

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

Modulação androgênica da proliferação celular: expressão do receptor de androgênios, co-reguladores e genes-alvo em células epiteliais prostáticas humanas

ADRIANE POZZOBON

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

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

Porto Alegre, 18 de outubro de 2006

“Todo homem apenas faz o que deseja, e, portanto, age sempre de modo necessário. E a razão está no fato de que ele é já aquilo que quer; porque tudo o que ele faz decorre naturalmente do que é” (...).

(O Livre Arbítrio)

Artur Schopenhauer

*Dedico este trabalho a todos que procuram na ciência, uma ferramenta para auxiliar as
pessoas a viverem melhor.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de fazer um agradecimento especial a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, orientadora desta tese. Agradecer por todos os ensinamentos que foram passados durante o mestrado e doutorado, a oportunidade de seguir desenvolvendo o trabalho com cultura de células. O carinho, compreensão e amizade durante os percalços da vida. Por sua competência, dinamismo, disponibilidade e principalmente pela pessoa que é: sempre fiel honesta e amiga.

Agradeço ao Prof. Dr. Edison Capp pelos ensinamentos, amizade e incentivo, fundamentais durante o desenvolvimento do trabalho. Agradeço à Profa. Dra. Débora Martinho Morsch pela amizade, carinho e ensinamentos das técnicas recebidos durante o trabalho. Sou grata também à Profa. Dra. Poli Mara Spritzer pelo seu conhecimento e incentivo.

Gostaria de agradecer aos colegas de laboratório: Profa. Dra. Maria Beatriz Kohek, César, Gisele, Lolita, Simone, Sheila, Juliana e Miriam pelo carinho e compreensão recebidos durante o trabalho. Ao querido aluno de iniciação científica Diego Pianta, que participou de todas as etapas da tese, desde a coleta do material até as técnicas de biologia molecular e também por toda sua amizade e carinho.

Sou grata aos colegas Ms. Vanderlei Biolchi e Ms. Rafael Orcy pela amizade, convívio agradável e ajuda durante todo o desenvolvimento do projeto. À Profa. Dra. Maria Flávia Ribeiro por todos os ensinamentos durante as análises de proteína, sua ajuda e por toda sua paciência e carinho com a minha pessoa. Ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem Bitencourt Júnior por permitir usar seu laboratório para realização das análises de proliferação celular.

Sou muito grata a Idelma Pithan pelo preparo do material, sempre pronto e impecável para a realização dos experimentos. Pela pessoa que é e por todo seu apoio e amizade. Gostaria de agradecer em memória de Iracema Vera Soares por todo seu carinho, amizade e ensinamentos desde meu começo no mestrado até o dia de sua partida.

Agradeço especialmente aos meus pais, Joãosinho e Nelcy Pozzobon, pelo apoio moral, financeiro e incentivo ao meu trabalho. Às minhas irmãs, Andresa e Tanise, pelo carinho e amor. A minha família e amigos pelas demonstrações de carinho e por compreender a minha ausência na fase final de realização do projeto. Às minhas queridas amigas: Gabriela Pereira, Mariana Toscani, Fabíola e Patrícia Cervi e Anelise Todeschini, por todo carinho e apoio recebidos. Em especial agradeço aos Serviços de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital São Lucas da PUC e Hospital Ernesto Dornelles os quais permitiram a coleta do material fundamental para o estudo.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia, do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o apoio financeiro das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 GLÂNDULA PROSTÁTICA E HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA.....	20
1.2 O RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS E A AÇÃO ANDROGÊNICA.....	24
1.3 Co-REGULADORES DO RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS.....	34
1.4 <i>BCL-2</i> E <i>P21</i>	39
1.5 <i>P53</i>	41
2.OBJETIVO GERAL	46
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	48
3.2 ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	48
3.2.1 Procedimentos para obtenção de cultura de células epiteliais prostáticas humanas	48
3.2.2 Manutenção das células em cultura	50
3.2.3 Avaliação da proliferação celular.....	51
3.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	52
3.3.1 Extração do RNA.....	52

3.3.2	Quantificação do RNA.....	53
3.3.3	Síntese do DNAc.....	54
3.3.4	RT-PCR: quantificação em tempo real.....	55
3.3.4.1	Curva de Padronização	56
3.3.4.2	Curva de normalização.....	57
3.3.5	Protocolo geral da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	57
3.3.6	Oligonucleotídeos específicos.....	60
3.4	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA	64
3.5	WESTERN BLOT.....	65
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
3.7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	68
4.	RESULTADOS.....	69
4.1	ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	69
4.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS.....	72
4.3	ANÁLISE DOS NÍVEIS PROTÉICOS DO AR.....	74
4.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO CO-REGULADOR <i>FHL-2</i>	78
4.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO CO-REGULADOR <i>SHP-1</i>	80
4.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO <i>BCL-2</i>	82
4.7	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO P53 EM DIFERENTES TEMPOS DE TRATAMENTO.....	85
4.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>P53</i>	88
4.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>P21</i>	90
4.10	ANÁLISE DOS NÍVEIS PROTÉICOS DO <i>P21</i> :.....	92
5.	DISCUSSÃO	94
6.	CONCLUSÕES	113
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
	ANEXO 1.....	130
	REPRESENTAÇÃO DAS REAÇÕES DE RT-PCR EM TEMPO REAL.....	130

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. Os hormônios androgênicos atuam na próstata provendo sua diferenciação, crescimento e funcionalidade, sendo este efeito mediado pela ligação do hormônio com o receptor de androgênios (AR) e pela a ativação de genes-alvo. O equilíbrio entre apoptose e proliferação celular é mantido por uma série de genes modulados pelos androgênios que estão implicados no controle do ciclo celular. Este trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos moleculares mediados por androgênio que possam estar envolvidos no descontrole proliferativo do epitélio prostático que ocorre durante a senescência. As células epiteliais prostáticas humanas não-transformadas derivadas de HPB (HNTEP) foram cultivadas e incubadas com diferentes concentrações de diidrotestosterona (DHT) e com o antiandrogênio hidroxiflutamida (OH-FLU). Uma baixa concentração de DHT (10^{-13} M) provocou um aumento significativo na proliferação destas células em relação ao controle e às doses mais altas de androgênio (10^{-10} e 10^{-8} M). Este efeito foi abolido pela adição de OH-FLU. A expressão do gene do AR foi avaliada por RT-PCR em tempo real com diferentes tempos e condições de tratamento, sendo que os níveis de RNAm do AR permaneceram inalterados bem como sua proteína. Buscando compreender fatores que possam interferir na ativação transcricional do AR, avaliou-se a expressão dos co-reguladores *FHL-2* e *shp-1*. No grupo tratado com DHT. 10^{-13} M houve um aumento significativo na expressão do co-ativador *FHL-2* em relação aos outros grupos tratados

(C5%, OH-FLU, DHT. 10^{-8} , DHT. 10^{-8} + OH-FLU e DHT. 10^{-13} +OH-FLU) enquanto que a expressão do co-repressor *shp-1* foi diminuída com esta dose, mas aumentada com a dose de DHT. 10^{-8} .

Genes envolvidos na proliferação celular e que podem ser modulados pela ação androgênica, também foram avaliados em células HNTEP por RT-PCR em tempo real. O gene anti-apoptótico *bcl-2* teve sua expressão aumentada sob o tratamento com DHT. 10^{-13} M em relação ao tratamento com DHT. 10^{-8} . Entretanto, o gene supressor de tumor *p53* apresentou um aumento na sua expressão mediante o tratamento com a alta dose de androgênio (DHT. 10^{-8} M) em relação ao grupo controle, OH-FLU, DHT. 10^{-13} M e DHT. 10^{-8} + OH-FLU. A análise da expressão do gene *p21*, alvo direto do gene *p53*, apresentou resultados semelhantes, com uma maior expressão com DHT. 10^{-8} M. Para averiguar alterações pós-transcricionais avaliou-se também os níveis protéicos do AR que não apresentaram alteração significativa e do *p21*, que apresentou uma maior marcação da proteína quando tratado com DHT 10^{-8} M. Os dados obtidos neste trabalho indicam que pode ocorrer uma modulação da expressão destes genes mediante o tratamento com diidrotestosterona. Baixas doses de androgênio desencadeiam uma via estimulatória da proliferação enquanto que altas doses promovem a ativação de uma via inibitória nas células HNTEP.

