetic characteristics among Europeans, Africans and Native-Americans ⁸⁷.

A surprising finding of our study was the difference in the serum total testosterone levels in PCa and BPH group when compared to the control group and the hazard of developing PCa and BPH when the total testosterone level is < 4 ng/mL. Knowing that the serum total testosterone levels become lower with age and those patients with PCa and BPH presented an age difference comparing to the control group, we performed a correlation analysis between these age-controlled variables to eliminate possible interference of the age factor. It is known that total testosterone levels decrease along the lifetime as well it is known that the risk of PCa and BPH increase at the same time. It is unclear if AR start responding in a different way in older men than it is in young men, because the risk to develop PCa and

BPH in young men, even when testosterone levels are higher, is rare compared to older men who have low levels of testosterone. Brum *et al*, analyzing HNTEP cells proliferation treated with different androgen levels found a higher cell proliferation with low levels of testosterone ($2 \times 10^{-11} \text{M}$ and $2 \times 10^{-13} \text{M}$) and dihydrotestosterone (10^{-13}M) comparing to high levels ($2 \times 10^{-5} \text{M}$, $2 \times 10^{-6} \text{M}$, 2×10^{-9} of testosterone and 10^{-8}M of DHT) or to cells treated with control medium. In this study, the addition of hydroxyflutamide (inhibit the binding of DHT on AR) with DHT 10^{-13} , abolished the androgen induced-increase in cell number ¹⁶⁴.

We also found a significant lower total testosterone levels in patients with GGC >19. Giwercman *et al*, observed that the free testosterone index, calculated as testosterone/SHBG, was higher in men with GGN > 23 when compared to those with GGN < 23 ($P=0.057$) and GGN = 23 ($P=0.027$) ¹⁶⁵. In a second cohort study of 220 healthy young Swedish men, Lundin *et al*, found no difference in testosterone and free testosterone levels between the three groups of subjects (GGN < 23, GGN = 23 and GGN > 23) ¹⁶⁶. In a recently study, Bogaert *et al*, demonstrated a significant positive association between the GGN repeat and androgen levels in a large cohort of healthy men. However, taking into account that age, body mass index, and CAG are already in the regression model, the GGN repeat could explain only a 0.4% of the variation of both testosterone and free testosterone ¹⁶⁷.

Studies have investigated the relationship between circulating levels of androgens and PCa risk, but results have been inconclusive ^{168, 172}. In our study, we did not find difference on total and free testosterone levels and Gleason score. Other studies have reported that a low serum testosterone level is associated with advanced pathologic stage, high Gleason score, and biochemical recurrence after radical prostatectomy ^{34, 214}.

This is the first study to investigate the association between GGC repeat polymorphism and the relative hazard of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in Brazilian men. Our results suggest that specific haplotypes of AR contribute to the hazard of prostate cancer development. In conclusion, our data suggest that the presence of a longer number of GGC polymorphic repeats of the androgen receptor gene is associated with an increased hazard of developing PCa and BPH in our population and we confirm the hypothesis that lower testosterone levels increase the hazard of prostate cancer.

Acknowledgments

Grant sponsor: FAPERGS/RS; grant number 0413137, FIPE/HCPA 04243

Table 1. Demographics of the studied population (n=344).

	PCa (n=130)	BPH (n=126)	Controls (n=88)
Age (years) ^a			
Mean ± SD	63.46 ± 7.03	62.84 ± 9.15	56.68 ± 8.08
Range	46 - 75	41 - 82	41 - 75
Race (caucasians) ^a	109 (83.8%)	113 (89.7%)	73 (82.3%)
Total Testosterone (ng/mL)*	3.81 ± 1.35	4.26 ± 1.45	4.78 ± 1.29
Free Testosterone (ng/dL)*	7.81 ± 2.83	8.30 ± 3.30	8.93 ± 2.96
PSA (ng/mL) ^b	7.16 (5.66 – 10.64)	1.47 (0.69 – 3.94)	0.76 (0.55 – 1.05)
Prostate Volume (cm ³) ^b	35.30 (28.20 – 44.92)	35.68 (30.00 – 49.00)	20.00 (14.38 – 23.94)
GGC repeat			
Mean ± SD	18.17 ± 2.07	18.16 ± 1.88	17.92 ± 1.43
Median	18	18,5	18
Range	6 - 22	12 - 23	13 - 21
CAG repeat			
Mean ± SD	21.85 ± 3.24	21.62 ± 2.84	22.11 ± 2.89
Median	21.5	21	21.5
Range	13 - 31	13 - 31	16 - 30
Tumor Stage ^{a,c,d}			
p(T2)	65 (56%)		
p(T3+T4 ^e)	51 (44%)		
Gleason Score ^{a,c}			
(sum = 6 and 7(3+4))	89 (73.6%)		
(sum = 7(4+3) and ≥ 8)	32 (26.4%)		

Values are expressed as ^anumber of cases and (%), ^bmedian and percentile 25/75.

^cFor 9 (7.4%) patients pathological tumor stage and 9 (7.7%) grade stage were not available.

^dFive patients were submitted to radiotherapy treatment.

