

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

AÇÕES DA DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR,
EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS, *bcl-2* E *p21* EM CÉLULAS
PROSTÁTICAS HUMANAS NÃO TRANSFORMADAS

ADRIANE POZZOBON

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre

Porto Alegre, Agosto de 2002

*" Viver é a coisa mais rara do mundo. A grande maioria das pessoas se preocupa
somente em existir."*

Oscar Wilde

AGRADECIMENTOS

Obrigada aos meus familiares e amigos pelo apoio, carinho e compreensão recebidos durante o decorrer de todo trabalho.

Agradeço especialmente a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, orientadora desta dissertação, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo carinho, compreensão, competência e disponibilidade demonstrados durante o estudo e principalmente pela sua amizade e profissionalismo que serviram como aprendizado nesta etapa da minha vida. Sou grata também à Profa. Dra. Poli Mara Spritzer pelo seu conhecimento e incentivo constantes que foram fundamentais para meu crescimento profissional.

Agradeço ao Prof.Dr. Edison Capp pela amizade e incentivo e fundamental auxílio nos processos de formatação dos escritos. Agradeço também à Profa. Débora Martinho Morsch pela amizade, carinho e ensinamentos das técnicas recebidos durante o trabalho.

Sou grata aos colegas de laboratório: Lúcia, Isabel, Rodrigo e Maria Beatriz pelo auxílio e carinho recebidos durante o trabalho. Aos alunos de iniciação científica Valderes, Guilherme e Maurício pela coleta do material e ajuda nos experimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski e o pessoal de seu laboratório. Ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem Bitencourt Júnior por permitirem usar seu laboratório para realização de algumas análises.

Sou grata à Miriam Sant'Helena por proporcionar o feliz encontro com a Profa. Dra. Ilma, além de seu apoio e amizade incondicionais.

Agradeço à Iracema Vera Soares pelo auxílio na preparação dos materiais e pelo seu carinho e apoio. Sou grata também à Idelma pelo preparo do material e por sua disponibilidade na manutenção do laboratório.

Em especial agradeço aos Serviços de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital São Lucas da PUC, Hospital Ernesto Dornelles e Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, os quais permitiram a coleta do material fundamental para o estudo.

Apoio Financeiro: CAPES, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS, FIPE

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA	14
1.2.MECANISMO DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES	16
1.3. AÇÃO DOS ANDROGÊNIOS NA PRÓSTATA.....	19
1.4. RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS (AR).....	20
1.5 O CICLO CELULAR.....	23
1.6 APOPTOSE	26
1.7 <i>bcl-2</i>	27
1.8 <i>p21</i>	29
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	34
3.2 ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	34
3.2.1 Procedimentos para obtenção de cultura de células epiteliais prostáticas humanas	34
3.2.2 Manutenção das células em cultura.....	36
3.2.3 Avaliação da proliferação celular	37

3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR.....	38
3.3.2 Quantificação do RNA.....	39
3.3.4 Síntese do cDNA.....	40
3.3.5 Oligonucleotídeos específicos.....	41
3.3.6 Protocolo geral da PCR.....	43
3.3.6.1 Programação dos ciclos da PCR.....	45
3.3.7 Padronização da PCR.....	46
3.3.7.1 Padronização da PCR para AR.....	46
3.3.7.2 Padronização da PCR para <i>bcl-2</i>	48
3.3.7.3 Padronização da PCR para o <i>p21</i>	50
3.3.8 Análise dos dados por RT-PCR.....	52
4 RESULTADOS.....	54
4.1 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	54
4.2 EXPRESSÃO DO AR, DO PROTOONCOGENE <i>bcl-2</i> E DO INIBIDOR DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS <i>p21</i> EM CÉLULAS EPITELIAIS PROSTÁTICAS HUMANAS NÃO TRANSFORMADAS.....	58
4.2.1 Expressão do AR.....	58
4.2.1.1 Análise de tempo de tratamento.....	58
4.2.1.2 Análise de diferentes concentrações de dihidrotestosterona.....	60
4.2.2 Expressão do <i>p21</i>	62
4.2.2.1 Análise de tempo de tratamento.....	62
4.2.2.2 Análise de diferentes concentrações de dihidrotestosterona.....	65
4.2.3 Expressão do protooncogene <i>bcl-2</i>	67
4.2.3.1 Análise de tempo de tratamento.....	67
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÕES.....	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

RESUMO

Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é uma condição patológica que acomete os homens na senescência e está presente em 50% da população masculina, com cerca de 85 anos de idade. A glândula prostática é alvo dos hormônios androgênicos que são responsáveis pela diferenciação e crescimento do epitélio e estroma prostáticos. Os mecanismos proliferativos da próstata envolvem uma série de fatores que operam em conjunto para manter o equilíbrio entre inibição e/ou proliferação celular. Este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos moleculares mediados por androgênio que possam estar envolvidos na proliferação de células epiteliais prostáticas humanas derivadas de HPB. As células foram incubadas com diferentes concentrações de dihidrotestosterona (DHT). Uma baixa concentração de DHT (10^{-13} M) provocou um aumento significativo na proliferação destas células. Para se verificar se o efeito proliferativo ocorre via receptor de androgênio (AR), as células foram tratadas com o antiandrogênio hidroxiflutamida e a proliferação foi inibida. A expressão do gene do AR foi avaliada por RT-PCR em diferentes tempos de tratamento e concentrações de DHT. Os níveis de mRNA do AR aumentaram significativamente nos grupos tratados com DHT. 10^{-13} M em 3, 4 e 6 horas de estímulo hormonal, sendo que um aumento marcante na expressão do AR foi observado em 4 horas de tratamento. Em relação às diferentes concentrações de DHT testadas no tempo de 4 horas (DHT. 10^{-8} , DHT. 10^{-10} e DHT. 10^{-13} M), a

expressão do AR aumentou significativamente no grupo tratado com DHT. 10^{-13} M em relação ao grupo controle. Buscando averiguar o possível papel de genes envolvidos na proliferação celular que podem ser modulados pela ação androgênica, em células epiteliais prostáticas, avaliou-se também por RT-PCR a expressão do *p21* e do *bcl-2*. A expressão gênica do *p21* foi verificada no intervalo de tempo de zero à 6 horas de tratamento com DHT. 10^{-13} M, não apresentando diferença em seus níveis de mRNA nos tempos avaliados. Quando as células foram incubadas durante 4 horas com diferentes concentrações de DHT, observou-se que a concentração mais alta (10^{-8} M) provocou um aumento significativo nos níveis de mRNA do *p21* em relação ao grupo tratado com DHT. 10^{-13} M. O gene do *bcl-2* teve sua expressão avaliada no mesmo intervalo de tempo do *p21*. Os níveis de mRNA do *bcl-2* aumentaram significativamente em 15 minutos de tratamento com DHT. 10^{-13} M em relação ao tempo zero e aos grupos tratados por 1 e 4 horas. Os dados obtidos neste trabalho indicam que baixas concentrações de dihidrotestosterona estimulam a proliferação das células epiteliais prostáticas derivadas de HPB, por uma via que parece envolver a expressão do AR, do *p21* e do *bcl-2*.

ABSTRACT

Benign Prostate Hiperplasia (BPH) is a common pathological condition in men during senescence and is present in 50% of the masculine population over 85 years of age. The prostate gland is target of the androgenic hormones responsible for the differentiation and growth of the prostate epithelium and stroma. The proliferative mechanisms of the prostate involve a series of factors that operate together to keep the balance between inhibition and/or cellular proliferation. The aim of this work was to investigate the molecular mechanisms mediated by androgen that can be involved in the proliferation of human prostate epithelial cells from patients with HPB. The cells had been incubated with different concentrations of dihidrotestosterone (DHT). A low concentration of DHT (10^{-13} M) resulted in a significant increase in the proliferation of these cells. To verify the proliferative effect of androgen receptor (AR), the cells were treated with the anti-androgen hidroxiflutamide, and the proliferation was inhibited. The expression of the AR gene was evaluated by RT-PCR, in different times of treatment and concentrations of DHT. The levels of AR mRNA had increased significantly in the groups treated with DHT 10^{-13} M in 3, 4 and 6 hours of hormonal stimulation. The greatest increase in the AR expression was observed in 4 hours of treatment. In relation to the different concentrations of DHT tested in the time of 4 hours (DHT 10^{-8} , DHT 10^{-10} and DHT 10^{-13} M), the AR expression increased significantly in the group treated with DHT 10^{-13} M in relation to the control group. The

expressions of p21 and bcl-2 were also evaluated by RT-PCR. The genic expression of p21 was verified at intervals of time from zero to 6 hours of treatment with DHT 10^{-13} M, and there was no difference in levels of mRNA in the evaluated times. When the cells were incubated during 4 hours with different concentrations of DHT, the highest concentration (10^{-8} M) resulted in a significant increase in the levels of p21 mRNA in relation to the group treated with DHT 10^{-13} M. The bcl-2 gene had also its expression evaluated in the same intervals of time. There was significant increase in bcl-2 mRNA levels in 15 minutes of treatment with DHT 10^{-13} M in relation to time zero and the groups treated for 1 and 4 hours. Data from this work indicate that low concentrations of dihydrotestosterone stimulate the proliferation of the prostate epithelial cells derived from HPB, in a way that seems involved of the AR, p21 and bcl-2 expressions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação de hormônios esteróides.....	18
Figura 2 - Ciclo celular	25
FIGURA 3 - Padronização da PCR AR	47
Figura 4 -- Padronização da PCR <i>bcl-2</i>	49
Figura 5 - Padronização da PCR <i>p21</i>	51
FIGURA 6 - Efeitos da dihidrotestosterona sobre a proliferação de HNTEP em cultura primária.	55
FIGURA 7 - Efeitos da dihidrotestosterona sobre a proliferação de HNTEP com OH-FLU em cultura primária.....	57
FIGURA 8 - RT-PCR do mRNA do AR em HNTEP.....	59
FIGURA 9 - RT-PCR do mRNA do AR em HNTEP com diferentes doses de DHT. .	61
FIGURA 10A - RT-PCR do mRNA do <i>p21</i> em HNTEP.	63
FIGURA 10B - O gráfico representa a quantificação das bandas expressa como a relação <i>p21</i> / β_2m (média \pm EP).	64
FIGURA 11 - RT-PCR do mRNA do <i>p21</i> em HNTEP com diferentes doses de DHT.	66
FIGURA 12A - RT-PCR do mRNA do <i>bcl-2</i> em células epiteliais prostáticas humanas não transformadas.	68
FIGURA 12B - Gráfico da quantificação das bandas correspondentes aos fragmentos de 284pb do <i>bcl-2</i> e 623pb da β_2m	69

LISTA DE ABREVIATURAS

A	adenosina
AR	receptor de androgênio
β_2m	beta-microglobulina
<i>bcl-2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
C	citosina
CaP	carcinoma de próstata
CDKs	quinases dependentes de ciclinas
CDKIs	inibidor de quinases dependentes de ciclinas
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DEPC	<i>diethylpyrocarbonate</i>
DHT	dihidrotestosterona
DMSO	<i>dimetyl sulfoxide</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxinucleotídeos trifosfatados
DTT	ditiotreitól
EGF	fator de crescimento epidérmico
EP	erro padrão
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ERE	elemento responsivo à esteróide
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
G	guanina
HNTEP	células epiteliais prostáticas humanas não-transformadas
H	hormônio
HPB	hiperplasia prostática benigna,
HR	complexo hormônio receptor

IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
KGF	fator de crescimento de queratinócitos
LNCaP	linhagem de linfonodo metastático de carcinoma prostático
M	molar
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
MTT	<i>dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide</i>
ng	nanograma
nM	nanomolar
OH-FLU	hidroxiflutamida
pb	pares de bases
PBS	tampão salina fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
R	receptor
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SBF	soro bovino fetal
SBF-DT	soro bovino fetal desteroídado
T	timina
TGF β	fator de crescimento transformante tipo β
UV	luz ultra-violeta
μ g	micrograma
μ l	microlitro

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

A glândula prostática é um órgão acessório do sistema reprodutor masculino. É constituída por um conjunto heterogêneo de epitélio, estroma fibromuscular e tecido conjuntivo circunjacente (Krill *et al.*, 1997, Coffey and Walsh, 1990).

A glândula prostática é conhecida por ser dependente de hormônios esteróides para seu desenvolvimento embrionário, crescimento puberal e funcionalidade secretora. Com o passar da idade ocorre um novo estágio de aumento da proliferação das células prostáticas caracterizando a patologia conhecida como hiperplasia prostática benigna (HPB). O tecido glandular envolvido na gênese da hiperplasia prostática benigna está localizado na zona de transição periuretral da próstata que encontra-se distribuída nos dois lóbulos prostáticos (McNeal, 1983).

Colombel e colaboradores analisando amostras de tecidos prostáticos normais e HPB demonstraram uma maior taxa de proliferação celular na zona de transição em tecido hiperplásico se comparado com as próstatas normais (Colombel *et al.*, 1998).

Nos estágios iniciais da patologia, a zona de transição sofre um aumento difuso com a presença de nódulos microscópicos. No estágio seguinte os nódulos microscópicos tornam-se macroscópicos alterando a anatomia original da glândula. Por fim, o último estágio da histogênese da HPB é o aparecimento de sintomas clínicos como, por exemplo, a obstrução da uretra, como resultado do global aumento da glândula (Oesterling, 1991).

Recentemente um estudo populacional e randomizado (MMAS: *Massachusetts Male Aging Study*) verificou a prevalência de HPB clínica em 1709 homens com idade entre 40 e 70 anos, observando um aumento significativo da HPB com o passar da idade. Homens de 40 a 49 anos apresentaram uma prevalência de 8,4% e na faixa etária de 60-70 anos de 33,5% (Meigs *et al.*, 2001). Em estudos anteriores já havia sido observada a incidência de HPB microscópica em 10% dos homens com uma média de idade de 30 anos, aumentando consideravelmente aos 60 anos e atingindo uma prevalência de 90% aos 85 anos de idade. A HPB macroscópica com sintomatologia clínica estava presente em 50% dos homens com cerca de 85 anos de idade (Oesterling, 1996).

O carcinoma de próstata (CaP) é a neoplasia mais comum e a segunda causa de morte em homens na América do Norte (Lópes-Otín e Diamandis, 1998). Em 1997, cerca de 41 mil norte-americanos morreram de CaP, sendo que o número de diagnósticos de CaP aumentou 30% nos últimos 25 anos e estima-se que este percentual dobre em 2030 (Ruijter, 1999). Segundo as estimativas de incidência do INCA (Instituto Nacional do Câncer) foram previstos para 2002 cerca de 25.600 novos casos de CaP no Brasil.

A alta incidência destes distúrbios proliferativos vem conduzindo a estudos que buscam compreender tais anormalidades, como o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na proliferação e diferenciação das células prostáticas.

1.2.MECANISMO DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Os hormônios esteróides produzem um amplo espectro de efeitos no desenvolvimento das células de seus tecidos-alvos.

O modelo utilizado atualmente para descrever o mecanismo de ação destes hormônios foi descrito por Schuchard *et al.* em 1993, sendo aplicável aos receptores de androgênios, estrogênios, progesterona e glicocorticóides. Segundo este modelo os esteróides atravessam a membrana celular ligando-se a receptores específicos no interior da célula ativando-os. A ativação do receptor provoca alterações conformacionais em sua estrutura que irão permitir a ligação do complexo hormônio-receptor a seqüências específicas do DNA, denominadas de elementos responsivos aos esteróides (ERE). Estes elementos responsivos correspondem a seqüências de DNA de 15 a 20 pares de bases localizados anteriormente ao sítio de início da transcrição (*upstream*) do gene responsivo a esteróides.

Após a ligação do complexo hormônio-receptor ao ERE é induzida a transcrição imediata dos chamados genes regulatórios precoces (*early gens*). A resposta dos genes precoces ocorre em poucos minutos após o estímulo esteróide. Estes genes regulatórios transcrevem mRNA para proteínas regulatórias que, por sua vez, entram no núcleo e regulam a transcrição de genes estruturais tardios (*late*

gens). Esses genes estruturais codificam mRNA para as proteínas que irão produzir o determinado efeito biológico. A figura 1 ilustra este modelo.

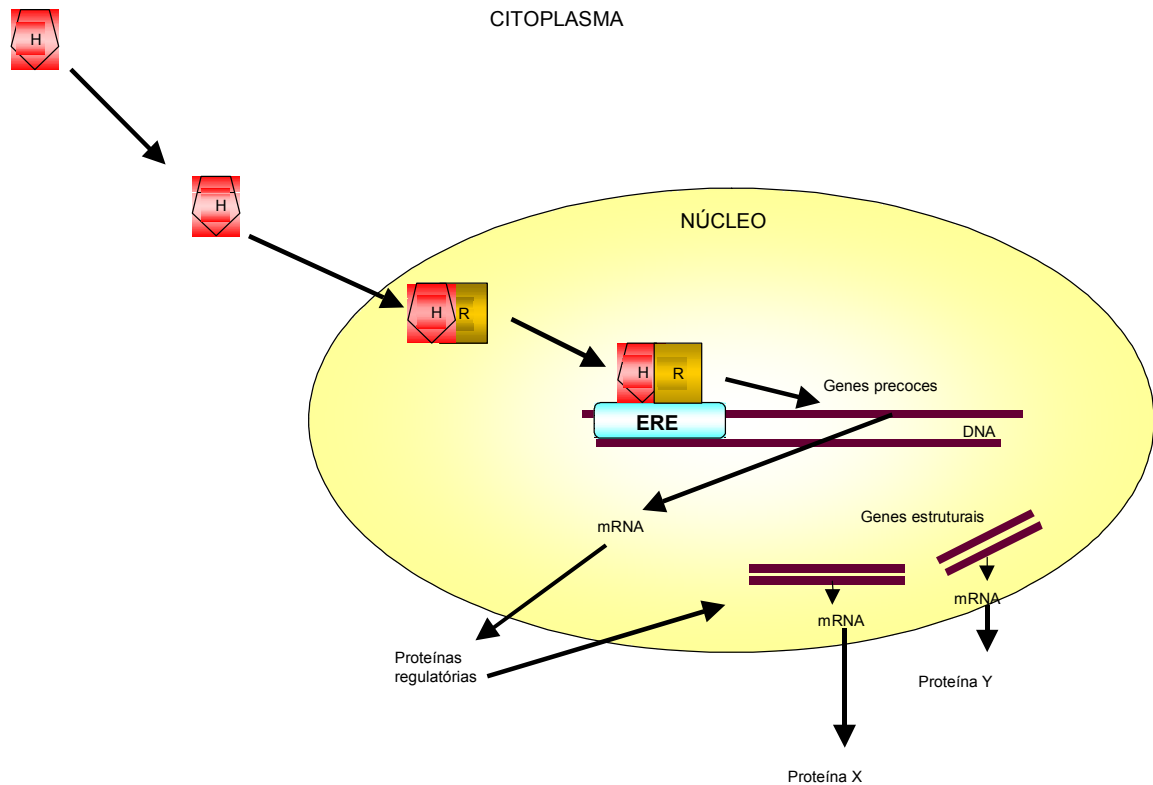


Figura 1 – Mecanismo de ação de hormônios esteróides

O hormônio esteróide (H) difunde-se para dentro da célula ligando-se à receptores específicos (R) no núcleo da célula-alvo. O complexo hormônio-receptor (HR) se liga a elementos responsivos a hormônios esteróides localizados na fita de DNA (ERE) 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 (proteína X e proteína Y) (Schuchard *et al.*, 1993).