ABSTRACT

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a pathologic condition that affects older men and is present in 50% of the male population at 85 years of age. The androgenic hormones act on the prostate gland promoting its differentiation, growth and function, this effect being mediated by the hormone's binding to the androgen receptor (AR) and the activation of target genes. The balance between apoptosis and cell proliferation is maintained by a series of genes modulated by the androgens that are implicated in the cell cycle control. This research aimed to investigate the androgen-mediated molecular mechanisms that may be involved in the proliferative imbalance of the prostatic epithelium in older men. Human non-transformed epithelial prostate (HNTEP) cells derived from BPH were incubated in different concentrations of dihydrotestosterone (DHT) and of antiandrogen hydroxylutamide (OH-FLU). A low concentration of DHT (10^{-13} M) led to a significant increase in the proliferation of these cells as compared to the control condition and to higher concentrations (10^{-10} and 10^{-8} M). This effect was abolished by the addition of OH-FLU. AR gene expression was evaluated by real-time RT-PCR in different times and conditions of treatment, and no differences in the AR mRNA and its protein were found. In an attempt to understand the factors that can change the AR transcriptional activation, the expression of co-regulators *FHL-2* and *shp-*

1 were also evaluated. There was a significantly increased expression of co-activator *FHL-2* in the group treated with DHT. 10^{-13} M as compared to all other groups (C5%, OH-FLU, DHT. 10^{-8} , DHT. 10^{-8} + OH-FLU and DHT. 10^{-13} +OH-FLU). On the other hand *shp-1* expression was low at this concentration but high when cells were treated with DHT. 10^{-8} M. Genes participating in cell proliferation and that can be modulated by androgens were also evaluated in HNTEP cells by real-time RT-PCR. The anti-apoptotic *bcl-2* gene had its expression increased by the treatment with DHT. 10^{-13} M as compared to the treatment with DHT. 10^{-8} M. However, the expression of tumor-suppressing *p53* gene showed an increase in its expression by the treatment with a high level of androgen (DHT. 10^{-8} M) as compared to control, OH-FLU, DHT. 10^{-13} M and DHT. 10^{-8} + OH-FLU. The analysis of gene *p21* expression, direct target of *p53* gene, presented similar results (higher expression with DHT. 10^{-8} M). Post-transcriptional alterations were studied by evaluating the proteins levels of AR and *p21*; there were no significant differences, but the latter showed greater protein labeling when treated with DHT. 10^{-8} M. The data obtained here indicate that the expression of these genes may be modulated by dihydrotestosterone (DHT). Low concentrations of androgens trigger a stimulatory pathway of proliferation, while high concentrations promote the activation of an inhibitory pathway in HNTEP cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento da HPB	21
Figura 2: Gene do AR	26
Figura 3: Mecanismo de ação androgênica.	30
Figura 4: Representação esquemática da ligação de co-reguladores com o AR.	38
Figura 5: Representação da RT-PCR em tempo real.....	59
Figura 6: Efeitos da diidrotestosterona sobre a proliferação de células HNTEP	71
Figura 7. Expressão do AR em células HNTEP por RT-PCR em tempo real.....	73
Figura 8A e 8B: Análise da proteína do AR.....	75
Figura 8C: Níveis protéicos do AR	76
Figura 9A e 9B. Análise da proteína do AR por Western blot.	77
Figura 10: Expressão do gene <i>FHL-2</i> em células HNTEP por RT-PCR em tempo real. 79	
Figura 11: Expressão do <i>shp-1</i> em células HNTEP por RT-PCR em tempo real.....	81
Figura 12A: Expressão do <i>bcl-2</i> em células HNTEP.	83
Figura 12 B. Expressão do <i>bcl-2</i> em células HNTEP	84
Figura 13A .Expressão do <i>p53</i> em células HNTEP	86
Figura 13B: Expressão do <i>p53</i> em células HNTEP.....	87
Figura 14: Expressão do <i>p53</i> em células HNTEP por RT-PCR em tempo real.....	89

Figura 15: Expressão do <i>p21</i> em células HNTEP por RT-PCR em tempo real.....	91
Figura 16. Análise da proteína do <i>p21</i> por Western blot.	93
Figura 17: Hipótese proposta para o mecanismo de ação de altas doses de androgênios nas células HNTEP	111
Figura 18: Hipótese proposta para o mecanismo de ação de baixas doses de androgênios nas células HNTEP.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Adenosina

A_{260} – Absorbância a 260 nm

AES – *Amino-terminal Enhancer of Split*

AIB-1 – *Amplified-in-breast cancer 1*

AIB-3 – *Amplified-in-breast cancer 3*

APAF-1- fator ativante de peptidase apoptótica

AR – Receptor de Androgênio

ARA70- Proteína 70 associada ao AR

ARA55- Proteína 55 associada ao AR

ARA54- Proteína 54 associada ao AR

ARE – Elemento Responsivo ao Androgênio

ATP – Adenosina trifosfato

AKIP- *PKA-interacting protein (AKIP 1)*

Akt- *protein kinase B (PKB)*

Bad – *bcl2 antagonist of cell death*

Bak- *bcl2 antagonist killer*

Bid- *bh3-interacting domain death agonist*

Bax- Proteína x associada ao *bcl-2*

Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*

BRCA1 – *Breast Cancer 1*

β_2m – *Betamicroglobulina*

C - Citosina

C5% - Meio de controle – meio 199 suplementado com 5% de soro bovino fetal desteroidado

CaP – Carcinoma Prostático

CBP – Proteína ligadora de corticosteróide

CD – Ciclinas

CDK – Quinase dependente de ciclinas

CDKI – Inibidor da quinase dependente de ciclinas

c-fos - oncogene viral homólogo ao osteosarcoma murino

c-jun- oncogene viral homólogo ao sarcoma aviário

CHO – Linhagem celular derivada de ovários de camundongos

cm² – centímetro quadrado

CO₂ – Dióxido de Carbono

C_T – Ciclo Limiar (*Threshold Cycle*)

CVI – Linhagem de células renais de macacos verdes africanos

D – Diluição da alíquota usada para a quantificação

DAX- 1- *nuclear receptor subfamily 0, group b, member 1*;

DBD – *DNA Bind Domain* (Domínio de Ligação do DNA)

DEPC - dietilpirocarbonato

DHT – Diidrotestosterona

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DNAC – Ácido desoxirribonucléico complementar

dNTP – Desoxinucleotídeo trifosfatado

DTT - Ditiotreitól

DU-145 – Linhagem celular de carcinoma prostático

EGCG – *Epigallocatechin-3-Galleate*

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EP – Erro padrão

ER – Receptor de Estrogênio

FAS : *TNF receptor superfamily member*

FHL-2 – Four-and-a half LIM domains 2

G - Guanina

GPPG/HCPA – Grupo de pesquisa e pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

GSK3 β - *glycogen synthase kinase 3-beta*

h – Hora

HCl- ácido clorídrico

HDAC1- Histona desacetilase 1

HNTEP – Células epiteliais prostáticas humanas não-transformadas

HPB – Hiperplasia Prostática Benigna

HPEC – Células epiteliais prostáticas humanas

HPR-1 – Linhagem de células epiteliais prostáticas humanas não-malignas

HSP - Proteínas do choque térmico

HRad9- *human rad9 homolog*

KDa – QuiloDaltons

KCl- Cloreto de potássio

LDB – Domínio de Ligação do Ligante

LNCaP – Linhagem de linfonodo metastático de carcinoma prostático

LNCaPabl – Linhagem de linfonodo metastático de carcinoma prostático independente de androgênios

M - Molar

mcl-1- *Homo sapiens myeloid cell leukemia sequence 1*

min - minuto

mg - miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

MOP – Linhagem celular derivada de LNCaP

RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro

MTT – *Dimethylthiazol – Diphenyltetrazolidium Bromide*

µg - micrograma

µM - micromolar

µL – microlitro

NaCl- Cloreto de sódio

NCoR1 – *Nuclear Receptor Co-repressor 1*

ng - nanograma

nM - nanomolar

nm – nanômetro

NC - Nitrocelulose

NT – Domínio de Transativação

OH-Flu - Hidroxiflutamida

pb – pares de bases

PAK-6 - *p21-activated kinase- and phospholipase c-interacting protein*

PBS – Tampão Salina Fosfato

PCAF- Fator associado a *P300/CBPr*

PC-3 – Carcinoma prostático independente de androgênios

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PIAS1 – *Protein Inhibitor of Activated STAT1*