^eTwo patients are T4 tumor stage.

Table 2. Frequency distribution of genotypes GGC-19 and CAG-22, among PCa, BPH and controls.

Repeats	N	PCa n (%)	Controls n (%)	p*
GGC ≤ 19	172	93 (54.1 %)	79 (45.9 %)	0.004
GGC > 19	41	32 (78 %)	9 (22 %)	
CAG ≤ 22	132	78 (59.1 %)	54 (40.9 %)	0.553
CAG > 22	83	49 (59 %)	34 (41 %)	

	N	BPH n (%)	Controls n (%)	p*
GGC ≤ 19	178	99 (55.6 %)	79 (44.4 %)	0.049
GGC > 19	33	24 (72.7 %)	9 (27.3 %)	
CAG ≤ 22	131	77 (58.8 %)	54 (41.2 %)	0.513
CAG > 22	81	47 (58 %)	34 (42 %)	

* Value obtained using the 2x2 Chi-squared test (with correction for continuity).

Table 3. Hazard Ratio analysis for PCa and BPH - genotypes GGC-19 and CAG-22.

Repeats	N	PCa HR	CI (95%)	p*
GGC \leq 19	172	3.300	1.385 – 7.874	0.007
GGC $>$ 19	41			
CAG \leq 22	132	0.905	0.491 – 1.669	0.75
CAG $>$ 22	83			

	N	BPH HR	CI (95%)	p*
GGC \leq 19	174	2.134	0.894 – 5.096	0.088
GGC $>$ 19	32			
CAG \leq 22	128	0.891	0.488 – 1.627	0.708
CAG $>$ 22	79			

*Values obtained by logistic regression among PCa and controls corrected by age.

Table 4. Frequency distribution: Total testosterone levels < 4 and ≥ 4 ng/mL among PCa, BPH and controls.

Total Testosterone Levels	N	PCa n (%)	Controls n (%)	p*
Testosterone < 4	68	41 (60.3 %)	27 (39.7 %)	
Testosterone ≥ 4	86	26 (30.2 %)	60 (69.8 %)	< 0.001
	N	BPH n (%)	Controls n (%)	p*
Testosterone < 4	80	53 (66.3 %)	27 (33.7 %)	
Testosterone ≥ 4	101	41 (40.6 %)	60 (59.4 %)	< 0.001

* Value obtained using the 2x2 Chi-squared test (with correction for continuity).

Table 5. Hazard Ratio analysis for PCa and BPH - Total testosterone levels < 4 and ≥ 4 ng/mL.

Total Testosterone Levels	N	PCa HR	CI (95%)	p*
Testosterone < 4	68	2.799	1.362 - 5.754	0.005
Testosterone ≥ 4	86			
	N	BPH HR	CI (95%)	p*
Testosterone < 4	80	2.786	1.470 - 5.280	0.002
Testosterone ≥ 4	101			

*Values obtained by logistic regression among PCa and controls corrected by age.

Legends

Fig 1. Frequency distribution of GGC repeats in the control, BPH and PCa groups.

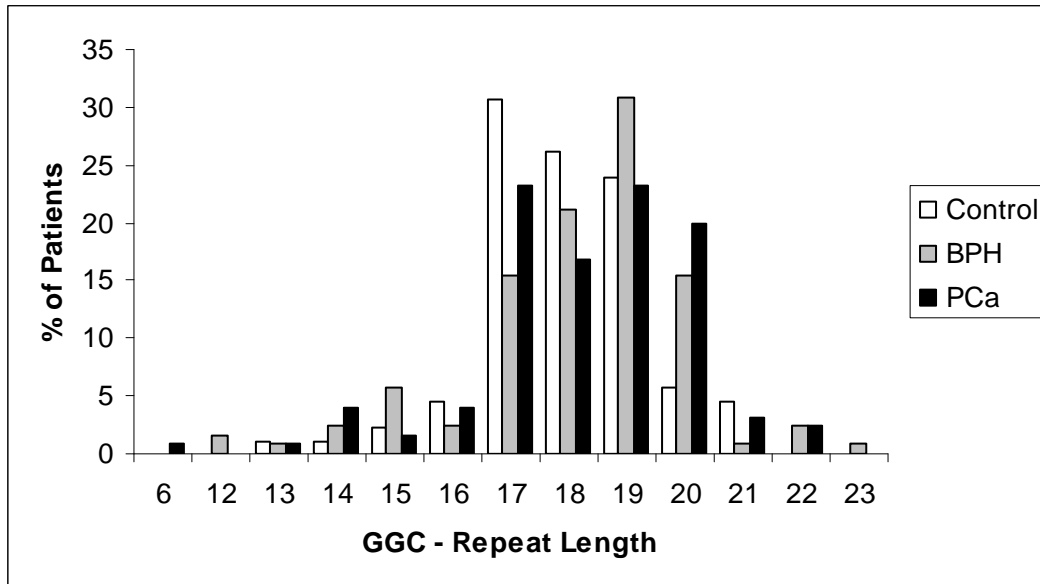


Fig 2. Frequency distribution of CAG repeats in the control, BPH and PCa groups.