1.3. AÇÃO DOS ANDROGÊNIOS NA PRÓSTATA

Os hormônios androgênicos são considerados pré-requisito para o desenvolvimento da glândula prostática, sendo que a privação androgênica é a terapia mais comumente usada para o tratamento de CaP e HPB (Daneshgari *et al.*, 1993). Os androgênicos agem na morfogênese, diferenciação e proliferação celular e também na produção de secreções da glândula prostática. A regulação desses processos requer a ativação de genes responsivos e dependentes da ativação do complexo androgênio-receptor (Lee *et al.*, 1995).

Os androgênicos são responsáveis pela diferenciação e crescimento de ambos epitélio e estroma prostáticos. No caso de CaP, agentes como inibidores da enzima 5α -redutase, que converte testosterona em um composto mais ativo, a dihidrotestosterona são usados como terapia (Altwein, 1998).

O efeito do androgênio na proliferação de células epiteliais prostáticas humanas em cultura já foi demonstrado em estudos *in vitro*, embora apresentando resultados controversos. Observou-se um aumento da proliferação na linhagem celular dependente de andrógeno, LNCaP, após o tratamento com dihidrotestosterona (Long *et al.*, 2000). Berthon e colaboradores não conseguiram demonstrar o efeito proliferativo androgênico em células epiteliais prostáticas normais, hiperplásicas e tumorais tratadas com diferentes concentrações de DHT (10^{-11} a 10^{-7} M)(Berthon *et al.*, 1997).

No modelo de cultura primária de células epiteliais prostáticas humanas derivadas de HPB, utilizado pelo nosso grupo de trabalho foi demonstrado que

baixas concentrações de androgênio podem estimular a proliferação celular. A administração de testosterona na concentração de $2 \cdot 10^{-10}$ e 10^{-11} M aumentou a proliferação destas células, assim como o uso de dihidrotestosterona 10^{-13} M também foi capaz de estimular significativamente a proliferação (Silva *et al.*, 2001). Em células epiteliais humanas derivadas de carcinoma de próstata, o tratamento com dihidrotestosterona aumentou a proliferação celular apresentando um efeito estimulatório máximo na concentração de 1nM e 10nM (Planz *et al.*, 2001). Krill e colaboradores em 1999, utilizando cultura de células epiteliais derivadas de HPB, não conseguiram observar um aumento proliferativo nestas células tratadas com dihidrotestosterona 10^{-8} M (Krill *et al.*, 1999).

O efeito androgênico também foi observado em células prostáticas estromais obtidas de tecido hiperplásico, nas quais a testosterona provocou um aumento na proliferação celular (Haynes *et al.*, 2001).

1.4. RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS (AR)

O receptor de androgênio é um fator de transcrição ligante-dependente que regula genes em tecidos específicos envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Pertence a superfamília de receptores intracelulares que inclui o receptor de estrogênio, glicocorticóide e progesterona, dentre outros (Tsai and O'Malley, 1994).

O gene do AR humano está localizado no cromossomo X na posição Xq11-12 de aproximadamente 90kb de comprimento. O gene é composto por 8 *exons* que codificam 3 domínios funcionais: um domínio de ligação ao androgênio, um domínio

de ligação ao DNA e um domínio de transativação. A região de *Hinge* entre o domínio de ligação com o hormônio e o domínio de ligação ao DNA contém um sinal de localização nuclear que facilita a translocação do complexo hormônio-receptor para dentro do núcleo (Zhou, 1994).

O domínio de ligação com o hormônio compreende parte do *exon* 4, e *exons* 5 a 8, terminando na extremidade carboxi terminal do receptor. Esta região é a porção do receptor mais bem conservada entre a família dos receptores de hormônios esteróides. Embora o AR possa se ligar a testosterona e dihidrotestosterona (DHT) o receptor tem maior afinidade pela DHT formando um complexo mais estável. O domínio de ligação com a fita de DNA compreende os *exons* 2 e 3, localizados entre o domínio de transativação e o domínio de ligação com o androgênio. Finalmente, temos o domínio de transativação que é codificado por um único *exon* e ocupa a extremidade amino terminal do receptor, sendo a região mais variável entre os receptores esteróides. Essa região interage com proteínas acessórias que regulam a especificidade e expressão dos genes alvos (Cude, *et al.*, 1999).

Estudos *in vivo* utilizando próstata ventral de ratos mostraram que a expressão do AR é auto-regulada pelo nível de androgênios circulantes. A expressão do AR mostrou-se aumentada em situações de privação androgênica, enquanto que a administração do hormônio diminuiu a expressão do mesmo (Kumar *et al.*, 1997; Bonkhoff, 1996).

A expressão gênica do AR pode ser regulada em múltiplos níveis por mecanismos transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais (Kallio, 1996).

A expressão do receptor de androgênio tem sido avaliada em experimentos com cultura de células prostáticas. Células epiteliais imortalizadas derivadas de HPB foram tratadas com o antiandrogênio acetato de ciproterona, que inibiu o efeito mitógeno da DHT (Blanchere *et al.*, 1998).

A localização e a ativação do AR dependente de androgênio, também foi estudada por Westernblot na linhagem de células prostáticas (LNCaP). Antes do tratamento estas células exibiam uma maior quantidade de AR no citoplasma, após 2 horas de tratamento com o androgênio sintético R1881 na concentração de 10nM, ocorreu uma translocação desse AR para o núcleo indicando ativação, ou seja, a presença de um AR funcional (Wang *et al.*, 2001).

Em cultura de células estromais tratadas com diferentes concentrações de DHT e medindo os níveis de mRNA do AR através da técnica de PCR em tempo real (*Real Time* PCR), foi demonstrado que houve uma redução de 50% da expressão do AR nas células que receberam DHT na concentração de 10^{-8} M, enquanto não houve diferenças significativas em células tratadas com DHT 10^{-10} e 10^{-12} M (Nakano *et al.*, 1999).

A atividade transcricional do AR pela técnica do gene da Luciferase foi analisada em linhagens imortalizadas de células epiteliais prostáticas (PNT1A) e tumorais (DU-145). A presença do androgênio sintético R1881 na concentração de 10^{-9} M aumentou significativamente a atividade do AR nas células PNT1A, enquanto teve pouco efeito nas células DU-145. A adição do antiandrogênio hidroxiflutamida foi capaz de provocar um decréscimo significativo na atividade do AR em células PNT1A (Avancés *et al.*, 2001).

Planz e colaboradores demonstraram a expressão do AR em cultura de células epiteliais prostáticas derivadas de pacientes com carcinoma de próstata, através da técnica de RT-PCR. Neste mesmo estudo, observou-se que o tratamento destas células com o fator de crescimento de queratinócito (KGF) resultou num aumento dos níveis de mRNA do AR e do receptor para KGF (Planz, 2001).

Estudos mais antigos já haviam sugerido que fatores de crescimento como IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina 1), KGF e EGF (fator de crescimento epidérmico) podem ativar o AR na ausência de androgênios em linhagens celulares de carcinoma prostático (Culig *et al.*, 1996). Nakano e colaboradores utilizaram o fator de crescimento FGF-10, que é secretado pelas células estromais da próstata, para estimular células prostáticas epiteliais. Este trabalho demonstrou que FGF-10 aumenta a atividade mitogênica dessas células, reforçando a idéia de um mecanismo de regulação parácrina entre estes dois tipos celulares no desenvolvimento da próstata (Nakano *et al.*, 1999).

Um outro estudo mostrou que o fator de crescimento IGF-II aumenta a expressão do AR em linhagens como LNCaP e U2OS, mas não em células estromais derivadas de HPB (Gnanapragasam *et al.*, 2000).

1.5 O CICLO CELULAR

A regulação do ciclo celular é crucial para a célula determinar se irá proliferar, se diferenciar ou sofrer apoptose. O ciclo celular é controlado por vários genes e por proteínas reguladoras chamadas de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) onde

sua função depende da associação com ciclinas específicas que ativam a subunidade catalítica das CDKs proporcionando a sua fosforilação e desfosforilação. Diferentes ciclinas são associadas com diferentes etapas através do ciclo, por exemplo, quando células quiescentes entram no ciclo, as ciclinas tipo D são induzidas para a célula progredir através da fase G1, enquanto a ciclina E é ativa no final da fase G1 e início da fase S e a ciclina B é ativa na fase de divisão M (Sherr, 1994).

Fatores positivos para a progressão do ciclo celular incluem os fatores de crescimento, fatores de transcrição, ciclinas e CDKs, enquanto que os fatores negativos são as proteínas supressoras de tumor como o *p53* e *Rb* (retinoblastoma) e os inibidores de CDKs (figura 2). Os inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CKIs) encontram-se distribuídos em 2 classes de acordo com sua similaridade estrutural e função. A primeira classe conhecida como INK4 (inibidores de CDK4) compreende o *p16*, *p15*, *p18* e *p19*, estes genes são conhecidos por sua habilidade em inibir especificamente a subunidade catalítica de CDK4 e CDK6. Do outro lado estão reunidos o *p21*, *p27* e *p57* que são capazes de inibir todos os subtipos de CDKs, estando envolvidos no desenvolvimento e diferenciação celular (Sherr e Roberts, 1999). A função mais conhecida das quinases dependentes de ciclinas tipo D que permitem a progressão da fase de intervalo G1 para a fase S de síntese de DNA no ciclo celular de mamíferos é a fosforilação da proteína Rb (pRb) que libera fatores de transcrição (E2F) para induzir a produção de genes requeridos na síntese de DNA (Kaelin, 1999; Weinberg, 1995).

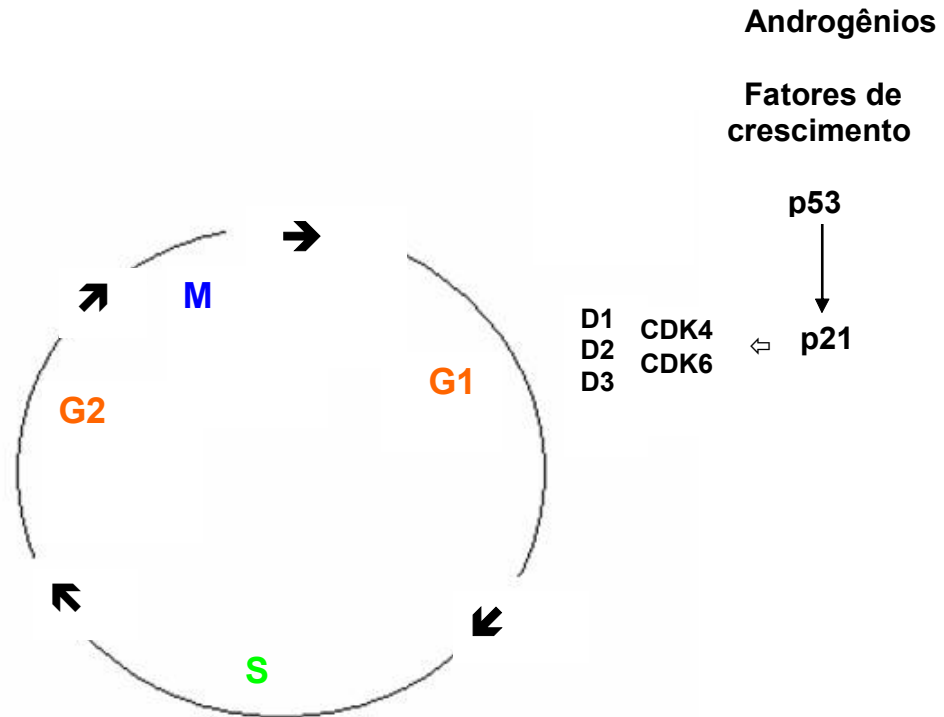


Figura 2 – Ciclo celular

Representação esquemática do ciclo celular indicando o envolvimento das ciclinas, complexos CDK4 e CDK6 na progressão através da fase G1, e a influência do p21 que pode ser modulado por estímulos externos como níveis de androgênios, fatores de crescimento e o gene *p53* (adaptado de Rivoire *et al.*, 2001).

1.6 APOPTOSE

Apoptose pode ser definida como o mecanismo molecular responsável pela morte celular em células eucarióticas. É primariamente responsável pela eliminação programada das células que acompanham o desenvolvimento embrionário e regulação do tamanho de órgãos na vida adulta (Ralf, 1992).

A apoptose tem um papel crítico na regulação da dinâmica tecidual, sendo que processos moleculares estão envolvidos neste controle de "suicídio" celular. Em um indivíduo adulto normal, o equilíbrio do crescimento prostático é mantido primariamente pelos androgênios, visto ser bem descrito na literatura que o processo de castração induz a um decréscimo na proliferação celular e um aumento na morte celular, resultando na involução da glândula.

Embora a apoptose tenha sido vista como um processo geneticamente regulado, pois, requer a expressão e subsequente ação de produtos de genes e corretores, ela pode ser disparada por agentes externos em cultura de células como: radiação física, toxinas e fatores de crescimento negativo. Numerosos fatores foram identificados por estarem implicados na regulação e modulação da apoptose, dentre eles estão os genes supressores de tumor como o *p53*, a família *bcl-2*, os protooncogenes *c-myc* e *c-jun*, outros genes como *ras*, *Rb*, *Waf1*, fatores de crescimento como *TGF- β* (fator de crescimento transformante β), EGF e IGF-1, transdutores de sinal intracelular como a proteína quinase C, Ras e GTPase, hormônios e outros inúmeros fatores (Tang and Porter, 1997).

Muitas moléculas têm sido caracterizadas em seu papel na apoptose no modelo de próstata ventral de ratos, como os produtos dos genes *c-fos*, *c-myc*, *p53*, *bcl-2*, *fas* e caspases (Buttayan *et al.*, 1999).

Na última década vários estudos buscaram investigar a taxa de proliferação celular em diferentes subpopulações de próstata humana benigna e sua relação com a desenvolvimento de HPB. A HPB pode ser caracterizada por um desequilíbrio entre a taxa de proliferação e morte celular, isto é, ou um aumento na atividade proliferativa, ou um decréscimo na morte celular.

Kyprianou e colaboradores demonstraram que o índice apoptótico de células epiteliais foi maior em tecidos normais do que em tecidos com HPB. Este mesmo estudo demonstrou a presença de uma proteína anti-apoptótica, a *Bcl-2*, que estava aumentada em tecidos HPB (Kyprianou *et al.*, 1996). Colombel *et al.* em 1998 também demonstraram a presença dessa proteína em amostras de tecido prostático hiperplásico (Colombel *et al.*, 1998).

1.7 *bcl-2*

O *bcl-2* foi primeiramente identificado como um protooncogene em linfoma de células B (Tsujiimoto *et al.*, 1985). Os protooncogenes são genes celulares normais, conhecidos como genes regulatórios precoces, cuja ativação ocorre em alguns minutos até uma hora após o estímulo e apresentam papel fundamental nos eventos que conduzem à proliferação e diferenciação celular. A expressão dos protooncogenes *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* e *c-myb* é alterada em resposta a estímulos

como fatores de crescimento, hormônios peptídicos e esteróides (Schuchard *et al.*, 1993). O gene do *bcl-2* é composto por 3 *exons* estando localizado no cromossomo 18q21 (Hesketh, 1995). Alguns genes que apresentam seqüências similares ao *bcl-2* são: *bcl-x*, *mcl-1* e *ced9*. A característica peculiar do *bcl-2* é que ele pode promover a viabilidade celular sem promover a proliferação celular em contraste com muitos genes cuja função é estimular a proliferação. A primeira indicação do efeito deste gene na viabilidade celular veio de estudos de linhagens de células hematopoiéticas que sofrem apoptose quando são privadas de fatores de crescimento e tem a morte celular abolida quando são transfectadas com *bcl-2* (Hockenbery *et al.*, 1990).

Vários estudos têm identificado a expressão deste gene nos mais variados tecidos como em carcinomas de cólon, pulmão, próstata, mama, tireóide e cavidade oral (Sinicrope *et al.*, 1995, Ikegaki, *et al.*, 1994, Krajewska *et al.*, 1996, Kapucuoglu *et al.*, 1997, Manetto, 1997, Chen *et al.*, 2000). Comparando-se a expressão do *bcl-2* em neoplasia prostática intraepitelial de alto grau (HGPIN), epitélio prostático benigno (BP) e câncer de próstata, Johnson observou um maior percentual do produto deste gene em HGPIN se comparado com outras amostras de câncer (Johnson *et al.*, 1998).

Estudos em carcinoma de próstata demonstraram a expressão do *bcl-2* associada ao receptor de androgênios (Tsuji *et al.*, 1998, Bonkoff *et al.*, 1998). Baretton analisou CaP de pacientes antes de receberem a terapia de privação androgênica e após a terapia. Este trabalho demonstrou a presença de AR em todas as amostras, além de verificar um aumento significativo na presença de *bcl-2* das amostras de pacientes que se submeteram à privação androgênica (Baretton, 1999).