PNT1A – Linhagem celular prostática humana imortalizada

PNT2 – Linhagem imortalizada de células epiteliais humanas derivadas de próstata normal

PIN – Neoplasia prostática intraepitelial

PSA – Antígeno Prostático Específico

R1881 – Androgênio Sintético

Rb - Retinoblastoma

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAis – Silenciamento por RNA de interferência

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa

SBF – Soro Bovino Fetal

SBF-DT – Soro Bovino Fetal desteroideado

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Eletroforese de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SHP – *Short Heterodimer Partner*

SMAD- mothers against decapentaplegic, drosophila, homolog of 1; smad1

SRC – Co-ativador de receptor esteróide

STAT1 – Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1

T - Timina

T"O" – tempo zero

TIF2 – *Translation Initiation Factor 2*

TIP60 – *TAT Interactive Protein 60kd*

TBS – Tris 20mM, NaCl 140mM

TTBS – Tris 20mM, NaCl 140mM, 0,05% de Tween 20

U- Unidades

v - Volts

xg - gravidade

1. INTRODUÇÃO

1.1 GLÂNDULA PROSTÁTICA E HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

A glândula prostática é dependente de hormônios esteróides para seu desenvolvimento embrionário, crescimento puberal e funcionalidade secretora. Durante o período reprodutivo, esta glândula participa da fertilidade e reprodução, com o fornecimento de nutrientes e manutenção do pH do esperma e fluído seminal. Com o avanço da idade ocorrem alterações no tecido prostático promovendo o aparecimento de diversas doenças prostáticas, dentre elas a hiperplasia prostática benigna (HPB). Embora a patogênese da HPB seja pouco conhecida existem dois fatores de consenso para seu desenvolvimento: a presença de androgênios circulantes e o avanço da idade (Isaacs 1994).

Histologicamente a HPB é caracterizada por hiperplasia progressiva de tecido glandular epitelial e tecido estromal ao redor da uretra, com crescimento nodular localizado na zona de transição ou periuretral (McNeal 1990; Shapiro, Hartanto et al. 1997) (Figura 1).

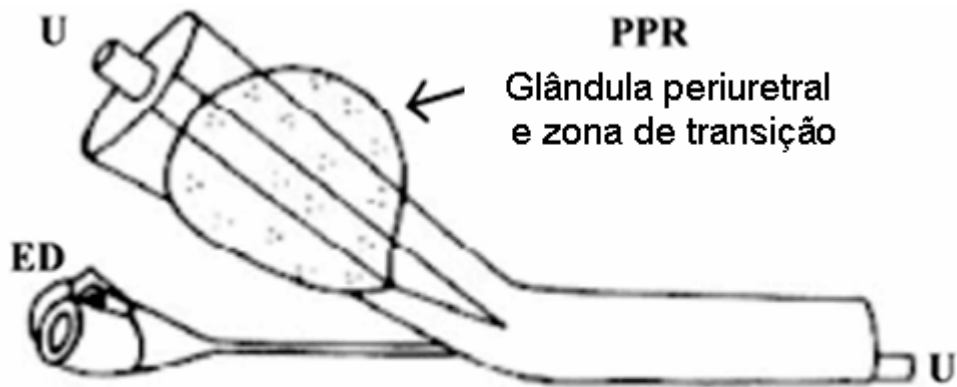


FIGURA 1: DESENVOLVIMENTO DA HPB

Vista lateral de um esquema da próstata. Retiradas as zonas anterior, periférica e central. U= uretra, ED= ducto ejaculatório, PPR= região pré-prostática. Modificado de (Sampaio 1992).

As células estromais possuem enzimas necessárias para a produção de hormônios esteróides biologicamente ativos tais como estrogênios (através da aromatase) e diidrotestosterona (DHT) (através da 5-alfa-redutase tipo 2). Estudos das concentrações de esteróides intra-prostáticos têm mostrado que a produção de testosterona declina com a idade e a proporção estradiol/testosterona está aumentada em pacientes com HPB (Shibata, Ito et al. 2000; Roberts RO 2004).

A DHT é produzida pela ação da 5-alfa redutase sobre a testosterona. Esta enzima é expressa em células epiteliais e estromais e possui sua atividade aumentada na HPB. Um dos tratamentos para HPB é feito com inibidores desta enzima (exemplo: finasterida) (Silver RI 1994).

A HPB possui um alto índice de prevalência na população e a consequência mais comum desta doença está relacionada ao aumento na morbidade com decréscimo na qualidade de vida do paciente. Oesterling relatou 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 está presente em 50% dos homens com cerca de 85 anos de idade (Oesterling 1996). Recentemente um estudo populacional e randomizado (MMAS: *Massachusetts Male Aging Study*) verificou a prevalência de HPB 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, Mohr et al. 2001).

A HPB abrange os sintomas do trato urinário inferior, como: urgência miccional, aumento da freqüência urinária, noctúria, esvaziamento incompleto da bexiga e fraco fluxo urinário, enquanto que as complicações mais sérias seriam retenção urinária aguda, insuficiência renal, infecções do trato urinário e cálculo vesical (McVary 2006). Um estudo recente relatou que o surgimento de sintomas moderados e severos aumenta progressivamente após 50 anos de idade (Wei JT 2005). A HPB pode ser avaliada bioquimicamente pelos níveis séricos do PSA, que é uma serina protease produzida pelo epitélio prostático. Níveis aumentados do PSA aparecem em homens com aumento da glândula e com carcinoma prostático (CaP). Em homens com aumento do volume prostático o PSA é elevado devido à proliferação do epitélio, enquanto que a destruição tecidual local com o vazamento do PSA para a circulação também contribui para o aumento do PSA em CaP (Jacobsen, Girman et al. 2001).

A exposição ao androgênio é fundamental para o desenvolvimento, crescimento e função da glândula prostática. Níveis séricos elevados de testosterona são requeridos durante o período embrionário e vida adulta. Durante a senescência, o declínio dos níveis de testosterona é acompanhado do aumento do tamanho da próstata (Berry, Coffey et al. 1984). Zhuang e colaboradores demonstraram uma correlação inversa entre os níveis plasmáticos de testosterona e o volume prostático (Zhuang, Ly et al. 2005).

1.2 O RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS E A AÇÃO ANDROGÊNICA.

A ação androgênica ocorre via receptor de androgênios (AR) o qual é um fator de transcrição que regula a expressão de genes-alvo dos hormônios androgênios.

A interação entre os androgênios, testosterona e diidrotestosterona com o AR resulta na ativação transcricional de genes-alvo que possuem um papel crucial no desenvolvimento sexual masculino e na composição corpórea. O papel do AR pode ser observado na Síndrome de Insensibilidade Androgênica, onde mutações no gene do AR de machos 46XY resultam em um receptor não funcional com o conseqüente não desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos (Brinkmann 2001).

O AR é membro da superfamília de receptores nucleares à qual pertencem os receptores dos hormônios tireóideos, ácido retinóico, vitamina D, estrogênio, progesterona, glicocorticóide e outros (Aranda and Pascual 2001).

O gene do AR humano está localizado no cromossomo X na posição Xq11-12 sendo composto por oito éxons que codificam três domínios funcionais (Zhou, Wong et al. 1994). Um domínio de ligação com o hormônio (LDB- domínio de ligação com ligante), codificado pelos éxons 4 a 8, regula processos como a homo e a heterodimerização do receptor, a interação com as proteínas de choque térmico e a atividade ou repressão transcricional (Figura 2). O LDB contém uma região chamada AF-2 que é responsável pela ativação transcricional dependente do ligante (Wurtz, Bourguet et al. 1996).

Os éxons 2 e 3 codificam o domínio de ligação com o DNA, chamado DBD (domínio de ligação com DNA) que confere ao AR a capacidade de reconhecer seqüências específicas e ativar genes alvos da ação androgênica. Apresenta também um domínio de transativação (NT) na extremidade amino-terminal, codificado pelo éxon 1. Esta região contém 555 resíduos de aminoácidos, sendo a região mais variável entre os membros da família de receptores nucleares. É alvo de vários co-reguladores e contém uma região chamada de AF-1 entre os aminoácidos 141- 338, que está envolvida na ativação transcricional (Simental, Sar et al. 1991). Contribui também para a ativação do receptor por uma via independente da ligação com o androgênio (Aranda and Pascual 2001). A região AF-5, entre os aminoácidos 369 e 493 no NT, parece interagir com o LDB (Brinkmann 2001).