Um outro estudo reforçou a função anti-apoptotática do *bcl-2* e seu papel na resistência à privação androgênica (Kajiwara, *et al.*, 1999).

Em uma linhagem de células epiteliais prostáticas dependente de androgênio (HPr-1AR) observou-se uma diminuição na expressão de *c-myc* e *bcl-2* após o tratamento com o androgênio sintético mibolerone, enquanto a expressão dos inibidores de quinase *p21* e *p27* aumentou (Ling *et al.*, 2001). Utilizando técnicas de imunohistoquímica em tecido prostático, Kólar obteve resultados indicadores de que a expressão do *p21* pode ser modulada pelo AR e pelo *bcl-2*, fato este relevante na progressão tumoral (Kólar *et al.*, 2000).

O modelo de próstata ventral de ratos é muito estudado como um modelo *in vivo* das alterações sofridas pela glândula em relação ao nível de androgênios circulantes. A castração de ratos jovens induziu apoptose e diminuiu drasticamente a expressão de *bcl-2* no lóbulo ventral da glândula na primeira avaliação posterior a castração, mas voltou a ser positivamente regulada após 7 dias de castração (Banerjee *et al.*, 2002).

1.8 p21

O gene *p21*, um inibidor de quinases dependente de ciclinas, também conhecido como WAF1 ou CIP1 codifica uma proteína que provoca a parada do ciclo celular na fase G1. Sua expressão é ativada por sinais fisiológicos como em presença de dano na fita de DNA, privação de soro ou inibição por contato. Tem-se demonstrado que o *p21* é alvo do gene supressor de tumor *p53* na sua forma normal

permitindo a parada do ciclo também na fase G1 (Macleod *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1994; Waga *et al.*, 1994). Entretanto também foi demonstrado que o *p21* pode ser induzido independentemente do *p53*, por outros fatores, como o TGF β , que é um fator de crescimento com efeito inibitório na proliferação celular (Cox *et al.*, 1997).

A expressão do *p21* foi demonstrada em próstata de ratos (Chang, *et al.*, 1999) e em várias linhagens celulares humanas como de fibroblastos pulmonares normais (WI38), carcinoma ovariano (SkOV3), câncer de mama (SkBr3) e câncer de próstata (LNCaP) (Mitchell e El-Deiry, 1999).

A expressão do *p21* também foi demonstrada em cultura de células prostáticas derivadas de hiperplasia prostática benigna. O tratamento destas células com TGF β na concentração de 5ng/ml durante 4 dias provocou um aumento significativo na expressão do *p21* avaliada por RT-PCR. Da mesma forma encontrou-se um aumento nos níveis da proteína codificada por este gene (Robson *et al.*, 1999).

Schwarze e colaboradores utilizaram linhagens de células epiteliais prostáticas (HPEC) para demonstrar o papel dos inibidores de quinase dependente de ciclinas durante as fases de proliferação, pré-senescência e senescência terminal. Através da técnica de Westernblot foram analisadas a expressão de várias proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular: Rb, ciclina D1, *p27*, *p19*, *p16*, *p57*, *p53*, *p21* e *p15*. Observou-se um decréscimo nos níveis de pRb, ciclina D1, *p19*, ao contrário do *p53*, *p21* e *p15* que estavam aumentados no período de pré-senescência, sugerindo o envolvimento destes na senescência celular (Schwarze *et al.*, 2001).

Para verificar o efeito androgênico no ciclo celular, Lu *et al.* demonstraram que o *p21* é alvo direto da ação androgênica em linhagens tumorais de células epiteliais prostáticas (LNCaP). Nesse trabalho, a administração do agonista androgênico (R1881) na concentração de 10^{-8} M provocou um aumento nos níveis de mRNA do *p21* após 2 horas de estímulo hormonal, permanecendo por 48 horas, entretanto não se detectou a presença de *p21* na linhagem independente de androgênio PC-3. Experimentos de cotransfecção indicaram a presença de um elemento responsivo ao androgênio (ERA) no fragmento promotor do *p21* (Lu *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000).

O aumento da expressão do *p21* também foi encontrado nas células imortalizadas HPr-1AR responsivas ao androgênio. O nível dessa proteína aumentou substancialmente após 24 horas de estímulo androgênico, em contrapartida, nas células HPr-1 não responsivas ao androgênio, a expressão dessa proteína também aumentou (Ling *et al.*, 2001). Contrariando estes resultados, um outro grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento androgênico (10nM) em células LNCaP aumentou os níveis do AR, mas diminuiu a expressão do *p21* (Wang *et al.*, 2001).

O envolvimento conjunto do AR, *bcl-2* e *p21* no mecanismo proliferativo das células epiteliais prostáticas humanas induzido por androgênio tem sido avaliado em trabalhos recentes, mas os resultados obtidos são controversos o que demonstra que o conhecimento adquirido é muito pequeno, principalmente no que diz respeito aos mecanismos moleculares envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular. Portanto, é necessário um número maior de estudos que avaliem a expressão destes genes no desenvolvimento das patologias prostáticas,

especialmente em células ainda não transformadas, como é o caso da HPB. Desta forma poderemos conhecer melhor a fisiologia da glândula prostática e buscar entender os mecanismos moleculares que levam à alterações proliferativas desta glândula em diferentes fases da vida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as ações da dihidrotestosterona sobre a proliferação celular e expressão gênica do AR, *bcl-2* e *p21* em células prostáticas humanas não transformadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar os efeitos de diferentes concentrações de dihidrotestosterona sobre a proliferação celular no modelo de cultura de células epiteliais prostáticas humanas.
- ❖ Verificar se as células epiteliais prostáticas expressam o *bcl-2* e o *p21* nesse modelo de cultura.
- ❖ Avaliar os níveis de mRNA do AR, *bcl-2* e *p21* nas células epiteliais prostáticas em diferentes tempos de estímulo androgênico.
- ❖ Verificar se os níveis de mRNA do AR e do *p21* são alterados pelo tratamento com diferentes concentrações de dihidrotestosterona.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Ensaio Experimental

3.2 ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

3.2.1 Procedimentos para obtenção de cultura de células epiteliais prostáticas humanas

O tecido prostático foi obtido de 29 pacientes masculinos com idade média de 65 anos, submetidos à prostatectomia aberta por diagnóstico de hiperplasia benigna da próstata (HBP). Na sala de cirurgia a peça era separada, parte para o exame anatomo-patológico e o restante dividido em fragmentos de $\pm 1,5 \text{ cm}^3$, os quais eram acondicionados em frasco estéril contendo solução salina com sais de Hank's (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) e kanamicina 0,5mg/ml (Sigma Chem Co, St Louis, MO,USA), e imediatamente transportados ao laboratório acondicionados em baixa temperatura.

No laboratório, em capela de fluxo laminar, realizava-se uma dissecação cuidadosa no tecido para retirar coágulos e tecido fibroso (cápsula). O material era reduzido a fragmentos menores, lavado quatro vezes em solução de Hank's,

transferido para um frasco de vidro pesado previamente e determinado o peso do tecido. Após a pesagem, adicionava-se a este frasco solução de Hank's e o tecido era armazenado a 4°C por 12 a 24 horas para posterior dissociação.

Após a fragmentação o tecido era submetido à dissociação enzimática durante 3 horas a 37°C. O meio de dissociação era preparado com solução de Hank's e a enzima colagenase tipo IA (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA) (7,5mg/g de tecido). O volume total de meio de dissociação foi calculado em função do peso do tecido a ser digerido, mantendo-se uma relação de 50ml de meio para cada 20g de tecido. O processo de dissociação foi realizado em Erlenmeyer especial para digestão enzimática, estando sob constante agitação.

Após a dissociação enzimática, a ação da colagenase era inibida pela adição de igual volume de solução de Hank's. Esta suspensão celular era vertida em filtros de nylon de 250 e 150 micra (Polylabo, Strasbourg, France) para reter porções de tecido não digeridas. O filtrado era centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos, e o precipitado ressuspendido em solução de Hank's. As células epiteliais eram separadas das células estromais em filtro de nylon de 60 micra (Polylabo Strasbourg, France), ficando retidas no filtro as células epiteliais. O filtro contendo as células epiteliais era lavado em solução de Hank's duas vezes e esta solução centrifugada novamente durante 10 minutos a 1500 rpm. Na etapa final o precipitado era ressuspendido em meio de cultura 199 (Gibco BRL Grand Island, N.Y,USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL Grand Island, N.Y,USA) para ser semeado em placas de cultura. O filtrado contendo as células

estromais foi utilizado para outros experimentos de estudos de proliferação que não fazem parte deste trabalho.

As células epiteliais em suspensão, antes do plaqueamento, foram submetidas a um teste de viabilidade. Eram coradas com azul de Tripán e contadas em hemocítômetro. Em seguida, eram distribuídas em placas de plástico estéreis do tipo multiwell (Nunclon, Nalge Nunc Intern., Denmark) numa concentração de 2×10^4 células/ml para a técnica de proliferação e/ou em placas de cultura de 35mm (Nunclon, Nalge Nunc Intern., Denmark) numa concentração de 1×10^5 células/ml para a técnica de extração de RNA. As células eram incubadas em estufa (NuAire Inc., Minesota, USA) a 37°C com atmosfera úmida e adição automática de 3% CO_2 .

3.2.2 Manutenção das células em cultura

As células em cultura eram observadas a cada 48 horas em microscópio invertido (Carl Zeiss Jena, Germany), antes de ser efetuada a troca de meio de incubação. A primeira troca do meio de cultura das células epiteliais era realizada 48 horas após a semeadura para facilitar a adesão das células nas placas, sendo este considerado o dia zero. Após este período de aderência e equilíbrio, as células eram mantidas em meio de cultura suplementado com SBF e tratadas de acordo com o protocolo experimental.

3.2.3 Avaliação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pela técnica do MTT (*dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide*) (Untergasserr *et al.*, 1999; Kyle *et al.* 1997) adaptada para nosso modelo de cultura. As células foram plaqueadas em pacas multiwell de 24 poços numa densidade de $2 \cdot 10^4$ células/ml de meio de cultura sendo incubadas inicialmente com 300 μ l de meio 199 com 10% SBF, após 24 horas o volume do meio era completado para 500 μ l.

No dia zero, quando se efetua a primeira troca de meio as placas eram divididas em grupos: T"0" (sem troca de meio), controle suplementado com 5% de SBF desteroideado e tratado com diferentes concentrações de androgênio, sendo avaliadas no 3º e 6º dia de cultura.

Nos dias de avaliação era retirado 50 μ l do meio de cultura e adicionado 50 μ l de uma solução de 5mg/ml de MTT (Sigma Chem. Co. St Louis, MO, USA) diluído em PBS (salina tampão fosfato) com pH de 7,2 e incubava-se por 4 horas à 37°C. O MTT é um sal tetrazolium reduzido a formazan pelo sistema mitocondrial succinato-tetrazolium redutase. A proliferação das células resulta em um aumento da atividade do sistema mitocondrial que conduz a um aumento na quantidade de formazan formado. A coloração produzida nessa reação é medida por densidade óptica sendo diretamente proporcional ao número de células viáveis na placa.

Após as 4 horas de incubação aspira-se todo o meio da placa ficando o formazan retido no fundo da placa. Adiciona-se 100 μ l de DMSO (*dimetyl sulfoxide*)

por poço, transfere-se este volume para placas de 96 poços e mede-se a densidade óptica em uma leitora de ELISA no comprimento de onda de 540 nm.

3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR

Os níveis de mRNA do AR, *bcl-2* e *p21* foram avaliadas indiretamente, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir da transcrição reversa (RT), ou simplesmente RT-PCR. O princípio desta técnica é a síntese de um DNA complementar ao mRNA (cDNA), cujos fragmentos específicos homólogos à seqüência do mRNA que codifica cada proteína em estudo podem ser amplificados por PCR e semi-quantificados (Rappole *et al.*, 1988).

3.3.1 Extração do RNA

As células foram cultivadas em placas de 35 mm, sendo inicialmente incubadas com 1ml de meio de cultura suplementado com 10%SBF. Após 24 horas o volume era completado para 2ml. As células eram mantidas por cerca de 4 dias em cultura. No dia da extração do RNA as placas foram divididas em grupos T"0", controle com 5% de SBF desteroideado e tratados com androgênio.

Antes de receberem os tratamentos as células eram privadas de SBF por 4 horas para entrarem num estágio quiescente. Após as células receberem as diferentes condições de tratamento, eram lavadas duas vezes com 1ml de PBS e lisadas diretamente nas placas com solução de fenol e isotiocianato de guanidina

(Trizol, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) usando 1ml de trizol/10cm². O método de extração de RNA total pelo trizol é uma adaptação do método original descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). A solução contendo o lisado de células era transferida para tubos de microcentrifuga e incubada por 5 minutos a 15-30°C. Eram adicionados 0,2ml de clorofórmio por ml de trizol e as amostras agitadas vigorosamente por 15 segundos. A seguir, eram incubadas por 2-3 minutos a 15-30°C e centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A amostra era separada em fase orgânica (fenol-clorofórmio), interface e fase aquosa contendo o RNA. A fase aquosa era transferida para tubos novos e identificados, onde o RNA foi precipitado com a adição de álcool isopropílico (0,5ml/ml de trizol). As amostras eram armazenadas a -20°C por 24 horas ou incubadas a 15-30°C por 10 minutos e centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado era lavado com etanol 75%, adicionando 1ml de etanol/ml de trizol. As amostras foram agitadas no vórtex e centrifugadas a 7500 rpm, 5 minutos a 4°C. O sobrenadante era vertido e o precipitado seco à temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA era dissolvido em água ultra pura tratada com DEPC (*diethylpyrocarbonate*) e incubado por 10 minutos a 60°C. Após este procedimento o RNA era quantificado e as amostras eram armazenadas para posterior utilização.

3.3.2 Quantificação do RNA

O precipitado de RNA fora diluído em 15-20µl de água com DEPC. Para a quantificação, alíquotas de 1µl da solução de RNA das amostras eram diluídas em 499µl de água DEPC e lidas em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi

considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm era superior a 1,6. Considerando que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 μ g de RNA por ml de solução, a concentração de RNA na solução original era calculada pela fórmula:

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

onde A= absorvância e D= diluição da alíquota usada para a quantificação. Por exemplo, para 1 μ l da solução de RNA em 500 μ l de água.

$$D = 500/1 = 500$$

3.3.4 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA era feita a partir de 2 μ g ou 1 μ g de RNA total, utilizando oligonucleotídeos (*primers*) complementares à cauda poli-A característica do mRNA, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração do mRNA corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, estimou-se que 2 μ g de RNA total dariam origem a 40ng de cDNA e 1 μ g a 20ng de cDNA. O RNA era inicialmente desnaturado a 65°C por 5 minutos juntamente com o

primer e os desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs). Em seguida adiciona-se uma mistura contendo tampão Tris-HCl 20mM pH 8,4 com KCl 50mM, cloreto de magnésio 25mM 10mM e ditioneitol (DTT) 0,1M sendo incubado por 2 minutos a 42° C. Em seguida era incubado com a enzima transcriptase reversa a 42°C por 50 minutos. Após nova desnaturação a 70°C por 15 minutos, a mistura era incubada com a enzima Rnase H de *E. coli* por 20 minutos a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 20ul que era armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

3.3.5 Oligonucleotídeos específicos

Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação dos fragmentos de cDNA específicos para cada mRNA em estudo foram desenhados a partir da seqüência publicada de cada gene, obedecendo aos seguintes critérios:

- ❖ 18 a 30 nucleotídeos;
- ❖ quando o gene possuía mais de um *exon*, os *primers* eram posicionados preferencialmente nas áreas de transição *intron-exon*, para inviabilizar a amplificação indesejada de DNA genômico;
- ❖ a proporção de G-C foi mantida entre 50 e 60% e equilibrada em cada par de *primers*;

- ❖ a extremidade 3' foi preferentemente ocupada por C ou G, para fortalecer a hibridização neste ponto crítico;
- ❖ a temperatura de fusão TM calculada para um *primer* era semelhante à do seu par;
- ❖ evitaram-se seqüências que resultassem em complementariedade dos *primers* *sense* e *antisense*, para inibir a formação de dímeros

A tabela 1 resume a localização e a seqüência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho, bem como o tamanho dos fragmentos de cDNA amplificados. Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Life Technologies Gibco BRL.

Tabela 1 - Características dos primers sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA.

Gene	Nucleotídeos	Sequência sintetizada	Fragmento	Ref.
<i>β₂m</i>				
<i>sense</i>	943-1356	5' ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG 3'	623pb	Taplin, 1995
<i>antisense</i>	3826-3850	5' AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'		
AR				
<i>sense</i>	2045-2068	5' CATGGTGAGCAGAAGTGCCCTATC 3'	400pb	Taplin, 1995
<i>antisense</i>	2387-2409	5' TCCCAGAGTCATCCCTGCTTCAT 3'		
<i>p21</i>				
<i>sense</i>	80-97	5' CTCAG7AGGAGGCGCCATG 3'	517pb	Robson, 1999
<i>antisense</i>	596-579	5' GGGCGGATTAGGGCTTCC 3'		
<i>bcl-2</i>				
<i>sense</i>	431-450	5' GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA 3'	284pb	Chen, 2000
<i>antisense</i>	715-734	5' AGGCACCCAGGGTGATGCAA 3'		

3.3.6 Protocolo geral da PCR

As reações de PCR eram feitas num volume final de 50µl seguindo uma adaptação do protocolo sugerido pela Invitrogen (Life technologies). As amostras de cDNA (2µl, correspondente 2ng de cDNA) eram inicialmente desnaturadas a 94°C

por 2 minutos na presença de tampão Tris-HCl 20mM pH 8,4 com KCl 50mM e cloreto de magnésio 50mM. Esse procedimento, conhecido como *hot start*, tem por objetivo desnaturar estruturas secundárias que, submetidas à ação da polimerase, resultariam na amplificação de fragmentos indesejados. Em seguida, os tubos eram imersos em gelo e recebiam 10 μ l de uma solução com as mesmas concentrações de tampão e MgCl₂, acrescida dos *primers sense* e *antisense*, da mistura de dNTPs e da enzima *Taq DNA Polimerase*. Os volumes e as concentrações finais dos reagentes utilizados na PCR estão relacionados na tabela 2.

Tabela 2 - indica o protocolo geral para as reações de PCR, utilizando *hot start*.

	Mix Inicial	Pós- <i>Hot Start</i>	Vol. Final	Conc. final
Água	32,8 μ l	3,45 μ l	38,25 μ l	-
Tampão 10x	4 μ l	1 μ l	5 μ l	1x
MgCl ₂ 50mM	1,2 μ l	0,3 μ l	1,5 μ l	1,5mM
dNTP mix (10mM cada)	-	1 μ l	1 μ l	0,2mM
<i>Primer1</i> (10 μ M)	-	2 μ l	2 μ l	0,4 μ M
<i>Primer 2</i> (10 μ M)	-	2 μ l	2 μ l	0,4 μ M
cDNA	2 μ l	-	2 μ l	1:25
Taq (5UI/ μ l)	-	0,25 μ l	0,25 μ l	25mUI/ μ l
Volume Final	40 μ l	10 μ l	50 μ l	-

Os volumes se referem a cada reação de 50 μ l.

3.3.6.1 Programação dos ciclos da PCR

As reações de PCR eram realizadas em um termociclador. Adotou-se em todos os casos a temperatura de 94°C para desnaturação e de 72°C para extensão. A temperatura de hibridização (*annealing*) dos *primers*, a duração de cada etapa e o número de ciclos eram padronizados para cada fragmento a ser amplificado. Os protocolos utilizados neste trabalho estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 - Programação adotada para os ciclos de PCR

Gene	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Ciclos	Extensão final	Ref
AR	94°C 40s	55°C 50s	72°C 1min	35	72°C 7min	Taplin,1995
<i>p21</i>	94°C 1min	57°C 50s	72°C 1min	35	72°C 5min	Robson,1999
<i>bcl-2</i>	94°C 1min	59°C 45s	72°C 45s	35	72°C 5min	Chen, 2000
<i>β2m</i>	94°C 1min	55°C 1min	72°C 1min	30	72°C 5min	Taplin,1995

Os protocolos foram ajustados a partir do modelo proposto na referência bibliográfica citada.

3.3.7 Padronização da PCR

As reações de PCR foram padronizadas com cDNAs sintetizados a partir de 1µg de RNA total, utilizados nas curvas de avaliação de tempo de expressão e diferentes concentrações de dihidrotestosterona.

3.3.7.1 Padronização da PCR para AR

Os *primers* utilizados para amplificação do receptor de androgênio estão localizados respectivamente no *exon A*, *primer sense* e no *exon C primer antisense* (Tapplin *et al.*, 1995). O transcrito por estes *primers* corresponde a 400pb.

Dados anteriores do nosso laboratório (Silva, 1998) demonstraram que é possível a amplificação deste fragmento do AR a partir de um cDNA sintetizado com 2µg de RNA total, observando um aumento progressivo do produto amplificado de 1 a 4 ng de cDNA. Neste estudo optou-se pelo uso de 2ng de cDNA sintetizado a partir de 1µg de RNA total para a amplificação do gene do receptor de androgênio.

A figura 3 mostra que o número de ciclos necessários para amplificar o fragmento de 400pb do AR a partir de 2ng de cDNA, foi de 30 ciclos aumentando progressivamente até 45 ciclos. Com base nestes dados optou-se por trabalhar com 35 ciclos para verificar os níveis de mRNA do AR sob diferentes condições experimentais.

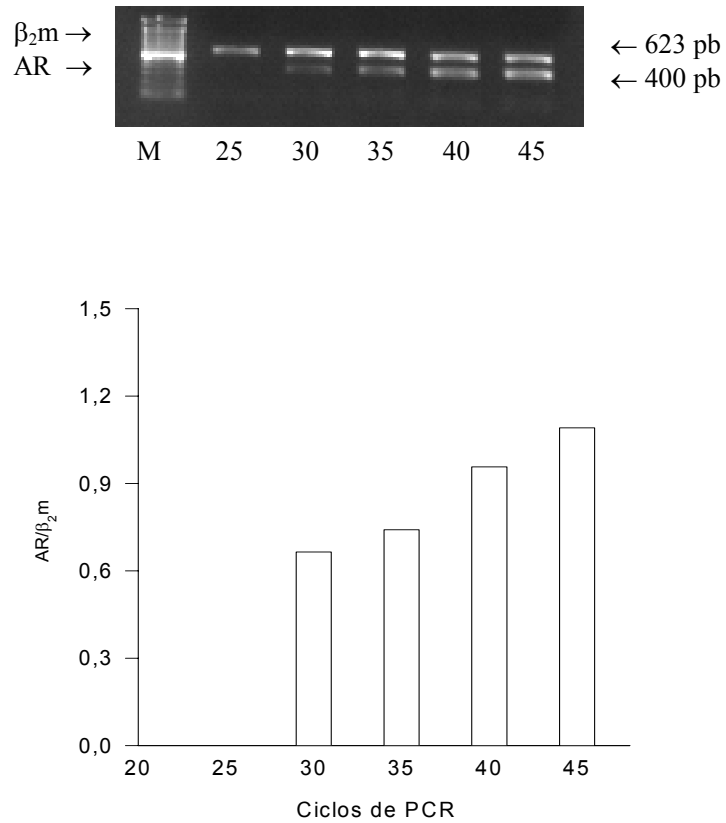


FIGURA 3 - Padronização da PCR AR

Padronização da reação de PCR duplo para determinação dos níveis de mRNA do AR em células prostáticas humanas não transformadas. A curva do número de ciclos foi feita com 2ng de cDNA de tecido prostático não transformado. As barras representam a relação AR/ β_2m (400pb/623pb).

3.3.7.2 Padronização da PCR para *bcl-2*

Os *primers* do *bcl-2* foram desenhados para amplificar um fragmento de 284 pb. Conforme a padronização do AR, utilizou-se 2ng de cDNA para amplificar este fragmento.

A figura 4 indica que o número de ciclos necessários para a amplificação do gene do *bcl-2* é de 35 ciclos, demonstrando progressivo aumento com 45 ciclos. Baseado nestes dados e de acordo com a referência (Chen *et al.*, 2000) optou-se por utilizar 35 ciclos para avaliar a expressão do *bcl-2* nas células epiteliais prostáticas tratadas com dihidrotestosterona.

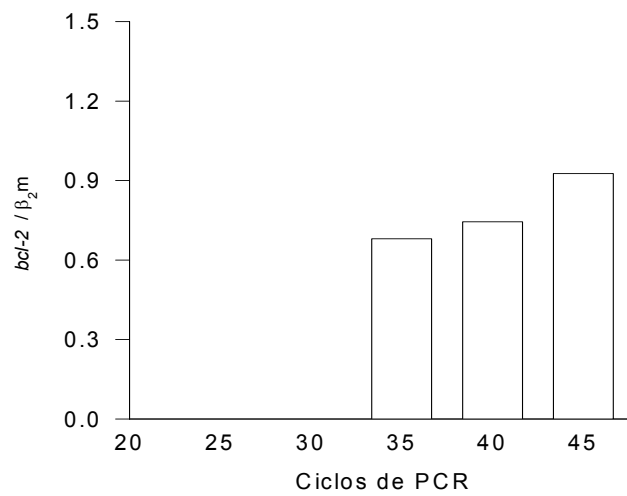
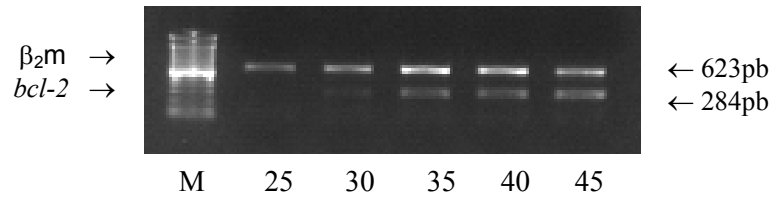


Figura 4 - Padronização da PCR *bcl-2*

Padronização da reação de PCR duplo para determinação dos níveis de mRNA de *bcl-2* em células prostáticas humanas não transformadas. A curva do número de ciclos foi feita a partir de 2ng de cDNA de tecido prostático. As barras representam a relação *bcl-2*/ β_2m (284pb/ 623pb).

3.3.7.3 Padronização da PCR para o p21

Os *primers* desenhados para o gene do *p21* amplificam um fragmento de 517 pb. Da mesma forma que o AR e o *bcl-2*, utilizou-se 2 ng de cDNA para amplificar este fragmento. A figura 5 mostra amplificação do fragmento do a partir de 30 ciclos, aumentando progressivamente com 45 ciclos. Com base nestes dados optou-se por trabalhar com 35 ciclos para amplificar as amostras, dado este que está de acordo com a referência dos *primers* (Robson *et al.*, 1999).

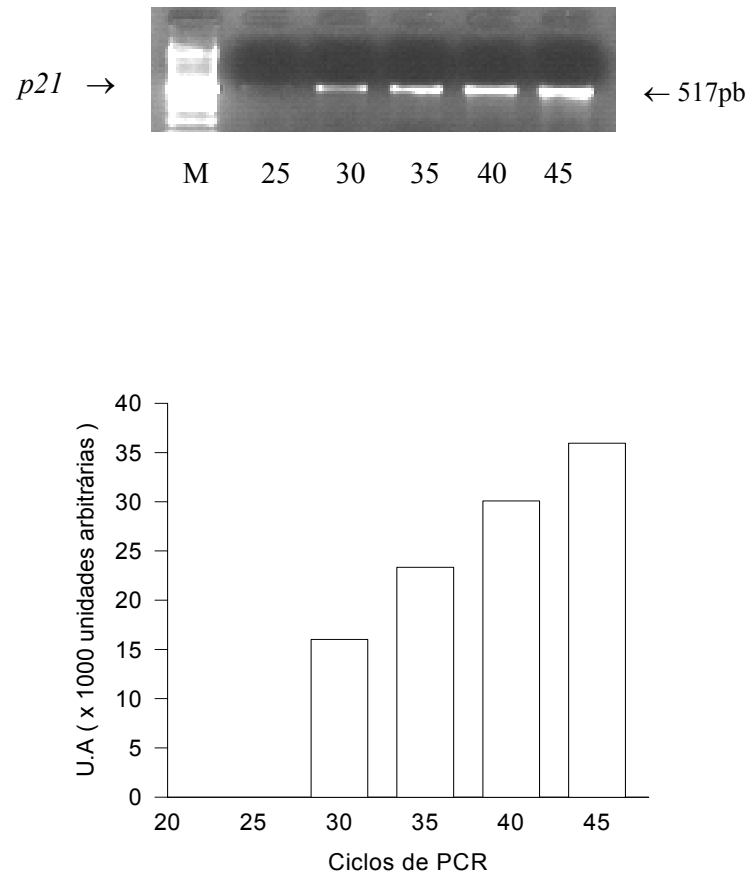


Figura 5 - Padronização da PCR *p21*

Padronização da reação de PCR simples para o número de ciclos usados na avaliação da expressão de *p21* em células prostáticas humanas não transformadas. A curva do número de ciclos foi feita a partir de 2ng de cDNA de tecido prostático. As barras representam a densitometria das bandas de 517pb, expressa em unidades arbitrárias

Para eliminar qualquer diferença de massa existente entre as amostras o que poderia alterar os resultados, todas elas também foram amplificadas para a β_2 -microglobulina, um gene constitutivamente expresso no homem e que não sofre alterações por estímulos hormonais.

O gene da β_2 -microglobulina possui 4 *exons*. O *primer sense* está situado entre o primeiro e o segundo *exon*, e o *primer antisense* encontra-se no quarto *exon*, delimitando um fragmento de 623pb.

Neste estudo a amplificação das amostras para o fragmento da β_2 -microglobulina seguiu a padronização de dados anteriores do nosso grupo, utilizando 30 ciclos de PCR (Silva, 1998).

3.3.8 Análise dos dados por RT-PCR

A análise da expressão do AR, do protooncogene *bcl-2* e do *p21* por RT-PCR foi realizada em um mínimo de 3 experimentos com culturas celulares obtidas de doadores diferentes. As reações de PCR para os genes do AR e do *bcl-2* foram processadas junto com os *primers* da β_2 -microglobulina, enquanto que as reações para o *p21* foram efetuadas separadas dos *primers* da β_2 -microglobulina, mas analisadas no mesmo gel de agarose.

Os resultados da expressão gênica foram representados com a imagem do gel e graficamente como média \pm EP (erro padrão) da relação gene/ β_2 m a partir da leitura densitométrica das respectivas bandas em unidades arbitrárias.

3.4 Análise Estatística

Os dados de proliferação e RT-PCR apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, portanto foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA).

3.5 Considerações Éticas

O presente projeto de pesquisa (99001/ 2000) foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em seus aspectos científicos e éticos.

A coleta do material foi possível através de uma colaboração com os Serviços de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital São Lucas ,Hospital Ernesto Dorneles e Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células epiteliais prostáticas humanas em cultura primária foram cultivadas em monocamada, conforme descrito em material e métodos. O tratamento com dihidrotestosterona foi iniciado 48 horas após o plaqueamento, respeitando o período de adesão e equilíbrio das células. As células foram divididas em cinco grupos, sendo utilizados 5 ou 6 poços da placa multiwell por grupo distribuídos da seguinte forma: tempo "0"(células sem troca de meio), grupo controle (células incubadas com meio 199 suplementado com 5% de SBF desteroídado) e grupos tratados, compostos por meio controle acrescidos com dihidrotestosterona nas concentrações de 10^{-13} , 10^{-10} e 10^{-8} M. A proliferação foi avaliada no dia "0", 4° e 6° dias de cultura através da medida da atividade mitocondrial pela técnica do MTT. Os experimentos foram realizados 3 vezes, com células obtidas de pacientes diferentes a cada experimento. Os resultados estão expressos como média \pm EP de 3 experimentos analisados por ANOVA, seguida de teste complementar de Duncan.

A figura 6 ilustra o efeito da dihidrotestosterona sobre a proliferação celular, mostrando que no 4° dia a dihidrotestosterona na concentração de 1×10^{-13} M estimulou significativamente a proliferação em relação ao T"0".

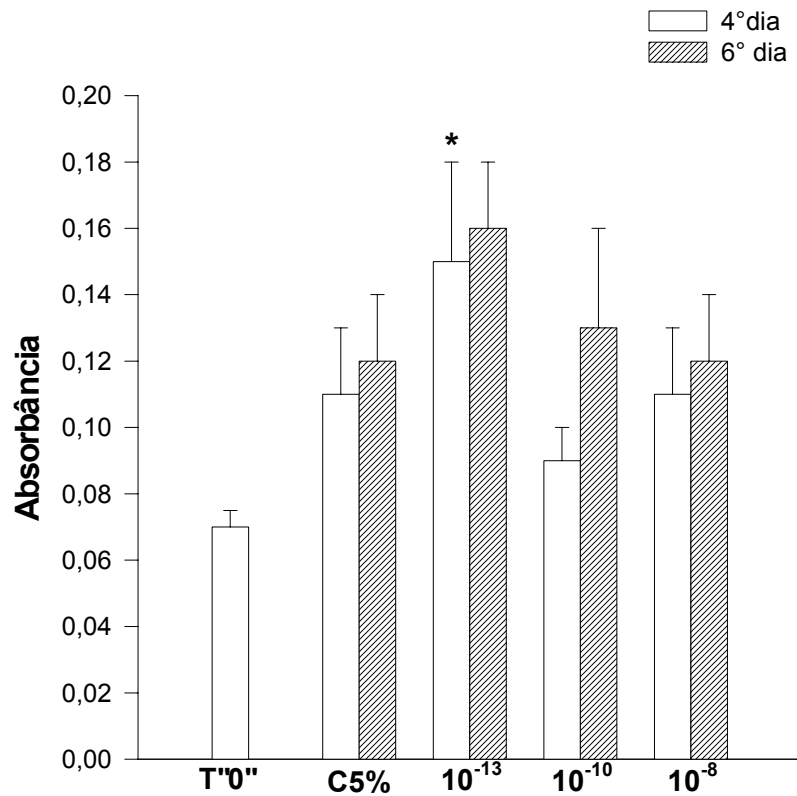


FIGURA 6 - Efeitos da dihidrotestosterona sobre a proliferação de HNTEP em cultura primária.

As células foram incubadas em meio controle e meio contendo dihidrotestosterona nas concentrações de 10^{-13} , 10^{-10} e 10^{-8} M. A proliferação foi avaliada no 4° e 6° dia de cultura pela técnica do MTT. Cada coluna representa a média \pm EP de 3 experimentos. * $p < 0,05$ em relação ao T'0''.

Para averiguar se o mecanismo de ação androgênica sobre a proliferação destas células epiteliais ocorre via receptor de androgênio, associou-se às concentrações de dihidrotestosterona estudadas, o antiandrogênio sintético hidroxiflutamida (OH-FLU) 10^{-6} M. Este antiandrogênio liga-se ao receptor de androgênios impedindo a ligação do hormônio. A figura 7, mostra os dados obtidos através da avaliação da proliferação das células epiteliais prostáticas no 3° e 6° dia de cultura utilizando 4 à 6 amostras por grupo pela técnica do MTT. Os grupos foram divididos em: grupo controle com meio 199 mais 5%SBF-DT, grupo tratado com meio controle acrescido de OH-FLU 10^{-6} M, grupos tratados com meio controle mais DHT nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-13} e os grupos tratados com DHT nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-13} associado com OH-FLU 10^{-6} M.

No 3° dia de cultura, o grupo tratado com DHT 10^{-13} M mostrou um aumento significativo na proliferação em relação ao grupo tratado com DHT 10^{-10} M. No 6° dia de cultura, o grupo tratado com DHT 10^{-13} M foi significativamente mais proliferativo que os grupos tratados com DHT nas concentrações 10^{-8} , 10^{-10} M em relação ao grupo tratado com OH-FLU 10^{-6} M isolada e associação com DHT 10^{-8} e 10^{-13} M.