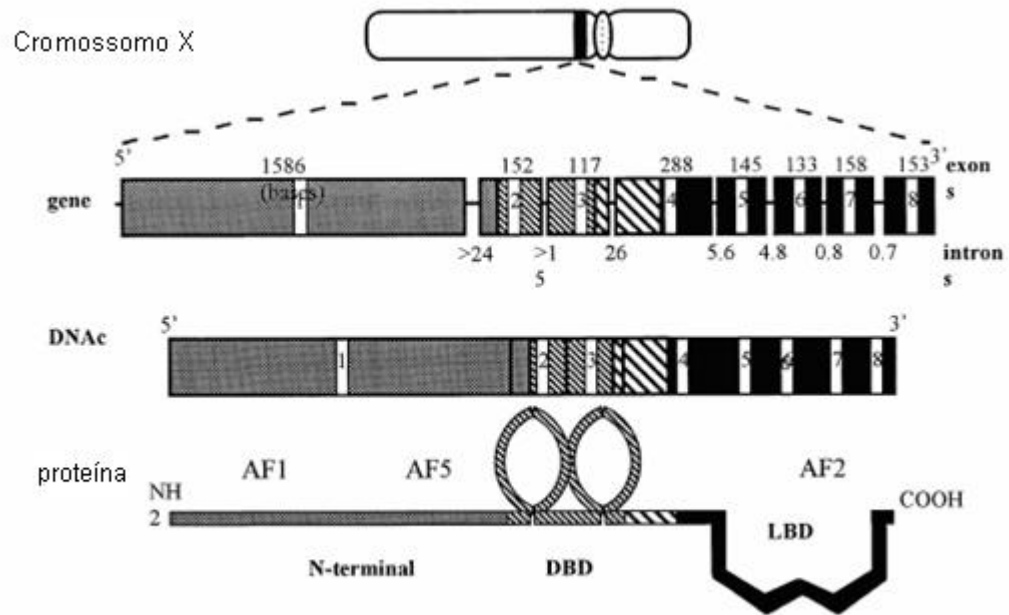


FIGURA 2: GENE DO AR

Representação do AR contendo seus 8 éxons, domínios funcionais e regiões AF-1, 2 e 5 (Gobinet, Poujol et al. 2002).

O domínio NT apresenta duas regiões polimórficas com trinucleotídeos repetidos. O trinucleotídeo CAG que codifica o trato poliglutamínico é necessário para a transcrição induzida por ligante e o trinucleotídeo GGN codifica o trato poliglicínico. As duas regiões são separadas por uma seqüência de 248 aminoácidos não-polimórficos. Polimorfismos na região NT estão associados com alterações na atividade transcricional do AR (Gao, Marcelli et al. 1996; Heinlein and Chang 2004). Tem sido demonstrado que o número de repetições CAG é amplamente variável, sendo que um baixo número de repetições (< 22) está relacionado com aumento da atividade do AR, risco de câncer de próstata e HPB enquanto que um número grande de repetições relaciona-se com baixa atividade transcricional do AR (Yeap, Wilce et al. 2004).

A atividade funcional do AR é determinada por interações entre o domínio NT e o LDB. Antagonistas ou agonistas do AR ou mutações que impedem esta interação podem resultar em perda funcional do AR (Ikonen, Palvimo et al. 1997; Thompson, Saatcioglu et al. 2001).

Da mesma forma que ocorre com o receptor de progesterona, estrogênio e glicocorticóide foram descritas isoformas para o AR. Gregory e colaboradores relataram pela técnica de *immunoblot* uma forma A de 87kDa e a predominância de uma forma B com 114kDa em uma linhagem celular dependente de androgênio, LNCaP, em uma derivação desta linhagem privada de androgênio, a LNCaP-C4-2, e nas células CWR-R1 derivadas de tumor prostático. Pequenas quantidades da isoforma A do AR apareceram em CWR-R1, LNCaP e LNCaP-C4-2 (Gregory, He et al. 2001).

Um outro estudo demonstrou a presença de isoformas do AR em células HBO (derivadas de osteoblastos humanos). A forma B marcou uma proteína de 119KDa e a forma A de 84KDa. Ocorreu um aumento da expressão da forma B nas células que receberam DHT (10nM) enquanto que a forma A permaneceu inalterada. Neste mesmo estudo células derivadas de fibroblastos da pele genital (GSF) tratadas com 100nM de DHT apresentaram um aumento na síntese de DNA relacionado a uma grande expressão da isoforma B, indicando que a isoforma B corresponde à forma do AR que possui a integridade dos domínios de ligação com o androgênio e aminoterminal (Liebigel, Sommer et al. 2003).

A presença do hormônio é o primeiro passo para a ativação do AR, o que permite a liberação das proteínas de choque térmico (HSP) (Veldscholte, Berrevoets et al. 1992) tornando o complexo hormônio-receptor um fator de transcrição nuclear ativo capaz de interagir com o DNA. As HSP90 e 70 se ligam diretamente ao LDB do AR e mantêm a capacidade do AR de se combinar com o ligante.

A ligação do androgênio promove a hiperfosforilação do AR por um processo comum a todos os receptores nucleares e fatores de transcrição. O papel desta fosforilação ainda é desconhecido, mas acredita-se estar envolvida no recrutamento de co-ativadores e ativação da transcrição (Gobinet, Poujol et al. 2002).

Para mediar os efeitos do androgênio, o receptor precisa interagir com elementos responsivos ao androgênio (ARE) no DNA. Após a ligação ao ARE o AR é capaz de

recrutar todos os componentes necessários à transcrição gênica, como a RNA polimerase II e histona acetiltransferases que induzem a descompactação da cromatina para a RNA polimerase poder agir. A figura 3 ilustra este mecanismo de ação.