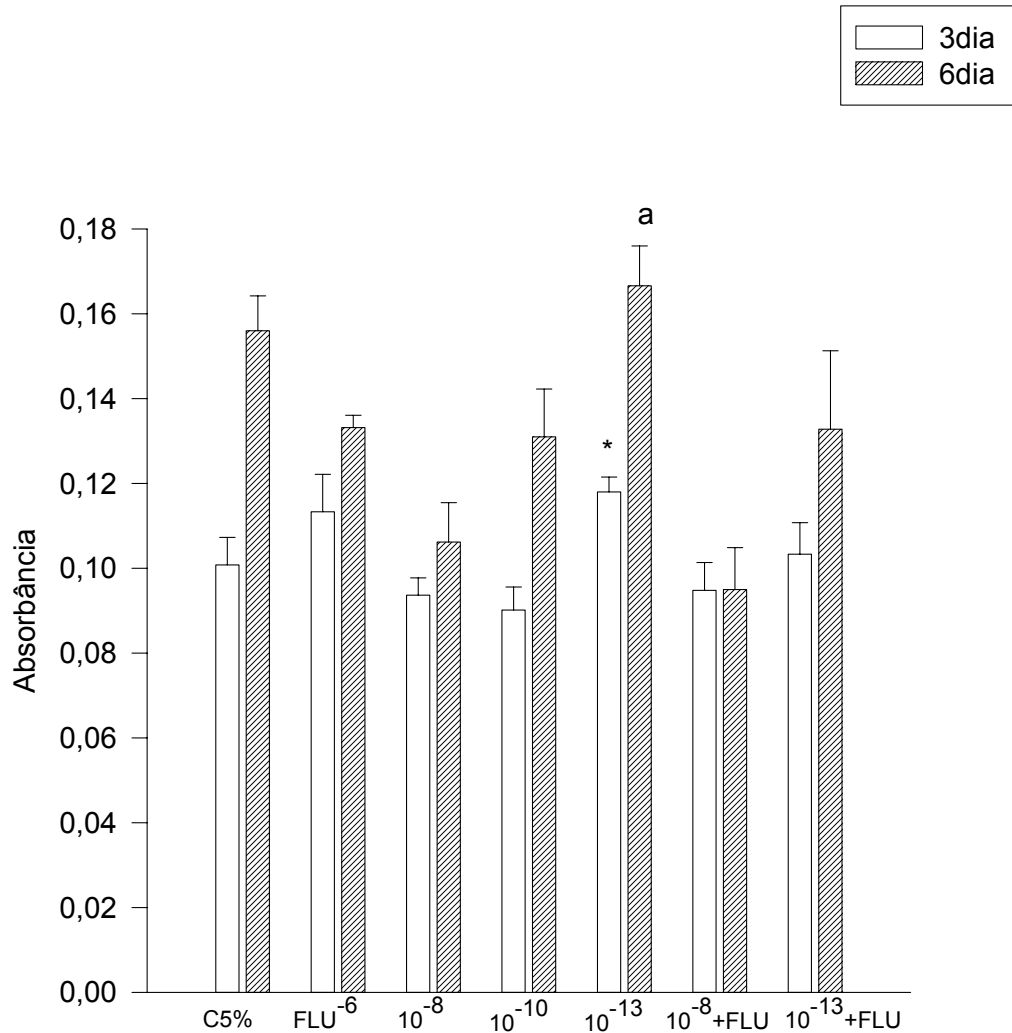


FIGURA 7 - Efeitos da dihidrotestosterona sobre a proliferação de HNTEP com OH-FLU em cultura primária.

As células foram incubadas em meio controle, meio controle com hidroxiflutamida e meio contendo dihidrotestosterona nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-13} M isoladas e associadas com hidroxiflutamida. A proliferação foi avaliada no 3° e 6° dia de tratamento. Cada coluna representa a média \pm EP de 4-6 amostras. * $p < 0,05$ no 3° dia em relação ao DHT⁻¹⁰ M, a $p < 0,05$ no 6° dia em relação à OH-FLU. 10^{-6} M, DHT⁻⁸ M, DHT⁻¹⁰ M, DHT⁻⁸+OH-FLU. 10^{-6} M e DHT⁻¹³+ OH-FLU. 10^{-6} M.

4.2 EXPRESSÃO DO AR, DO PROTOONCOGENE *bcl-2* E DO INIBIDOR DE QUINASES DEPENDENTES DE CICLINAS *p21* EM CÉLULAS EPITELIAIS PROSTÁTICAS HUMANAS NÃO TRANSFORMADAS

4.2.1 Expressão do AR

4.2.1.1 Análise de tempo de tratamento

Os níveis de mRNA do receptor de androgênio (AR) foram verificados por RT-PCR, em células epiteliais prostáticas humanas não transformadas, incubadas com meio controle suplementado com 5% de SBF-DT e com meio controle contendo DHT na concentração de 10^{-13} M em diferentes tempos: tempo "0", 1h, 2h, 3h, 4h e 6h. Conforme ilustrado na figura 8, observa-se aumento significativo na expressão do AR nos grupos incubados com DHT em 3, 4 e 6 horas de tratamento, em relação ao tempo "0" e aos controles 1, 2, 3 e 6h. O grupo com 4 horas de tratamento é diferente também de seu controle e dos grupos tratados por 1 e 2 horas. E por fim, o grupo tratado por 6 horas é diferente do grupo tratado por 1 e 2 horas.

Esses dados indicam que a expressão do AR, mediante estímulo hormonal com DHT. 10^{-13} M ocorre a partir das 3 horas de tratamento, apresentando um aumento marcante durante 4 horas de incubação com o androgênio.

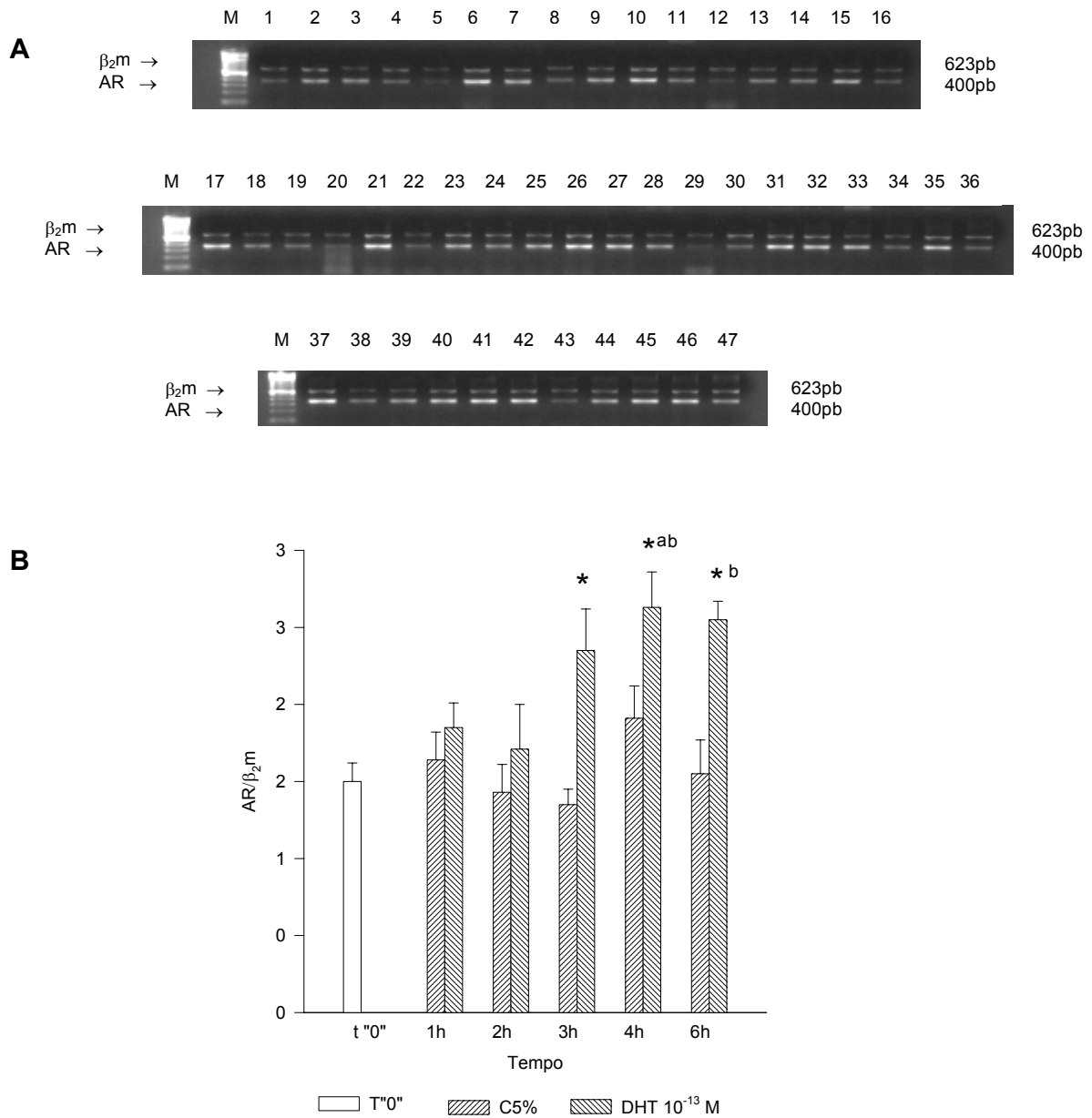


FIGURA 8 - RT-PCR do mRNA do AR em HNTEP.

(A) O fragmento de 400pb corresponde ao AR, e o de 623pb ao da β_2 -microglobulina avaliados no tempo "0" (1 a 5), grupo controle 1h (6 a 8), 2h (9 e 10), 3h (11 a 14), 4h (15 a 19), 6h (20 a 23) e grupo tratado com DHT. 10^{-13} M 1h (24 a 29), 2h (30 a 34), 3h (35 a 38), 4h (39 a 43) e 6h (44 a 47). M= marcador de peso molecular (100pb). (B) O gráfico representa a quantificação das bandas expressa como a relação AR/ β_2 m. (média \pm EP). * $p < 0,05$ em relação ao T⁰, controle 1h, 2h, 3h e 6h. a $p < 0,05$ em relação ao controle 4h, b $p < 0,05$ em relação a DHT. 10^{-13} M 1h e 2h.

4.2.1.2 Análise de diferentes concentrações de dihidrotestosterona

As células foram incubadas com diferentes concentrações de androgênio e o RNA total das células epiteliais de pelo menos 6 doadores diferentes, foi extraído 4 horas após o tratamento. A figura 9 mostra um aumento significativo na expressão do AR das células incubadas com DHT na concentração de 10^{-13} M relação ao grupo controle.

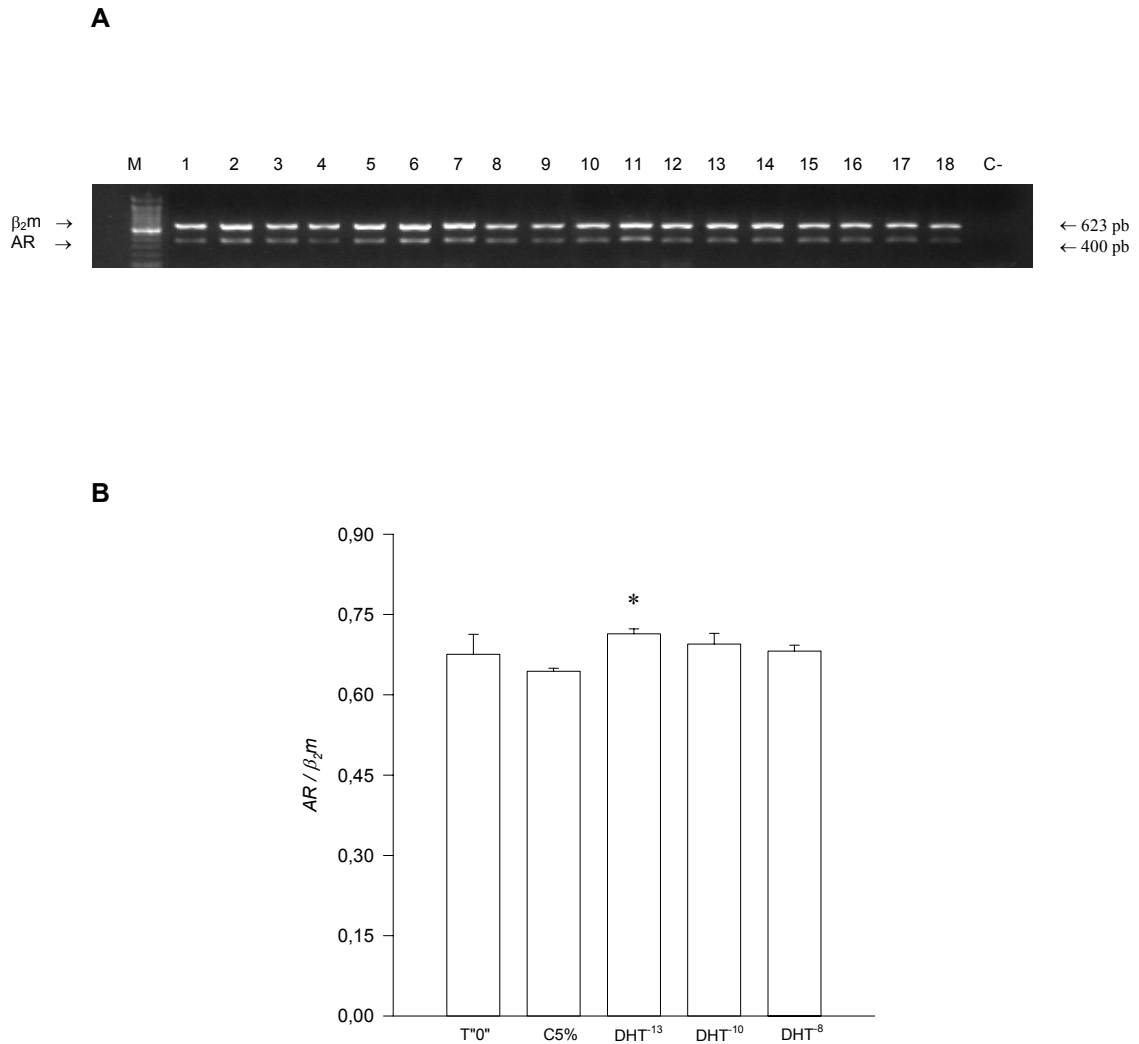


FIGURA 9 - RT-PCR do mRNA do AR em HNTEP com diferentes doses de DHT.

(A) O fragmento de 400pb corresponde ao AR, e o de 623pb ao da β_2 -microglobulina avaliados em T⁰ (1 a 3) e 4 horas de incubação com meio controle (4 a 7) e meio tratado com DHT. 10^{-13} (8 a 11), 10^{-10} (12 a 15) e 10^{-8} (16 a 18). C - = Controle negativo, M= marcador de peso molecular (100pb). (B) O gráfico representa a quantificação das bandas expressa como a relação AR/ β_2m (média \pm EP). *p <0,05 em relação ao C5%.

4.2.2 Expressão do p21

4.2.2.1 Análise de tempo de tratamento

A expressão do inibidor de quinases dependentes de ciclinas *p21* foi avaliada por RT-PCR em células epiteliais prostáticas humanas não transformadas em cultura primária. As células foram incubadas em meio controle com 5% de SBF-DT e meio controle contendo DHT 10^{-13} M nos tempos "0", 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h e 6h conforme ilustrado na figura 9. Não houve alterações significativas nos níveis de mRNA do p21, entre os grupos controle e tratado, neste intervalo de tempo estudado.

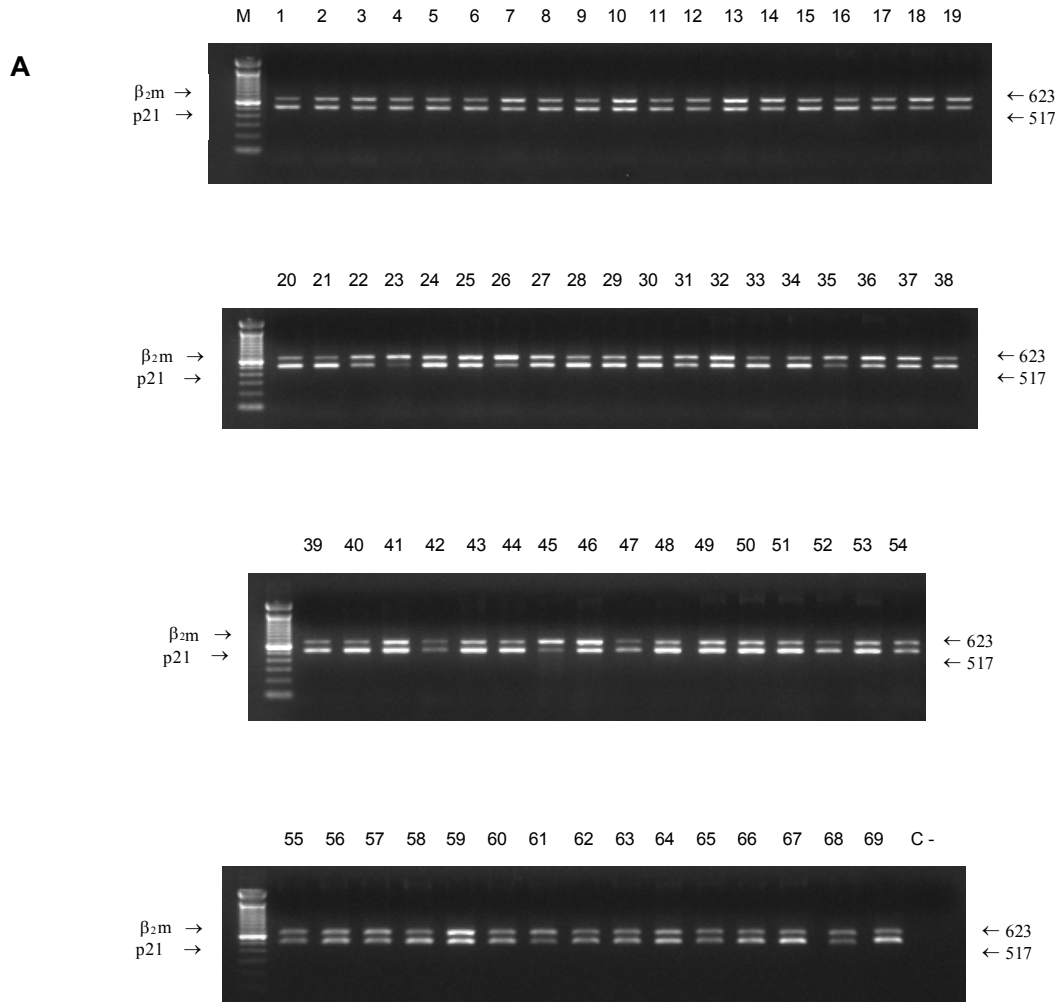


FIGURA 10A - RT-PCR do mRNA do *p21* em HNTEP.

O fragmento de 517pb corresponde ao *p21*, e o de 623pb ao da β_2 -microglobulina avaliados em T"0" (1 a 6), C5% 15' (7 a 11), DHT 15' (12 a 18), C5% 30' (19 a 25), DHT 30' (26 a 32), C5% 1h (33 a 36), DHT 1h (37 a 42), C5% 2h (43 a 46), DHT 2h (47 a 50), C5% 3h (51 a 52), DHT 3h (53 a 55), C5% 4h (56 a 59), DHT 4h (60 a 64), C5% 6h (65 a 67), DHT 6h (68 a 69). C - = controle negativo, M= marcador de peso molecular (100pb).

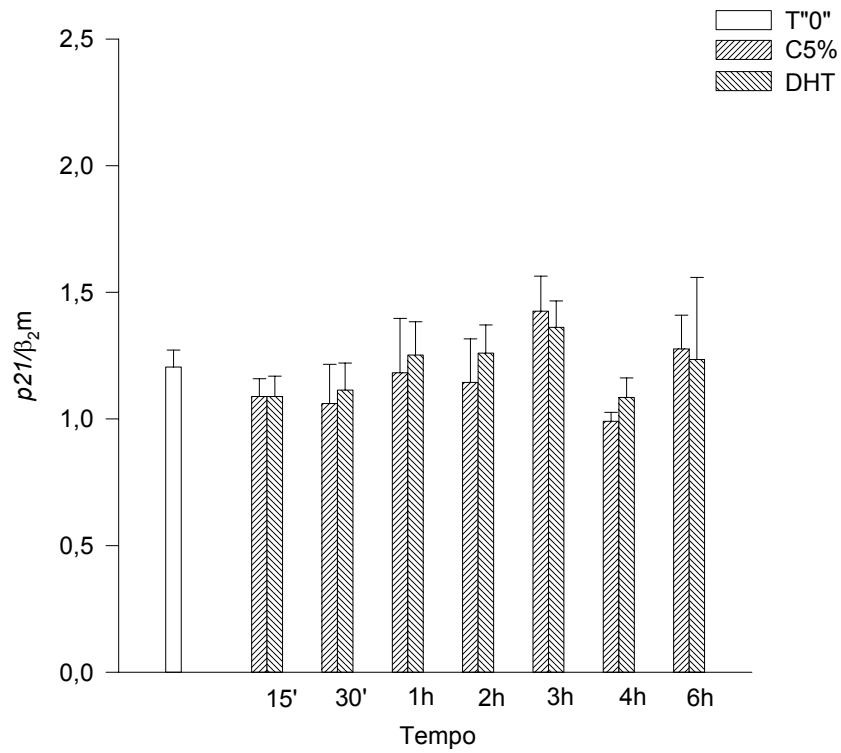
B

FIGURA 10B - O gráfico representa a quantificação das bandas expressa como a relação $p21/\beta_2m$ (média \pm EP).

4.2.2.2 Análise do *p21* com diferentes concentrações de dihidrotestosterona

As células epiteliais prostáticas não transformadas foram incubadas em meio controle e meio contendo dihidrotestosterona nas concentrações de 10^{-13} , 10^{-10} e 10^{-8} M. O mRNA do *p21* foi avaliado 4 horas após o estímulo androgênico.

A figura 11 mostra que houve diferença na expressão do *p21* das células incubadas com DHT na concentração de 10^{-8} M em relação ao grupo tratado com DHT. 10^{-13} M.

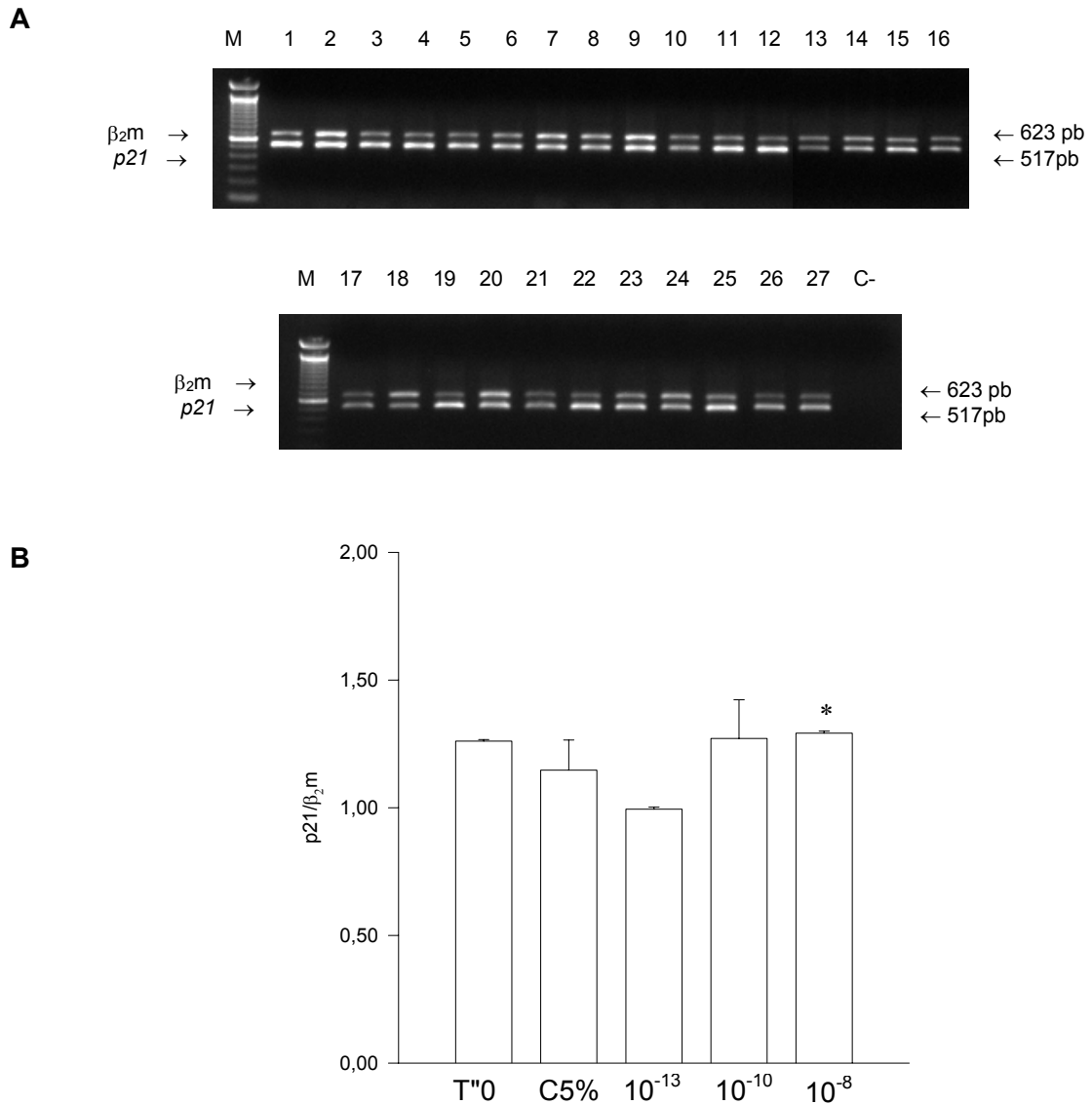


FIGURA 11 - RT-PCR do mRNA do *p21* em HNTEP com diferentes doses de DHT.

(A) O fragmento de 517pb corresponde ao *p21*, e o de 623pb ao da β_2 -microglobulina avaliados em T⁰ (1 a 5) e 4 horas de incubação com meio controle (6 a 12) e meio tratado com DHT.10⁻¹³M (13 a 16), 10⁻¹⁰M (17 a 22) e 10⁻⁸ M (23 a 27). C - = Controle negativo, M= marcador de peso molecular (100pb). (B) O gráfico representa a quantificação das bandas expressa como a relação AR/ β_2m (média \pm EP). * $p < 0,05$ em relação a DHT.10⁻¹³M.

4.2.3 Expressão do protooncogene *bcl-2*

4.2.3.1 Análise de tempo de tratamento

O mRNA do protooncogene *bcl-2* foi avaliado por RT-PCR, conforme indica a figura 12 (A e B). O RNA total das células epiteliais prostáticas foi extraído após diferentes tempos de incubação com DHT. 10^{-13} M. Considerou-se como tempo "0" o RNA extraído após 4 horas de deprivação de soro do meio de cultura no momento em que efetuou-se a troca de meio dos grupos controle e tratados com DHT. Na seqüência extraiu-se o RNA total nos tempos 15min, 30min, 1h, 2h, 3h e 4h de tratamento.

O grupo tratado com DHT $^{-13}$ M apresentou um aumento significativo na expressão do *bcl-2* em 15min em relação ao T"0", 1 e 4 horas de tratamento, enquanto que o grupo controle não apresentou variação significativa na expressão deste gene durante o período de tempo avaliado.

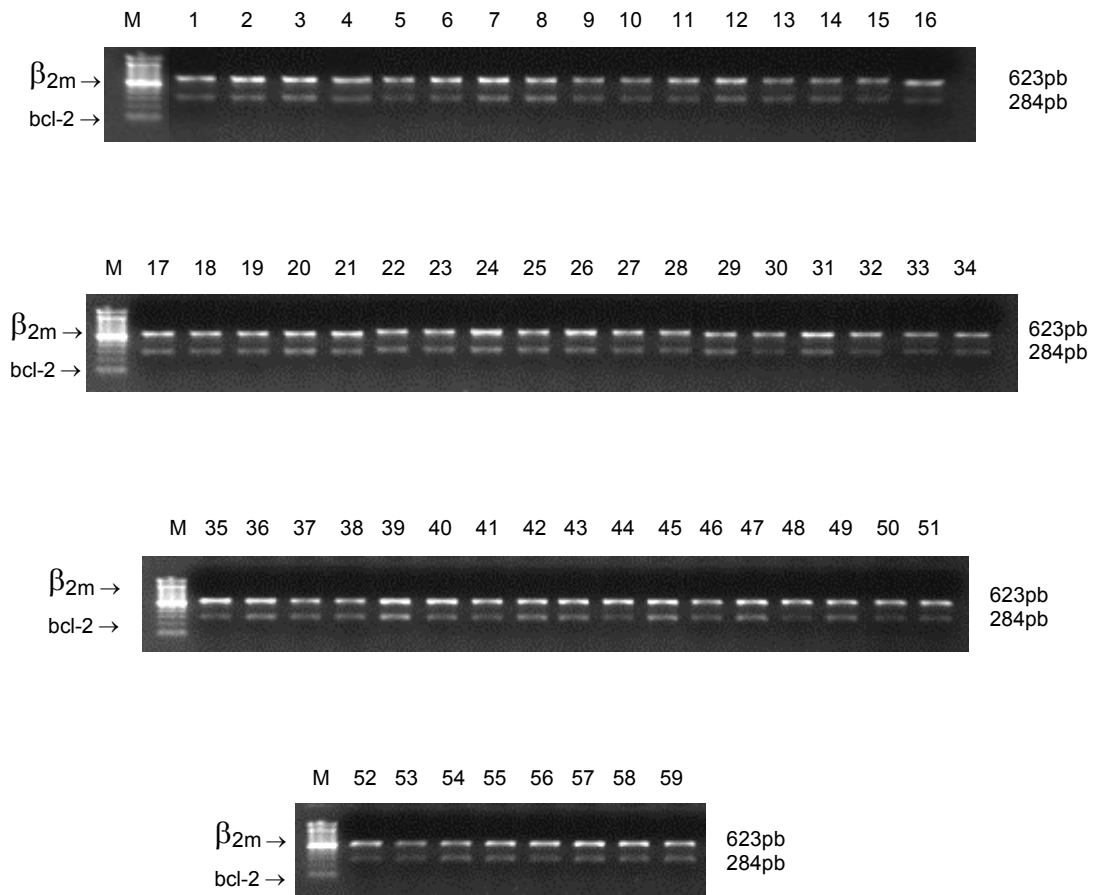
A

FIGURA 12A - RT-PCR do mRNA do *bcl-2* em células epiteliais prostáticas humanas não transformadas.

A figura mostra o fragmento de 284pb do *bcl-2* e o de 623pb da β_2 -microglobulina, analisado em gel. Os números acima das bandas correspondem aos diferentes tratamentos: tempo "0" (1 a 5), grupo controle 15' (6 a 10), tratado com $DHT.10^{-13}M$ 15' (11 a 15), controle 30' (16 a 20), $DHT.10^{-13}M$ 30' (21 a 25), controle 1h (26 a 29), $DHT.10^{-13}M$ 1h (30 a 34), controle 2h (35 a 38), $DHT.10^{-13}M$ 2h (39 a 42), controle 3h (43 a 45), $DHT.10^{-13}M$ 3h (46 a 49), controle 4h (50 a 54) e $DHT.10^{-13}M$ 4h (55 a 59). M= Marcador de peso molecular (100pb).

B

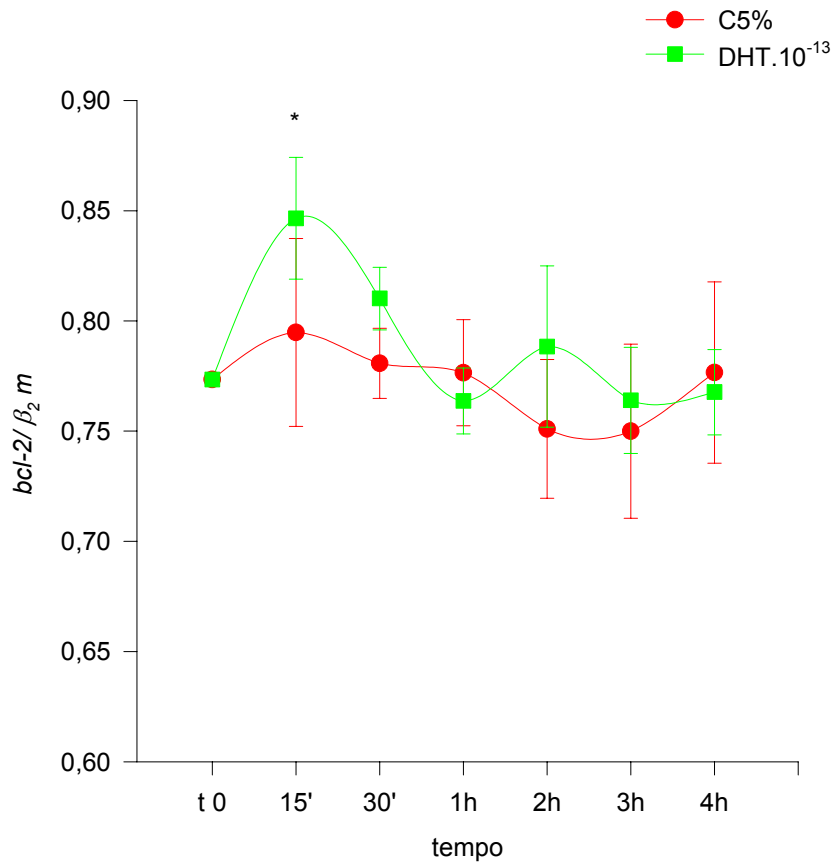


FIGURA 12B - Gráfico da quantificação das bandas correspondentes aos fragmentos de 284pb do $bcl-2$ e 623pb da β_2m .

Dados expressos como relação $bcl-2/\beta_2m$ (média \pm EP). * $p < 0,05$ em relação ao T"0", DHT. 10^{-13} M 1h e 4h.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos as patologias prostáticas têm chamado a atenção de grupos de pesquisa e autoridades sanitárias devido aos altos índices de prevalência e suas implicações na qualidade de vida dos pacientes, além dos custos com a saúde pública. A hiperplasia prostática benigna clínica acomete 33,5% dos homens com idade entre 60 e 70 anos (Meigs *et al.*,2001) enquanto que o carcinoma de próstata é altamente diagnosticado em homens a partir dos 50 anos de idade (Ruijter,1999). Apesar da alta incidência pouco se sabe sobre os eventos iniciais envolvidos na morfogênese e desenvolvimento destas patologias.

Os androgênios são essenciais para o desenvolvimento, crescimento, diferenciação e manutenção da próstata. Eles também estão envolvidos no controle da inibição da apoptose, indução e ou inibição da proliferação celular (Sonneschein *et al.*, 1989).

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para averiguar os processos proliferativos envolvidos no crescimento prostático, tais como cultura de células epiteliais (Spritzer *et al.*,1995;Berthon,1997; Planz *et al.*,2001) e linhagens celulares (De Angeli *et al.*,1997; Sonneschein *et al.*,1989). Os resultados obtidos nesses trabalhos são controversos devido à peculiaridades características a cada modelo aplicado. Um ponto que deve ser considerado quando se realiza cultura de

células é a suplementação do meio de cultura. O excesso de fatores de crescimento como EGF, insulina, hidrocortisona e outras substâncias podem mascarar os resultados obtidos com o tratamento recebido.

Nosso grupo de pesquisa possui um modelo de cultura de células epiteliais prostáticas não transformadas (HNTEP), caracterizadas com estudos de imunohistoquímica que demonstraram sua morfologia e funcionalidade (Spritzer *et al.*, 1995), além de expressarem o AR e serem responsivas ao estímulo androgênico (Silva *et al.*, 2001). Conforme estabelecido neste laboratório as células foram tratadas unicamente com 5% de soro bovino fetal desteroideado no meio de cultura, o que permitiu sua viabilidade durante o estudo sem interferir no efeito provocado pelo tratamento (Silva, 1993, Morsch, 1997).

A dihidrotestosterona é o metabólito 5α reduzido da testosterona, sendo considerada 100 vezes mais potente que seu precursor. A opção pelo seu uso foi devido ao fato de que ao contrário da testosterona, a DHT não pode ser aromatizada a estradiol, sugerindo que o efeito provocado na proliferação das células é causado pelo estímulo androgênico.