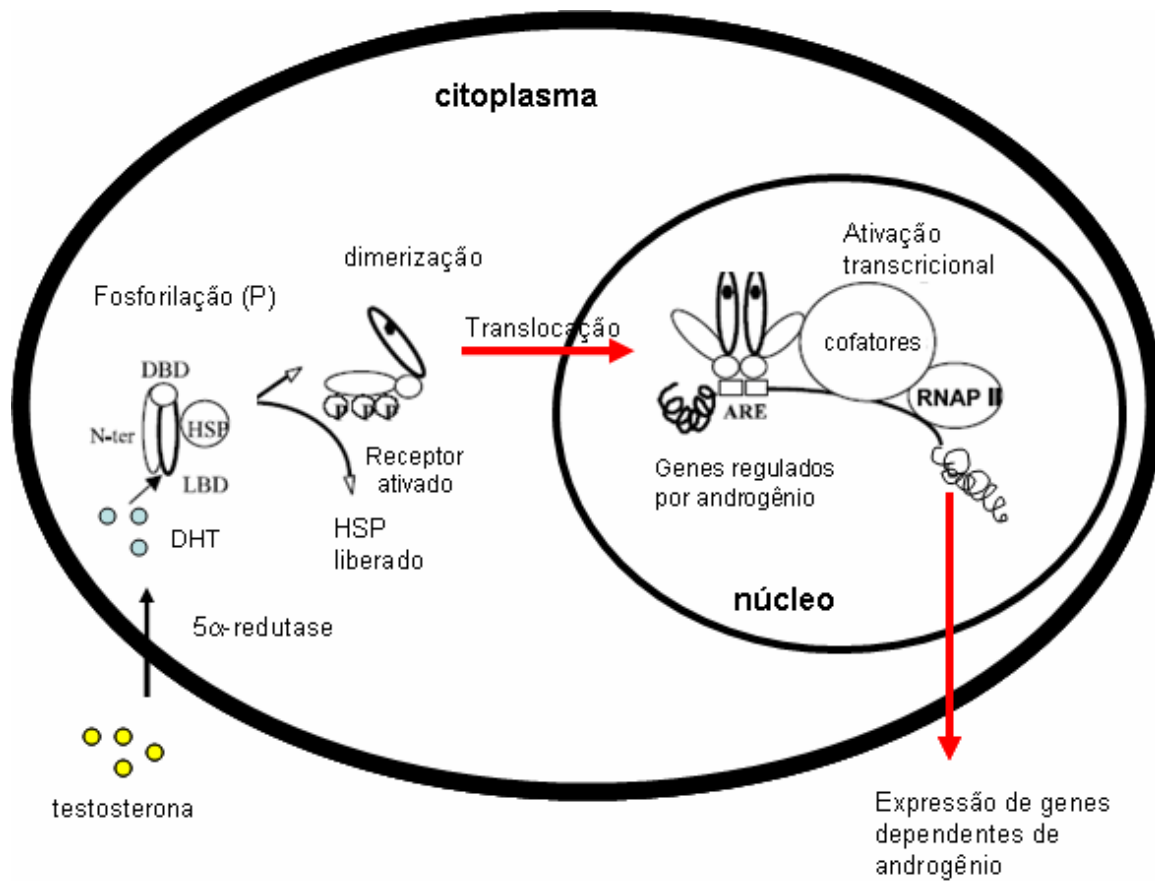


FIGURA 3: MECANISMO DE AÇÃO ANDROGÊNICA.

DBD= domínio de ligação com DNA, LDB= domínio de ligação com ligante, DHT= diidrotestosterona, HSP= proteínas de choque térmico, ARE= elemento responsivo ao androgênio, RNAPII= RNA polimerase II. Modificada (Gobinet, Poujol et al. 2002).

O efeito androgênico tem sido avaliado 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, Berthaut et al. 1998) .

É bem relatado na literatura um efeito bifásico da ação androgênica sobre a proliferação de células prostáticas. Estudos *in vitro* utilizando linhagens de células tumorais responsivas ao androgênio, como LNCaP e MOP, demonstraram que altas doses de androgênios inibem a proliferação celular enquanto baixas doses estimulam (Joly-Pharaboz, Soave et al. 1995; Joly-Pharaboz, Ruffion et al. 2000 ;Lee, Sutkowski et al. 1995 ; Sonnenschein, Olea et al. 1989). Este efeito bifásico também foi verificado pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando células não-transformadas, em um modelo de cultura primária de células epiteliais prostáticas humanas derivadas de hiperplasia prostática benigna (HPB). Neste modelo, a administração de baixas concentrações de testosterona ($2 \cdot 10^{-10}$, 10^{-11} M) ou diidrotestosterona (DHT. 10^{-13} M) estimulou significativamente a proliferação destas células, enquanto uma alta concentração de DHT (10^{-8} M) mantém a proliferação semelhante ao controle (Silva, Morsch et al. 2001; Brum, Morsch et al. 2003). Long e colaboradores demonstraram um aumento da proliferação na linhagem celular andrógeno-dependente LNCaP após o tratamento com DHT (Long, Grigoryev et al. 2000) enquanto que Berthon e colaboradores não conseguiram demonstrar o efeito proliferativo dos androgênios em células epiteliais prostáticas normais, hiperplásicas ou tumorais tratadas com diferentes concentrações de DHT (10^{-11} a 10^{-7} M) (Berthon, Waller et al. 1997).

A dependência androgênica para o desenvolvimento de carcinoma de próstata (CaP) também é classicamente descrita e foi primeiramente reconhecida por Huggins e Hodges em 1941, que demonstraram que a remoção de androgênios levou à regressão do CaP. Este conhecimento tornou-se a base para a terapia de privação androgênica para tumores confinados ao órgão (Huggins and Hodges 1941). A fisiopatologia do CaP e sua progressão é caracterizada por uma atividade anormal de várias vias regulatórias de proliferação e crescimento das células prostáticas. O modelo *in vitro* mais utilizado para estudo de CaP é a linhagem LNCaP, derivada de linfonodo de carcinoma prostático metastático, que é responsiva ao tratamento androgênico (Kokontis, Takakura et al. 1994; Culig, Hoffmann et al. 1999). O AR, em células LNCaP apresenta uma mutação pontual. Esta mutação confere afinidade aumentada do receptor ao tratamento com estrogênio e progesterona, mas não altera a sua afinidade ao tratamento com o androgênio sintético R1881 (Matias, Donner et al. 2000).

Cultura de linhagens imortalizadas de células epiteliais prostáticas (PNT1A) e tumorais (DU-145) tratadas com o androgênio sintético R1881 na concentração de 10^{-9} M, mostram um aumento na atividade do AR em células PNT1A, enquanto teve pouco efeito nas células DU-145 que são caracterizadas por não possuírem um AR funcional. A adição do antiandrogênio hidroxiflutamida foi capaz de provocar um decréscimo significativo na atividade do AR em células PNT1A (Avances, Georget et al. 2001). Os níveis protéicos do AR em células epiteliais prostáticas imortalizadas e responsivas ao hormônio (PNT2), tratadas com DHT 5.10^{-9} M por 48 horas foram avaliados por

Blanchere e colaboradores, verificando após 2 horas de tratamento um aumento nos níveis da proteína do AR, com um pico em 6 horas de tratamento (Blanchere, Berthaut et al. 1998).

A importância do AR para a proliferação mediada por androgênio também foi demonstrada com o uso da tecnologia de silenciamento por RNA de interferência (RNAs) em LNCaP. Yang e colaboradores desenharam um plasmídeo contendo RNAs para silenciamento do AR em LNCaP e demonstraram que estas células não conseguem proliferar e nem sobreviver quando o AR é silenciado (Yang, Fung et al. 2005). Um recente estudo demonstrou que células LNCaP e uma derivação, independente do andrógeno, LNCaPabl, foram tratadas com RNAs_{AR_start} resultando em uma significativa redução dos níveis de RNAm e proteína do AR bem como uma diminuição na proliferação (Haag, Bektic et al. 2005).

Além da ação genômica clássica dos androgênios via seu receptor intracelular (iAR), nos últimos anos tem se evidenciado a presença de um receptor de membrana para o AR (mAR), onde a ligação do hormônio, que deve estar ligado à albumina para impedir sua entrada na célula, provocaria uma série de efeitos rápidos (minutos) classificados como não-genômicos, os quais incluem: alterações no citoesqueleto, ativação de cinases e alterações do cálcio intracelular (Kampa, Papakonstanti et al. 2002). Esses efeitos não-genômicos não são afetados por inibidores de transcrição como actinomicina D ou de síntese protéica como cicloheximida. O mAR foi descrito em LNCaP e a ativação deste receptor pode resultar em uma via que promova a apoptose nestas células (Hatzoglou, Kampa et al. 2005).

1.3 CO-REGULADORES DO RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS

A transcrição mediada por androgênios pode ser realçada ou inibida por interações entre o AR e co-fatores. Esses co-fatores ou co-reguladores, por definição, seriam moléculas que formam complexos multiprotéicos que podem se ligar a qualquer um dos domínios do AR alterando sua atividade transcricional, além de poderem agir como cinases, ATPases, acetilases, desacetilases e proteases para facilitar o acesso da RNA polimerase II e, conseqüentemente, a transcrição (Heinlein and Chang 2002).

Linja e colaboradores analisaram a expressão de vários co-fatores como SRC-1, TIF2, PIAS1, ARIP, BRCA1, beta-catenina, AIB3, AIB1, CBP, STAT1 NCoR1, AES, ciclina D1, p300 e ARA24, em amostras de HPB, tumores prostáticos primários e refratários. Nessas amostras, a expressão destes co-fatores pela técnica de PCR (*Reação em cadeia da Polimerase*) em tempo real, foi, de maneira geral, semelhante, com exceção do PIAS1 e SRC1 cuja expressão foi mais baixa em tumores refratários que nos primários (Linja, Porkka et al. 2004). A proliferação celular em ausência do ligante pode ser influenciada por vários co-ativadores como SRC-1, SRC-3, TIF-2 ou SRC-2 (*steroid receptor cofactor family*), p300, Tip60 (*Tat interactive protein 60kd*), e *c-jun*. A expressão de alguns co-ativadores como ARA55 e TIF2 também foi demonstrada por PCR em linhagens de CaP onde o ARA55 foi detectado na linhagem PC-3 que não expressa o AR, enquanto TIF2 foi muito expresso em PC-3 mas pouco expresso na linhagem LNCaP (Fujimoto, Mizokami et al. 2001).