A análise de proliferação das células epiteliais prostáticas neste estudo indica que a baixa concentração do androgênio dihidrotestosterona (10^{-13} M) provocou um aumento na proliferação dessas células, avaliadas no 4º dia de tratamento. Este resultado está de acordo com dados anteriores do nosso laboratório os quais foram obtidos a partir da técnica de determinação do DNA total para avaliar a proliferação celular em relação ao estímulo androgênico. Nesses experimentos, também se observou que baixas concentrações de testosterona (2×10^{-10} M e 2×10^{-11} M) e de

dihidrotestosterona ($1 \times 10^{-13} \text{M}$) estimularam a atividade mitogênica das células, comparadas com as células que receberam altas concentrações destes hormônios (Silva *et al.*, 2001). Fazendo uso da linhagem celular LNCaP, que é responsiva aos androgênios, outros trabalhos também demonstraram um aumento de proliferação utilizando DHT em concentrações de 10^{-9} a 10^{-11}M (Sonneschein *et al.*, 1989, Olea *et al.*, 1990, De Angeli *et al.*, 1997, Planz *et al.*, 2001, Long *et al.*, 2000) e uma inibição da proliferação celular com doses de DHT 10^{-8}M e 10^{-7}M (Joly-Pharaboz *et al.*, 2000).

Por outro lado, alguns autores não conseguiram observar o efeito mitogênico da DHT em cultura de células prostáticas. Berthon e colaboradores estudaram células epiteliais prostáticas normais, hiperplásicas e tumorais em cultura e trataram estas células com concentrações de DHT de 10^{-7} a 10^{-11}M , em meio de cultura livre de esteróides. Não foi observado nenhum aumento na proliferação destas células em resposta ao tratamento. Um outro estudo com linhagem de células epiteliais prostáticas PC-3 transfectadas com AR e tratadas com diferentes concentrações de DHT (10^{-10} a 10^{-6}M) também não demonstrou um aumento na proliferação (Berthon *et al.*, 1997, Heisler *et al.*, 1997, Krill *et al.*, 1999).

A diversidade dos resultados encontrados em relação à ação dos hormônios esteróides sobre células prostáticas pode ser atribuída a diversos fatores, como: diferentes repostas a estímulos de células tumorais e células não transformadas, as condições de crescimento que as células são submetidas durante a cultura, o número de passagens e a adição de fatores de crescimento no meio de cultura.

Neste trabalho utilizamos células não-transformadas cultivadas em cultura primária e com o meio essencial livre de fatores que possam interferir na ação androgênica.

Alguns autores demonstraram uma ação bifásica da DHT em linhagens celulares (LNCaP) ou seja, enquanto baixas concentrações deste androgênio estimulam a proliferação, altas concentrações interrompem essa proliferação (Lee *et al.*, 1995; Scherwood *et al.*, 1998). Uma das explicações para este efeito seria a existência de genes inibidores de androgênio (*Androgen Shutoff- AS*) expressos somente em presença de concentrações de androgênio maiores que 10^{-9} M, e estes genes provocariam uma resposta inibitória na regulação dos mecanismos de proliferação na glândula prostática, enquanto que concentrações menores de androgênio escapariam deste controle (Geck *et al.*, 1997, Geck *et al.*, 2000).

Buscando confirmar a hipótese de que o efeito proliferativo observado nas HNTEP com baixas doses de DHT ocorre via AR, utilizou-se o antiandrogênio hidroxiflutamida (OH-FLU) na concentração de 10^{-6} M isolado e associado a DHT 10^{-8} e 10^{-13} M. Os resultados desta análise confirmam um aumento na proliferação das células tratadas com DHT. 10^{-13} M, enquanto que os grupos tratados com hidroxiflutamida tiveram seu crescimento inibido, demonstrando que o efeito mitógeno nestas células é provocado pelo androgênio. Este resultado está de acordo com estudos anteriores os quais observaram que o tratamento destas células com OH-FLU 10^{-6} associada a DHT aboliu o efeito proliferativo induzido pelo androgênio (Silva *et al.*, 2001).

Além dos androgênios o epitélio próstatico também sofre influência de fatores de crescimento secretados pela matriz estromal circunjacente. Por exemplo, o fator

de crescimento de fibroblasto 10 (FGF-10) secretado pelas células prostáticas estromais aumentou a proliferação das células epiteliais quando adicionado no meio de cultura dessas células (Nakano *et al.*, 1999). Esse estudo ilustra a dependência da regulação parácrina entre os tipos celulares da próstata nos mecanismos de desenvolvimento da glândula.

O efeito biológico dos androgênios na glândula prostática é mediado pelo receptor de androgênio (AR). O AR ao se ligar ao hormônio cognato, transloca-se para o núcleo da célula onde irá se ligar a elementos responsivos na região promotora de genes alvos, como por exemplo no PSA. O AR também pode regular de forma indireta genes que não possuam elementos responsivos, além de sofrer regulação por co-ativadores (Kallio *et al.*, 1995).

Neste estudo verificou-se a expressão do AR por RT-PCR nas células HNTEP em cultura primária. A expressão do AR em células HNTEP qualifica nosso modelo de cultura para estudos dos mecanismos de ação androgênica. Quando estas células foram tratadas com dihidrotestosterona na concentração de 10^{-13} M em diferentes tempos de tratamento, observou-se um aumento nos níveis de mRNA do AR a partir das 3 horas de incubação com o hormônio, sendo que este aumento acentua nas 4 horas de incubação e permanece até 6 horas. Segundo dados de Silva (1998), os níveis de mRNA do AR não foram alterados com tempos de tratamento inferiores à 2 horas, fato este que despertou o interesse em analisar tempos tardios da expressão deste gene. Os resultados obtidos na curva de tempo de expressão do AR neste trabalho, instigou-nos a analisar o efeito do androgênio, incubando estas células com diferentes concentrações de DHT (10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-13} M),

durante 4 horas de tratamento. Com isso se observou um aumento na expressão do AR nas células que receberam DHT⁻¹³ M, em relação ao grupo controle, indicando que o efeito proliferativo de baixas concentrações de androgênio via AR nestas células. Nossos dados são comparáveis aos obtidos por Nakano e colaboradores, os quais demonstraram ser inibida a expressão do AR em presença de alta concentração de DHT (10⁻⁸M)(Nakano *et al.*, 1999). Neste trabalho não se observa o efeito inibitório na expressão do AR com DHT. 10⁻⁸ M provavelmente devido às diferentes condições experimentais usadas, mas demonstrou-se que das três concentrações utilizadas, a que provocou um aumento significativo na expressão do AR foi a de 10⁻¹³ M, a mesma concentração que estimula a proliferação celular. Blanchere e colaboradores avaliaram os níveis protéicos do AR em células epiteliais prostáticas imortalizadas (PNT2), tratadas com DHT 5X10⁻⁹M por no mínimo 2 e no máximo 48 horas. Após 2 horas de tratamento, verificaram por Westernblot, um aumento nos níveis da proteína do AR, alcançando um pico em 6 horas de tratamento (Blanchere *et al.*, 1998). Estes dados são coincidentes com o aumento dos níveis de mRNA do AR em 4 horas de estímulo hormonal, encontrado neste trabalho, uma vez que é o RNA que induz a síntese da proteína.

Como dito anteriormente, outros fatores podem ativar o receptor de androgênios na ausência do hormônio cognato, o que poderia explicar a independência de tumores prostáticos avançados, como os fatores de crescimento: IGF, EGF, KGF, FGF (Culig *et al.*, 1996; Planz *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 1999) e a interleucina-6, que ativa o domínio de transativação do AR por um mecanismo que é dependente da proteína quinase mitógeno ativada (MAPK) e de um sinalizador da via de transcrição (STAT3), em células LNCaP (Ueda *et al.*, 2002).

Além da regulação da proliferação celular pelo AR, tem sido examinado o envolvimento de genes regulatórios do ciclo celular nos processos proliferativos. A expressão do *p21* é variável em diferentes tecidos humanos (Fredersdorf *et al.*, 1996) e tem sido relacionada com a parada do ciclo celular na fase G1 para permitir o reparo do DNA em resposta ao comando do *p53* na forma selvagem e não na forma mutada (Li, *et al.*, 1994). Alguns trabalhos demonstraram que além do *p53*, o *p21* também é alvo do TGF β , ou seja, pode ser induzido independente da ação do *p53* (Cox *et al.*, 1997). Robson e colaboradores demonstraram um aumento dependente de dose nos níveis de mRNA e proteína do *p21* quando estimulado com TGF β em cultura de células epiteliais hiperplásicas humanas (Robson *et al.*, 1999).

Os androgênios também podem afetar a expressão do *p21*. Neste trabalho demonstrou-se que as células HNTEP expressam o *p21*. A expressão deste gene foi avaliada em diferentes tempos de incubação, com dihidrotestosterona, não sendo observado diferenças nos níveis de mRNA deste gene em relação aos grupos controle e tratados nos tempos avaliados. Estes resultados diferem daqueles apresentados por alguns autores, os quais demonstraram o aumento da expressão deste gene em resposta ao androgênio a partir de 2 horas de estímulo e permanecendo até 72 horas em linhagens celulares (Lu *et al.*, 1999, Ling *et al.*, 2001). Uma das explicações para esta diferença seria o tipo de célula estudada, visto que os trabalhos citados acima utilizaram linhagens de células transformadas.

Da mesma forma que foi verificado para o AR, também se avaliou a expressão do *p21* em células tratadas com diferentes concentrações de DHT. A opção pelo tempo de tratamento de 4 horas, baseou-se no fato de que o *p21* não é

um gene precoce e tem sua expressão tardia. Além do que se optou por utilizar os mesmos cDNAs da curva de dose do AR para evitar a variabilidade biológica. Neste experimento observou-se que a DHT na concentração de 10^{-8} M provocou um aumento significativo nos níveis de mRNA do *p21*, enquanto que a concentração de 10^{-13} tende a diminuir a expressão deste gene. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Lu *et al* , os quais demonstraram que os androgênios induzem a expressão do *p21* em linhagem de células tumorais prostáticas. Nesse estudo o nível de mRNA do *p21* aumentou após 2 horas de tratamento com o androgênio sintético R1881 na concentração de 10^{-8} M em células LNCaP. Em contraste, os níveis de *p21* permaneceram indetectáveis em células não responsivas ao androgênio, como a linhagem PC-3. Esse mesmo grupo de pesquisa em 2000, demonstrou a existência de um elemento responsivo ao androgênio na região promotora do gene *p21* (Lu *et al.*, 1999, Lu *et al.*, 2000). Yeh, e colaboradores também demonstraram que o estímulo androgênico em altas concentrações induz à expressão do *p21* em células PC-3 transfectadas com AR, e que essa indução foi reprimida com a adição de hidroxiflutamida, confirmando que a indução do *p21* é via AR (Yeh *et al.*, 2000).

Este aumento em resposta à altas concentrações de androgênio poderia ser explicado pelo fato de que o *p21* é um inibidor do ciclo celular, conseqüentemente da proliferação celular, e tendo sido demonstrado que doses menores de dihidrotestosterona provocam um aumento na proliferação destas células e na expressão do AR, enquanto doses maiores não causam este efeito e podem até inibir a proliferação, seria esperada uma relação inversa entre a expressão do AR e do *p21* neste modelo de cultura. Os mesmos autores que demonstraram o aumento

da expressão do *p21* a partir de 2 horas de tratamento hormonal, utilizaram doses altas de androgênio, como 5×10^{-9} e 1×10^{-8} M (Lu *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2001). Contrariamente Wang e colaboradores compararam linhagens tumorais de células epiteliais responsivas ao androgênio (LNCaP AD) com não responsivas (LNCaP AI) em relação aos níveis de AR e *p21*. Nesse estudo foi mostrado que células LNCaP AD tratadas com R1881 10^{-8} M aumentaram os níveis protéicos de AR e diminuíram os níveis de *p21*, enquanto que as células LNCaP AI que expressavam altos níveis de AR, foram tratadas com sondas *antisense* de AR para reduzir os níveis de AR e dessa forma permitir a re-expressão do *p21* (Wang *et al.*, 2001). Estudos de imunohistoquímica em diferente tecidos prostáticos humanos demonstraram que a marcação para o *p21* apareceu em 23% dos pacientes com tumores dependentes de androgênio, enquanto que em amostras de tumores independentes de androgênios esta marcação positiva do *p21* apareceu em 48% dos casos (Fizazi *et al.*, 2002). Esses trabalhos sugerem que o *p21* pode estar envolvido na progressão de tumores independentes de androgênio por um mecanismo que escape do controle androgênico. O mecanismo de ação dos androgênios envolvendo o gene do *p21* ainda é pouco conhecido e os resultados são controversos, portanto é necessário um número maior de estudos desse gene em tecidos responsivos aos hormônios androgênicos bem como sua relação com o AR.

O presente trabalho avaliou a expressão do AR e do *p21* em células epiteliais não-transformadas. Considerando que o *p21* é um inibidor do ciclo celular, procuramos avaliar também um gene que estivesse diretamente relacionado com a proliferação celular contínua, o *bcl-2*. Estudos de imunohistoquímica de tecidos derivados de HPB observaram marcação positiva para *bcl-2* (Colombel, *et al.*, 1998).

A presença do *bcl-2* tem sido demonstrada em vários graus de neoplasias e tumores prostáticos humanos, estando envolvido na progressão de tumores para o estágio não responsivo ao androgênio (Jonhson *et al.*, 1998; Tsuji *et al.*, 1998; McDonnell *et al.*, 1992; Colombel *et a.*, 1993). Da mesma forma células epiteliais de próstata de ratos que sofreram castração expressam altos níveis de *bcl-2* (Perlman *et al.*, 1999). Neste modelo de cultura verificou-se que as células epiteliais derivadas de HPB em cultura primária expressam o gene do *bcl-2*. O *bcl-2* foi descrito como sendo um protooncogene e portanto se avaliou sua expressão em um intervalo de tempo que variou entre 15 minutos e quatro horas de tratamento com hormônio. Nesta curva de tempo, que partiu do mesmo cDNA usado para o *p21* e AR, observou-se um pico de expressão do *bcl-2* em 15 minutos de estímulo hormonal em relação aos outros tempos de tratamento. A literatura até o momento não apresenta dados avaliando a expressão do *bcl-2* em tempos precoces. Um estudo publicado por Ling *et al* que utilizou células prostáticas transfectadas com AR, tratadas com 5nM de mibolerone demonsntrou um decréscimo nos níveis protéicos do *bcl-2* de 24 a 72 horas de tratamento. Nesse mesmo estudo enquanto a expressão do *bcl-2* diminuía, a expressão do *p21* era positivamente regulada pelo androgênio, sugerindo uma relação inversa entre a expressão do *bcl-2* e *p21* (Ling *et al.*, 2001). O mesmo envolvimento do AR, *bcl-2* e *p21* em tumores prostáticos foi descrito por Kólar e colaboradores, onde observaram uma alta expressão de *bcl-2* em tumores com baixos níveis de AR; no entanto em algumas amostras com uma forte marcação positiva para AR também foi encontrada uma alta expressão de *bcl-2*. Relacionando com o *p21*, a expressão de *bcl-2* foi maior em tumores positivos para *p21* do que aqueles cuja expressão era ausente, sugerindo que isso pode ser conseqüência de

uma via regulatória específica em que o *bcl-2* estimulado por androgênio aumenta a expressão do *p21* (Kólar *et al.*, 2000).

No presente trabalho foi demonstrado que o *bcl-2* aumentou sua expressão após 15 minutos de estímulo com baixa concentração de androgênio, decaindo em 4 horas de tratamento. Nas mesmas células observa-se um pico de expressão do AR em 4 horas. De acordo com o mecanismo de ação androgênica proposto por Schuchard *et al.*, poderia se sugerir que baixas concentrações de androgênio induziriam a transcrição de genes precoces, onde se enquadraria o *bcl-2*, e este protooncogene modularia a expressão tardia do AR e do *p21*. Isto é, enquanto DHT¹³ M provocou um aumento na proliferação celular e conseqüente regulação positiva de seu receptor, o *p21*, sendo um gene que induz a parada do ciclo celular, apresenta uma expressão que tende a estar diminuída com esta concentração e aumentar com altas concentrações de androgênio, que não produziram aumento na proliferação destas células.

Com a existência de poucos trabalhos que relacionem o AR, *bcl-2* e *p21* em tecido prostático de HPB, os resultados do presente trabalho até o momento, parecem ser os únicos utilizando um modelo de cultura primária de células epiteliais prostáticas humanas, não transformadas. Estes dados qualificam este modelo para se estudar o envolvimento destes genes nos processos proliferativos regulados por androgênios. No entanto, estudos posteriores como análise da proteína desses genes, bem como um método quantitativo para os níveis de mRNA, como o PCR em tempo real, seriam importantes para se confirmar estes dados e esclarecer a relação entre estes genes nos distúrbios proliferativos do epitélio prostático.