O primeiro co-ativador que foi descrito em uma linhagem celular de CaP, DU-145 foi o ARA70 (Yeh and Chang 1996) que interage com o LDB do AR e sua expressão é aumentada em tumores prostáticos (Hu, Yeh et al. 2004). O ARA70 pode ser ativado por antiandrogênios, o que pode contribuir para o desenvolvimento da falência da terapia de bloqueio androgênico. Este fator além de potencializar a ativação do AR em presença de androgênio também responde a antiandrogênios ou 17 β -estradiol (Yeh, Miyamoto et al. 1998). A expressão do ARA70 foi demonstrada em células PC-3 e LNCaP (Rahman, Miyamoto et al. 2003; Hu, Yeh et al. 2004). As células LNCaP transfectadas com ARA70 mutante, que tem papel inibitório, e tratadas por 24 horas com 1nM de DHT, apresentaram uma diminuição da expressão protéica do PSA, que é um gene-alvo do AR e normalmente expresso em resposta ao tratamento androgênico (Rahman, Miyamoto et al. 2003).

O *FHL-2* (*Four-and-a half LIM domains 2*) é um co-ativador do AR e foi analisado no presente estudo. A análise por imunistoquímica revelou a expressão da proteína codificada por este gene no tecido humano cardíaco e epitélio prostático (Muller, Isele et al. 2000). O *FHL-2* é um co-ativador específico do AR, não agindo em outros receptores nucleares e seletivamente aumenta a atividade transcricional do AR de maneira dependente do AF-2 e agonistas androgênicos. Além disso, sua expressão resulta na ativação do gene da probasina que é regulado por androgênio, sugerindo o papel do *FHL-2* na função da glândula prostática (Muller, Isele et al. 2000). Em contrapartida, Nessler e colaboradores investigaram a expressão de 12 co-reguladores do AR por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa)

em linhagens de células epiteliais de CaP: LNCaP, DU-145 e PC-3 e cultura primária de células estromais. Dentre eles os únicos que não foram expressos em todas as células foram o ARA55 e o *FHL-2*. O *FHL-2* só foi expresso em DU-145, PC-3 e células estromais, questionando desta forma a exclusividade da expressão do *FHL-2* no epitélio prostático (Nessler-Menardi, Jotova et al. 2000).

O *FHL-2* aumentou a ativação do AR na linhagem celular CVI, derivada de células do rim de macacos, co-transfectadas com AR e *FHL-2* mediante tratamento com 10^{-9} M do androgênio R1881 (Gobinet, Auzou et al. 2001), enquanto que um recente estudo demonstrou que a expressão do *FHL-2* era 2 a 4 vezes menor em tumores prostáticos do que no tecido prostático normal (Kinoshita, Nakagawa et al. 2005).

Os co-repressores atuam por vários mecanismos de supressão como inibição da ligação com DNA ou translocação do AR (calreticulina, ARA67, DAX-1, AK6), recrutamento de histonas desacetilases (HDAC1, TGIF, ARR19, DJBP, SMRT/NCoR), interrupção da interação entre o AR e co-ativadores (*shp-1 Akt*, Ciclina D1, Smad3/Smad4), interrupção da interação entre os domínios LDB e NT do AR (hRad9, GSK3 β) e vários outros (Wang, Hsu et al. 2005) .

O *shp-1* (*short heterodimer partner*) é um receptor nuclear órfão, ou seja, proteínas que possuem um ligante desconhecido. Ele foi descrito como inibidor de alguns receptores nucleares e primeiramente descoberto por sua interação com o receptor nuclear do ácido retinóico (Seol, Choi et al. 1996). *Shp-1* pode interagir com ER (receptor de estrogênio) inibindo sua ação e pode estar expresso em tecidos-alvo da ação androgênica (Gobinet, Auzou et al. 2001). Um estudo populacional também

demonstrou que mutações no gene *shp-1* foram relacionadas com o desenvolvimento de obesidade (Nishigori, Tomura et al. 2001).

Gobinet e colaboradores demonstraram que o *shp-1* pode agir como repressor da atividade transcricional do AR tanto nos domínios LDB quanto NT. Utilizando células CV1 e CHO (derivadas do ovário de camundongos) transfectadas com *shp-1* obtiveram uma repressão da atividade do AR induzida pelo androgênio sintético R1881 na concentração de 10^{-9} M. Além disso, este mesmo trabalho demonstrou que o *shp-1* reverte o efeito dos ativadores *FHL-2* e TIF2 que foram co-transfectados nestas células (Gobinet, Auzou et al. 2001). A figura 4 representa a interação de alguns co-reguladores com o AR. Estudos envolvendo estes co-reguladores ainda são controversos devido à complexidade da ação androgênica em tecidos-alvo.

Cofatores do AR

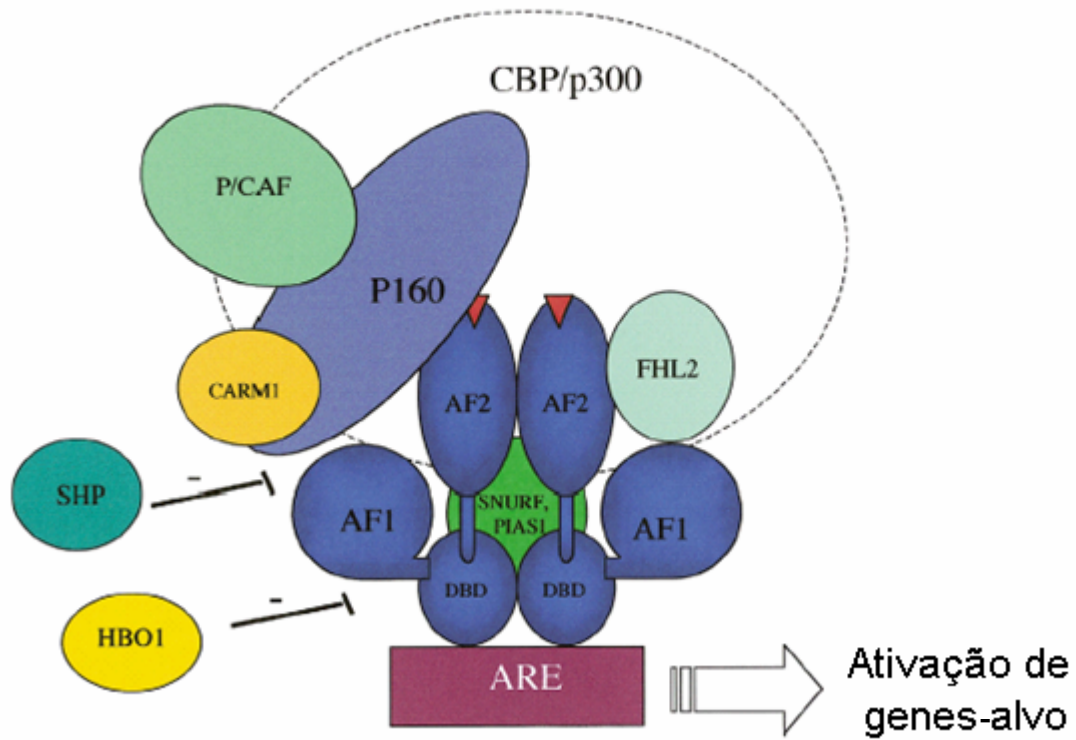


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LIGAÇÃO DE CO-REGULADORES COM O AR.

Modificado de Gobinet, Poujol et al. 2002.

1.4 BCL-2 E P21

A homeostase celular e tecidual é regulada por um equilíbrio entre dois processos: apoptose e proliferação. Diversos mecanismos moleculares estão implicados no controle destes processos. Apoptose é um processo geneticamente regulado que requer a expressão e ação de produtos de genes (Buttayan, Shabsigh et al. 1999). Dentre eles, o *bcl-2* promove a viabilidade celular sem promover a proliferação, mas o mecanismo exato pelo qual exerce seus efeitos ainda é controverso.

O gene *bcl-2* foi primeiramente identificado como um protooncogene em linfoma de células B (Tsujimoto, Cossman et al. 1985). Protooncogenes podem ser genes regulatórios precoces apresentando uma modulação dentro de minutos até 2 horas. O *bcl-2* é composto por 3 *exons* e localizado no cromossomo 18q21 (Hesketh 1995). Este gene faz parte de uma família de genes reguladores da morte celular programada, apoptose, da qual também participam os genes anti-apoptóticos (*bcl-xL* e *mcl-1*) e os pró-apoptóticos (*bax*, *bak*, *bcl-xS*, *bad*, *bid*) sendo que a dimerização entre as moléculas anti-apoptóticas e as pró-apoptóticas determina se a resposta será proliferação ou apoptose. Homodímeros *bax-bax* atuam como promotores da apoptose e heterodímeros *bcl-2/bax* desencadeiam sinais proliferativos (Reed 1994).

Estudos realizados em carcinoma de próstata demonstraram a expressão do *bcl-2* associada ao receptor de androgênios (Bonkhoff, Fixemer et al. 1998; Tsuji, Murakami et al. 1998; Baretton, Klenk et al. 1999), sendo que o aumento da expressão do *bcl-2*

em tumores prostáticos está implicado na progressão do tumor para estágios avançados e resistentes à terapia de privação hormonal.

A progressão através do ciclo celular é associada a complexos multiproteicos, as ciclinas (CD) e as cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Essas proteínas são reguladas por vários fatores incluindo os inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDKIs) (Solomon and Kaldis 1998). A transição da fase G1 para a fase S é controlada pela ativação seqüencial de uma série de ciclinas e CDKs resultando na hiperfosforilação do Rb (retinoblastoma). Um importante mecanismo de controle do ciclo celular é ativado durante esta fase, em sua etapa final, para certificar que tudo está pronto para a síntese de DNA. A passagem de G1 para S é determinada, entre outros eventos, pela ação da ciclina D e das CDKs 4 e 2. Na fase G1 a ligação entre a ciclina D e CDK4 ou CDK2 irá fosforilar a proteína do Retinoblastoma (pRB). Este evento provocará a liberação do E2F, fator de transcrição de genes essenciais à síntese de DNA desencadeando a replicação do DNA e progressão para a fase S. (Weinberg 1995).

O *p21* é um CDKI, membro da família CIP/KIP, da qual também fazem parte o *p27* e o *p57*. O efeito imediato da indução da *p21* é a inibição da atividade da proteína do retinoblastoma (pRB). A pRB na fase G1 encontra-se hipofosforilada e ligada a fatores de transcrição da família E2F; quando a pRB é fosforilada por cinases dependente de ciclinas, tais fatores são liberados, resultando na transcrição de genes da fase S do ciclo celular. Esta via, a *p21* inibe o complexo de CDKs, resultando no acúmulo de pRB hipofosforilada, complexada a E2F parando o ciclo celular em G1.

Esta parada é de fundamental importância para permitir o reparo do DNA danificado antes que ocorra sua duplicação na fase S (Waga, Hannon et al. 1994; Sherr and Roberts 1999).

Existe uma ampla variação em relação à expressão do *p21* em vários tipos tumorais. Uma diminuição da expressão do *p21* pode ser encontrada, em presença de alterações na expressão do gene supressor de tumor, *p53*. Tem sido sugerido que é através do *p21* que o *p53* promove a parada do ciclo célula. Isso não exclui o fato de que outros fatores podem interferir na expressão do *p21* por uma via independente do *p53* (Macleod, Sherry et al. 1995).

Em células prostáticas, a expressão do *p21* pode ser desencadeada por androgênios (Lu, Liu et al. 1999; Ling, Chan et al. 2001), fatores de crescimento (Robson, Gnanapragasam et al. 1999) e ainda pode ser alvo direto da ação do *p53* (Macleod, Sherry et al. 1995).

1.5 P53

O gene *p53* é constituído de 11 *exons*, está localizado no braço curto do cromossomo 17 na posição p13.1 e codifica uma fosfoproteína nuclear formada por 375 aminoácidos (Milner 1997).

A primeira descrição do *p53* foi feita em 1979, por Lane e colaboradores como sendo uma fosfoproteína nuclear em células transformadas pelo vírus símio SV-40 formando um complexo com o antígeno T (LV 1979). A forma ativa da proteína (tipo

selvagem) possui uma meia vida muito curta (minutos) e tem a função de interromper o ciclo celular. A proteína p53 atua no ciclo celular nos pontos de controle G1 / S e G2 / M levando a uma parada nestes pontos e permitindo o reparo de danos no DNA. Portanto a inativação do *p53* resulta em instabilidade genômica (Stewart and Pietenpol 2001).

Mutações no gene que codificam proteínas anormais têm sido relacionadas com o desenvolvimento de tumores e, ao contrário da forma selvagem possuem uma meia vida muito maior (Crawford, Pim et al. 1981) . Mutações pontuais, deleções, inserção de nucleotídeos estão entre os exemplos de alterações neste gene. A simples troca de um nucleotídeo (mutação pontual) do gene *p53* é o tipo de alteração mais freqüente nas neoplasias (Hollstein, Sidransky et al. 1991) .

A forma mutada da proteína *p53* resulta na incapacidade de interromper o ciclo celular ou desencadear apoptose, além de também poder interagir com a proteína selvagem impedindo que ela cumpra seu papel normal, o que é denominado efeito dominante negativo, pois, a mutação de um dos alelos leva à supressão do alelo normal (Harris and Hollstein 1993; Milner 1997) . Mutações no *p53* são geralmente associadas como um evento tardio na progressão do câncer de próstata e são associadas com independência androgênica e metástase. No entanto altos níveis de *p53* mutado também foram encontrados em tecido prostático normal, PIN (neoplasia prostática intraepitelial) e HPB (Downing, Russell et al. 2003). Nesslinger e colaboradores demonstraram que células LNCaP transfectadas com alelos mutantes do *p53* foram capazes de crescer em privação androgênica enquanto a linhagem parental não (Nesslinger, Shi et al. 2003).

A via apoptótica influenciada pelo *p53* apresenta uma regulação da transcrição de genes-alvo, o que pode refletir diferentes mecanismos pelos quais o *p53* opera em vários tipos celulares. A apoptose dependente de *p53* é induzida via Apaf-1/caspase 9. Um amplo espectro de genes regulados pelo *p53* tem sido identificado. Eles contêm elementos responsivos para o *p53* tais como *bax*, CD95 (Fas/ Apo-1) e outros (Benchimol 2001). Dessa forma, a regulação para cima de *bax* pelo *p53* e talvez a regulação para baixo da expressão do *bcl-2*, favorece o processo apoptótico. Apakama e colaboradores mostraram que a detecção de ambos *p53* e *bcl-2* é preditiva para o crescimento de tumores independentes (Apakama, Robinson et al. 1996).

Zeng e colaboradores demonstraram por imunoistoquímica uma forte marcação da proteína *p53* em amostras de tumores prostáticos e nenhuma marcação em amostras de HPB (Zeng, Rowland et al. 2004). Um recente estudo mostrou que os níveis de RNAm do *p53*, analisados pela técnica de *northern blot*, diminuíram após 8 horas de tratamento com 1nM de DHT e diminuíram ainda mais com 10 μ M de DHT em LNCaP; indicou também que os níveis protéicos do *p53* se comportaram da mesma forma que o RNAm durante o tratamento. Este mesmo estudo demonstrou a existência de elementos responsivos ao androgênio no gene *p53* (Rokhlin, Taghiyev et al. 2005).

Hastak e colaboradores demonstraram a inter-relação entre *p53*, *p21*, *bcl-2* e *bax* em células derivadas de carcinoma prostático independente de androgênio (PC-3) transfectadas com o tipo selvagem do *p53*. Nesse estudo, as células foram tratadas com epigallocatechin-3-gallate (EGCG), um flavonóide encontrado em várias plantas, que tem sido usado como um componente quimiopreventivo contra tumorigênese,

tendo apresentado um aumento da expressão protéica do *p53* e do *p21* e uma maior taxa de apoptose. Da mesma forma, estas células apresentaram uma diminuição nos níveis protéicos do *bcl-2* e um aumento do *bax*. Ainda neste mesmo trabalho, com o uso de RNAs a expressão do *bax* e *p21* em células PC-3-*p53* foi reprimida causando inibição da apoptose. As células LNCaP também foram transfectadas com RNAs contra *p53*, *p21* e *bax* e apresentaram resistência à apoptose induzida pelo tratamento com EGCG (Hastak, Agarwal et al. 2005).