6 CONCLUSÕES

- ❖ Baixas concentrações do androgênio dihidrotestosterona estimularam a proliferação das células HNTEP em cultura primária.
- ❖ O efeito androgênico nestas células ocorre preferencialmente via AR, uma vez que o antiandrogênio, hidroxiflutamida inibiu a proliferação quando associado à DHT. 10^{-13} M .
- ❖ As células HNTEP expressam o gene *bcl-2* e *p21* no modelo de cultura utilizado.
- ❖ Os níveis de mRNA do AR aumentaram significativamente em 4 horas de tratamento hormonal com dihidrotestosterona 10^{-13} M, enquanto os níveis de *p21* permaneceram inalterados e os níveis de *bcl-2* apresentaram um pico em 15 minutos de estímulo.
- ❖ Os níveis de mRNA do AR aumentaram quando as célula foram tratadas com DHT 10^{-13} M, e de maneira inversa, os níveis de mRNA do *p21* tendem a diminuir com a mesma concentração, enquanto que na concentração de 10^{-8} M aumenta significativamente a expressão do *p21*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTWEIN, J.E. Obstructive benign prostatic hyperplasia: therapeutical aspects. *Eur.Urol.*;34 suppl 1:31-37,1998.
- AVANCÈS, C.; GEORGET, V.;TÉROUANNE, B.; ORIO, F.;CUSSENOT, O.; MOTTET N.;COSTA, P.; SULTAN, C. Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcripcional activity and its differential subnucelar localization in the presence of androgens and antiandrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*,184:13-24,2001.
- BANERJEE, P.P.; BANERJEE, S.; BROWN,T.R. Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobes. *Endocrinology*,143(5):1824-32, 2002.
- BARETTON,G.B.; KLENK,U.; DIEBOLD,J.; SCHMELLER,N.; LÖHRS, U. Proliferation and apoptosis-associated factors in advancedm prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *Br. Journal of Cancer*,80 (3/4) :546-555,1999.
- BERTHON, P.; WALLER, A.S.; VILLETE, J-M.; LORIDON,L.; CUSSENOT.; MAITLAND, N.J. Androgens are not a direct requirement for the proliferation of human prostatic epithelium *in vitro*. *Int.J. Cancer*, 73:910-916,1997.
- BLANCHERE, M.; BERTHAUT, I.; PORTOIS, M-C.; MESTAYUER, C.; and MOWSZOWICZ I. Hormonal regulation of the androgen receptor expression in human prostatic cells in culture. *J.Steroid Biochem. Molec. Biol*, 66 (5-6):319-326,1998.
- BONKHOFF, H. and REMBERGER, K. Differential pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *The Prostate*,28: 98-106, 1996.
- BONKHOFF, H.; FIXEMER, T., REMBERGER, K. Relation between Bcl-2 cell proliferation and the androgen receptor status in prostate tissue and presursors of prostate cancer. *The Prostate*, 34:4,251-258, 1998.
- BUTTYAN, R.; SHABSIGH,A.; PERLMAN,H. and COLOMBEL, M. Regulation of apoptosis in the prostate gland by androgenic steroids. *TEM*, 10 (2): 47-54.1999
- CHANG, W.Y.; BIRCH, L.; WOODHAN, C.; GOLD, L.; PRINS, GS. Neonatal estrogen exposure alters the transforming growth factor β signaling system in the developing rat prostate and blocks the transiente $p21^{cip1/waf1}$ expression

- associated with epithelial differentiation. *Endocrinology*, 140 (6),2801-2813, 1999.
- CHEN, Y.; KAYANO,T.; TAKAGI, M. Dysregulated expression of bcl-2 and bax in oral carcinomas: evidence of post-transcriptional control, *J Oral Pathol Med* 29 (2): 63-69,2000.
- CHOMCZYNSKI, P.;SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *xxx*, 156-159, 1987.
- COFFEY, D.S.; WLASH, P.C.; Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol.Clin. North. Am*, 17(3) 461-475. Review,1990.
- COLOMBEL,M.; VACHEROT, F.;GIL DIEZ, S.; FONTAINE,E.; BUTTYAN, R. and CHOPIN,D. Zonal variation of apoptosis and proliferation in the normal prostate and in benign prostatic hyperplasia. *Br. Journal Of Urology*, 82: 380-385,1998.
- COLOMBEL, M.; SYMMANS,F.; GIL, S.; et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J pathol* 143 (2): 390-400,1993.
- COX L.S. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independence activities of p53 and p21 CIP1/WAF1/SDI1. *J. Pathology*, 183: 134-140, 1997.
- CUDE, K.J.; DIXON, S.C.; GUOY, Y.; LISLLA,J.; and FIGG, W.D. The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *J. Mol. Med*,77: 419-426, 1999.
- CULIG, Z.; HOBISCH, A.; CRONAUER, M.V.; RADMAYR, C. et al. Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *The Prostate*, 28: 329-405,1996.
- DANESHGARI, F. and CRAWFORD, D. Endocrine therapy of advanced carcinoma of the prostate cancer. *Cancer*, 71: 1089-1097,1993.
- DE ANGELI, S.;FAVRETTI, C.;BUORO, S.;FANDELLA, A.;ANSELMO, G.;CONCONI, M. T.;PARNIGOTTO, P. P. Effects of DHT and EGF on human hyperplastic prostate cells cultured in vitro: growth, morphology and phenotype characterisation. *Ann Anat*, 179, 255-264, 1997.
- FIZAZI, K.; MARTINEZ,L.A; SIKES,C.K.; JOHNSTON, D.A et al. The association of p21^(WAF-1/CIP1) with progression to androgen-independent. *Clin. Canc. Res.*8(3): 775-781,2002.
- FREDERSDORF, S.; MILNE, A.W; HALL, P.A; et al. Characterization of a panel of novel anti-p21(Waf1/Cip1) monoclonal antibodies and immunochemical analysis of p21(Waf1/Cip1) expression in normal human tissues. *Am J Pathol* 148 (3): 825-835,1996.
- GECK, P.; MAFFINI,M.V.; SZELEI,J.; SONNENSCHNEIN,C. and SOTO, A.M. Androgen-induced proliferative quiescence in prostate cancer cells: The role of AS3 as its mediator. *Medical Sciences*. 97(18): 10185-10190, 2000.
- GECK, P.;SZELEI, J.;JIMENEZ, J.;LIN, T. M.;SONNENSCHNEIN, C.;SOTO, A. M. expression of novel genes linked to the androgen-induced, proliferative shutoff

- in prostate cancer cells. **J Steroid Biochem Molec Biol**, 63(4-6), 211-218, 1997.
- GNANAPRAGASAM,VJ; McCAHY,PJ; NEAL,DE; ROBSON,CN. Insulin growth factor II and androgen receptor expression in the prostate. **BJU Inten**. 86,731-735, 2000.
- HAYNES, J.M.; FRYDEMBERG,M.; MAJEWSKI, H. Testosterone and phorbol ester stimulated proliferation in human culture prostatic stromal cells. **Cellular Signalling**, 13: 703-709, 2001.
- HEISLER, L.E.;EVANGELOU A.; LEW A.M; et al. Androgen-dependent cell cycle arrest and apoptotic death in PC-3 prostatic cell cultures expressing a full-length human androgen receptor. **Mol Cell Endocrinol** 126 (1): 59-73,1997.
- HESKETH,R The Oncogenes in Academic Press (Ed). The oncogene facts book. London: Academic Press. (pp 52-57), 1995.
- HOCKENBERY, D.; NUNEZ, G.; MINNIMAN, C.; SCHREIBER, R. D.;KORSMEYER, S.J.; Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, 348: 334-336, 1990.
- IKEGAKI,N; KATSUMATA,M; MINNA,J; TSUJIMOTO,Y. Expression of bcl-2 in small cell lung carcinoma cells. **Cancer Res**.54:6-8, 1994.
- JOLY-PHARABOZ,M-O. ; RUFFION,A.; ROCH,A-M.; et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis by androgens of a variant of LNCaP cell line. **J. of Steroid Bioch. & Molecular Biol**. 73:273-249 ,2000.
- JONHNSON,M.I; ROBINSON,M.C; MARSH,C; ROBSON,C.N et al. Expression of bcl-2, Bax and p53 in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and localized prostate cancer: Relationship with apoptosis and proliferation. **The Prostate** 37: 223-229,1998.
- KAELIN,W.G; Functions of the retinoblastoma protein **Bioessay** 21(11):950-8, 1999.
- KAJIWARA,T.;TAKEUCHI,T. UEKI,T.;MORYANA,N. et al. Effects of Bcl-2 overexpression in human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Int.J. Urol**.6:520-524, 1999.
- KALLIO,P.J; PALVINO,J.J; JANNE,O.A. Genetic regulation of androgen action. **The Prostate** 6:45-51,1996
- KAPUCUOGLU,N; LOSI,L; EUSEBI,V. Immunohistochemical localization of bcl-2 and bax proteins in *in situ* and invasive duct breast carcinoma. **Virchows Arch**.430:17-22,1997.
- KÓLAR, Z.;MURRAY,P.G.; SCOTT,K.; HARRISON,A.; VOTESÉK,B.; DUSEK,J. Relation of Bcl-2 expression to androgen receptor,p21WAF1/CIP1, and cyclin D1 status in prostate cancer. **J.Clin. Pathol:Mol.Pathol** 53:15-18,2000.
- KRAJEWSKA, M.; KRAJEWSKI, S.; EPTEIN,J.L et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-x and mcl-1 expression in prostate cancer. **Am. J. Pathol**, 148:1567-76,1996.

- KRILL, D.; SHUMAN, M.; THOMPSON, M et al. A simple method for the isolation and culture of epithelial and stromal cells from benign and neoplastic prostates. ***Urology***,49:981-988, 1997.
- KRILL, D.; STONER, J.; KONETY, B.R.; BECICH, M.J AND GETZEMBERG, R.H. Differential effects of vitamin D on normal human prostate epithelial and stromal cells in primary culture. ***Urology***,54(1);171-177,1999.
- KUMAR, V.L, MAJUMDER P.K; KUMAR V. Androgen deprivation causes up-regulation of androgen receptor transcript in the rat prostate. ***Mol Cell Biochem*** 171 (1-2): 133-138, 1997.
- KYLE E, NECKERS L, TAKIMOTO C, et al. Genistein-induced apoptosis of prostate cancer cells is preceded by a specific decrease in focal adhesion kinase activity. ***Mol Pharmacol*** 51 (2): 193-200,1997.
- KYPRIANOU, N.; TU, H.C.; JACOBS S.C. Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia ***Hum Pathol*** 27 (7): 668-675, JUL 1996.
- LEE, C.; KOZLOWSKI, J.M; GRAYHACK J.T. Etiology of benign prostatic hyperplasia. ***Urol Clin Am*** 22 (2): 237-246, 1995
- LI, R.; WAGA, S.; HANNON G.J; et al. Differential-effects by the p21 cdk inhibitor on PCNA-dependent DNA-replication and repair. ***Nature*** 371 (6497): 534-537,1994.
- LING, M.T; CHAN, K.W; CHOO, C.K. Androgen induces differentiation of a human papillomavirus 16 E6/E7 immortalized prostate epithelial cell line. ***J Endocrinol*** 170 (1): 287-296,2001.
- LONG, B.J; GRIGORYEV, D.N; NNANE, I.P, et al. Antiandrogenic effects of novel androgen synthesis inhibitors on hormone-dependent prostate cancer. ***Cancer Res*** 60 (23): 6630-6640, 2000.
- LOPEZ-OTIN, C.; DIAMANDIS, E. P. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. ***Endocrine Reviews***, 19(4), 365-396, 1998.
- LU, S.; LIU, M., EPNER, D.E; et al. Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter. ***Mol Endocrinol*** 13 (3): 376-384, 1999.
- LU, S.; JENSTER, G.; EPNER, D.E. Androgen induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene: Role of androgen receptor and transcription factor Sp1 complex. ***Mol Endocrinol*** 14 (5): 753-760,2000.
- MANETTO, V.; LORENZINI, R.; CORDONCARDO, C.; et al. Bcl-2 and Bax expression in thyroid tumours - An immunohistochemical and Western blot analysis ***Virchows Arch*** 430 (2): 125-130,1997.
- McDONELL, T.J.; TRONCOSO, P.; BRISBAY, S.M; LOGOTHETIS, C. et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. ***Cancer Res***,52:6940-6944,1992.

- MCLEOD,K.F; SHERRY,N.;HANNON,G.;BEACH,D. et al. P53 dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation and DNA damage. **Genes and Dev.**9: 935-944,1995.
- McNEAL, J.E.. The prostate gland-morphology and pathobiology. **Monogr. Urol.** 4:3-15, 1983.
- MEIGS, J.B; MOHR, B.; BARRY, M.J; et al. Risk factors for clinical benign prostatic hyperplasia in a community-based population of healthy aging men. **J Clin Epidemiol.** 54 (9): 935-944, 2001.
- MITCHELL,K.O; EL-DEIRY, W.S.. Overexpression of c-Myc inhibits p(21WAF1/CIP1) expression and induces S-phase entry in12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-sensitive human cancer cells. **Cell Growth Differ.** 10 (4): 223-230,1999.
- MORSCH, D.M. Efeitos de Androgênios Sobre a Atividade da Ornitina descarboxilase e Proliferação de Células Estromais Prostáticas Humanas.UFRGS. :1-86, 1997. **Dissertação** de Mestrado.
- 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 (3): 405-413,1999.
- OESTERLING, J.E. The origin and development of benign prostatic hyperplasia - an age-dependent process. **J Androl** 12 (6): 348-355,1991.
- OLEA,N.;SAKABE,K.;SOTO,A. M; SONNESNCHEIN,C. The proliferative effect of "anti-androgens" on the Androgen -sensitive Human Prostate Tumor Cell Line LNCaP. **Endocrinology.**126(3): 1457-1463,1990.
- OSTERLING, J. E. Benign Prostatic Hyperplasia: A Review of Its Histogenesis and Natural History. **The Prostate**, 6(Suppl), 67-73, 1996.
- PERLMAN, H.; ZHANG, X.J.; CHEN, M.W., et al. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. **Cell Death Dffer** 6 (1): 48-54,1999.
- PLANZ, B.; WANG,Q.F; KIRLEY, S.D et al. Regulation of keratinocyte growth factor receptor and androgen receptor in epithelial cells of the human prostate. **J Urology** 166 (2): 678-683, 2001.
- RALF,M.C, Social Controls on cell survival and cell death. **Nature.** 256:396-400,1992.
- RAPPOLEE, D.A., WERB, Z., BANDA, M.J., AND MARK, D.F. Developmental expression of PDGF, TGF-a, and TGF-b genes in preimplantation mouse embryos. **Science** 241:708-712, 1988.
- RIVOIRE,W.A; CAPP,E.,CORLETA,H.E; SILVA,I.S.B.Bases biomoleculares da oncogênese cervical.Revista Brasileira de Cancerologia, 47(2): 179-84,2001.
- ROBSON, C.N; GNANAPRAGASAM, V.; BYRNE, R.L. et al. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. **J Endocrinol** 160 (2): 257-266,1999.
- RUIJTER, E.; VAN DE KAA,C.; MILLER, G. et al. Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. **Endocr Rev** 20 (1): 22-45,1999.

- SCHUCHARD, M.;LANDERS, J. P.;SANDHU, N. P.;SPELSBERG, T. C. Steroid Hormone Regulation of Nuclear Proto-oncogenes. *Endocrine Reviews*, 14(6), 659-669, 1993.
- SCHWARZE, S.R; SHI, Y.; FU, V.X; et al. Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* 20 (57): 8184-8192,2001.
- SHERR, C.J. G1 phase progression - cycling on cue. *Cell* 79 (4): 551-555,1994.
- SHERR, C.J; ROBERTS, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G(1)-phase progression. *Gene Dev* 13 (12): 1501-1512,1999.
- SHERWODD,E.R;VAN DONGEN,J.L;WOOD,C.G; LIAO,S.; KOZLOWSKI,J.M; LEE,C. Epidermal growth factor receptor activation in androgen-independent but not androgen-stimulated growth of human prostatic carcinoma cells. *British Journal of Cancer*,77(6),855-861,1998.
- SILVA, I. D. 1993. Ações da Testosterona Sobre a Proliferação Celular em cultura. UFRGS;
- SILVA, I.S.B.; MORSCH DM, 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 (1-2): 153-169,2001.
- SILVA,I.S.B.1998. Efeitos de Androgênios sobre a proliferação celular e a expressão de c-myc, c-fos e c-jun, Receptor de Androgênios e TGF β em Células epiteliais Prostáticas Humanas não Transformadas. Tese de doutorado. UFRGS.
- SINICROPE, F.A; RUAN,S.B; CLEARY, K.R et al. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 55 (2): 237-241,1995.
- SONNENSCHN, C.;OLEA, N.;PASANEN, M. E.;SOTO, A. M. Negative controls of cell proliferation: Human prostate cancer cells and androgens. *Cancer Research*, 49, 3474-3481, 1989.
- SPRITZER, P. M.;SILVA, I. S. B.;OLIVEIRA, I. O.;MORSCH, D. M.;CORAL, G. Culture of adult human prostatic epithelial cells: A simplified method for obtaining primary cultures. *Med Sci Res*, 23, 379-381, 1995.
- TANG, D.G; PORTER,A.T. Target to apoptosis: A hopeful weapon for prostate cancer. *The Prostate* 32 (4): 284-293,1997.
- TAPLIN, T.-M.;BUBLEY, G. J.;SHUSTER, T. D.;FRANTZ, M. E.;SPOONER, A. E.;OGATA, G. K.;KEER, H. N.;BALK, S. P. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 332(21), 1393-1398, 1995.
- TSAI, M.J; OMALLEY, B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63: 451-486, 1994.
- TSUJI, M.; MURAKAMI, Y.;KANAYAMA,H., et al. Immunohistochemical analysis of Ki-67 antigen and Bcl-2 protein expression in prostate cancer: effect of neoadjuvant hormonal therapy. *Brit J Urol* 81 (1): 116-121,1998.
- TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN. J; JAFFE, E. et al. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228 (4706): 1440-1443,1985.

- UEDA, T.; BRUCHOVSKY, N.; SADAR, M.D. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. **J Biol Chem** 277 (9): 7076-7085, 2002.
- UNTERGASSER, G.; RUMPOLD, H.; HERMANN, M.; et al. Proliferative disorders of the aging human prostate: Involvement of protein hormones and their receptors. **Exp Gerontol** 34 (2): 275-287, 1999.
- WAGA, S.; HANNON, G.J.; BEACH, D. et al. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA-replication by interaction with pcna. **Nature** 369 (6481): 574-578, 1994.
- WANG, L.G.; OSSOWSKI, L.; FERRARI, A.C. Overexpressed androgen receptor linked to p21(WAF1) silencing may be responsible for androgen independence and resistance to apoptosis of a prostate cancer cell line. **Cancer Res** 61 (20): 7544-7551, 2001.
- WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell-cycle control. **Cell** 81 (3): 323-330, 1995.
- YEH, S.Y.; HU, Y.C.; RAHMAN, M., et al. Increase of androgen-induced cell death and androgen receptor transactivation by BRCA1 in prostate cancer cells. **P Natl Acad Sci Usa** 97 (21): 11256-11261, 2000.
- ZHOU, Z.X.; WONG, C.I.; SAR, M. et al. The androgen receptor - an overview. **Recent Prog Horm Res** 49: 249-274, 1994.