Embora *bcl-2*, *p21* e *p53* estejam associados ao crescimento prostático anormal sob influência androgênica, o envolvimento desses genes no efeito bifásico dos androgênios na proliferação de células epiteliais prostáticas não transformadas (HNTEP) ainda não está esclarecido. O presente estudo avalia a expressão desses genes em células HNTEP submetidas a diferentes concentrações de androgênio.

No presente trabalho sugere-se uma via que envolve a expressão do AR, *FHL-2*, *shp-1*, *bcl-2*, *p53* e *p21* no desenvolvimento da HPB modulado pelos androgênios. Altas concentrações de androgênio poderiam impedir a proliferação celular através da expressão de co-repressores do AR e da expressão do *p53* e *p21*, enquanto que baixas concentrações de androgênio induzem a um aumento na proliferação por uma via dependente da ativação do AR pelo co-ativador *FHL-2* e pela ativação do *bcl-2*. Pesquisas que busquem o conhecimento da função destes ativadores e repressores da atividade transcricional do AR podem contribuir para o entendimento do desenvolvimento das doenças prostáticas, como a hiperplasia prostática benigna. Além disso, esses ativadores e repressores do AR podem servir de marcadores para o

prognóstico e evolução do crescimento tumoral, além de serem alvos potenciais para futuras terapias gênicas.

2.OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos moleculares da ação androgênica sobre a expressão do receptor de androgênios e co-reguladores, do protooncogene *bcl-2*, genes supressores como o *p53* e o *p21* e sua relação com a proliferação das células prostáticas humanas não-transformadas em cultura primária.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a proliferação das células HNTEP tratadas com diferentes concentrações de androgênio.
2. Avaliar os níveis de RNAm e proteína do gene do AR nas células HNTEP tratadas com diferentes concentrações de DHT.
3. Avaliar os níveis de RNAm do gene *FHL-2* nas células HNTEP tratadas com diferentes concentrações de DHT.
4. Avaliar os níveis de RNAm do gene *shp-1* nas células HNTEP tratadas com diferentes concentrações de DHT.

5. Analisar os níveis de RNAm do gene *bcl-2* nas células HNTEP tratadas com diferentes concentrações de DHT.
6. Avaliar os níveis de RNAm do gene *p53* em células HNTEP submetidas a diferentes tratamentos com DHT.
7. Avaliar os níveis de RNAm e proteína do gene *p21* nas células HNTEP tratadas com diferentes concentrações de DHT.

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

Obteve-se o tecido prostático de 19 pacientes masculinos com idade entre 56 e 75 anos, submetidos à prostatectomia aberta por diagnóstico de hiperplasia benigna da próstata (HBP). Na sala de cirurgia coletou-se o tecido no período trans-operatório, sob condições estéreis, numa condição de pré-descarte. Parte da peça, aproximadamente 20% do total, foi coletada e o restante enviado para o exame anátomo-patológico. Fragmentos de $\pm 1,5 \text{ cm}^3$, foram 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 em gelo.

No laboratório, em capela de fluxo laminar, realizava-se uma dissecação cuidadosa no tecido para retirar coágulos e tecido fibroso. O material era reduzido a

fragmentos menores, lavado quatro vezes em solução de Hank, 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 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 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. 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 1500xg durante 10 minutos, e o precipitado ressuspenso em solução de Hank. As células epiteliais eram separadas das células estromais em filtro de nylon de 60 micra (Polylabo Strasbourg, France). 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 ressuspenso 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 que não fazem parte deste trabalho.

As células epiteliais em suspensão foram submetidas a um teste de viabilidade antes do plaqueamento, através da coloração com azul de Tripán e contagem no 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 análise de proliferação e/ou em placas de cultura de 35mm (Nunclon, Nalge Nunc Intern., Denmark) na 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 do meio de incubação. A primeira troca do meio de cultura das células epiteliais foi 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 foram 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*) (Mosmann 1983) adaptada para nosso modelo de cultura. As células foram plaqueadas em placas *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 efetuava a primeira troca do meio, as placas eram divididas em grupos: 1) T"0" (sem troca de meio), 2) controle suplementado com 5% de SBF desteroideado e 3) tratado com diferentes concentrações de androgênio (DHT. 10^{-8} , DHT. 10^{-10} , DHT. 10^{-13} M) ou 4) androgênios associados com o antiandrogênio hidroxiflutamida (OH-FLU . 10^{-6} M), sendo avaliadas no 3º e 6º dia de cultura.

Nos dias de avaliação foram retirados 50 μ L do meio de cultura e adicionados 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 a 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 aspirou-se todo o meio ficando o formazan retido no fundo da placa. Adicionou-se 100 μ l de DMSO (*dimethyl sulfoxide*) por poço,

transferiu-se este volume para placas de 96 poços e mediu-se a densidade óptica em uma leitora de ELISA no comprimento de onda de 540 nm.

3.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

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 DHT ($DHT.10^{-8}M$ e $DHT.10^{-13}M$) e hidroxiflutamida ($10^{-6}M$) durante diferentes tempos de incubação.

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, foram lavadas duas vezes com 1mL de PBS e lisadas diretamente nas placas com solução de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol®, Invitrogen) 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 (Chomczynski and Sacchi 1987). A solução contendo o lisado de células foi transferida para tubos de microcentrífuga e incubada por 5 minutos a 15-30°C. Foram adicionados 0,2mL de clorofórmio por mL de trizol e as amostras agitadas vigorosamente por 15 segundos. A

seguir, incubou-se por 2-3 minutos a 15-30°C e centrifugou-se a 12000xg 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 foi transferida para tubos novos, onde o RNA foi precipitado com a adição de álcool isopropílico (0,5mL/mL de trizol). As amostras foram armazenadas a -20°C por 24 horas. Após este período foram centrifugadas a 12000xg 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado era lavado com etanol 75%, adicionando 1mL de etanol/mL de trizol. As amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex e centrifugadas a 7500xg 5 minutos a 4°C. O sobrenadante era vertido e o precipitado seco em temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA foi dissolvido em água ultrapura tratada com DEPC (*diethylpyrocarbonate*) e incubado por 10 minutos a 60°C para posterior quantificação das amostras e estocagem.

3.3.2 Quantificação do RNA

O precipitado de RNA foi diluído em 15-20 μ L de água com DEPC. Para a quantificação, alíquotas de 1 μ L da solução de RNA das amostras foram diluídas em 499 μ L 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 absorbâncias a 260 e 280 nm era superior a 1,6. Considerando que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 μ g de RNA por mL de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

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

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.

$$D = 500/1 = 500$$

3.3.3 Síntese do DNAC

A síntese do DNAC (DNA complementar) foi feita a partir de 1 μ g de RNA total, utilizando oligonucleotídeos (*primers*) complementares à cauda poli-A característica do RNAm, produzindo um DNAC mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. Considerando que a fração do RNAm corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, estimou-se que 1 μ g de RNA total dariam origem a 20ng de DNAC . O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 minutos juntamente com o *primer* e os desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs). Em seguida, adicionou-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 foi incubado com 50U da enzima transcriptase reversa a 42°C por 50 minutos. Após nova desnaturação a 70°C por 15 minutos, a mistura foi incubada com 2U da enzima Rnase H de *E. coli* por 20 minutos a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de

síntese do DNAc totalizou um volume de 20uL que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

3.3.4 RT-PCR: quantificação em tempo real

A análise dos genes do receptor de androgênios, *FHL-2*, *shp1*, *p53* e *p21* foram realizadas pela técnica de RT-PCR em tempo real enquanto que a expressão do gene *bcl-2* e a curva de tempo do gene *p53* foram feitas por RT-PCR convencional. Na RT-PCR convencional as condições de reação para o gene *bcl-2* foram padronizadas (para detalhes da reação ver Pozzobon, 2002) através da realização de curvas de ciclos. As condições de reação para o gene *p53* também foram padronizadas para não se trabalhar com saturação de reação.

O RT-PCR permite a amplificação, por meio de enzimas, de seqüências definidas de RNA (Wang and Brown 1999) , podendo ser usado para comparar os níveis de RNAs, caracterizar seus padrões de expressão, discriminar entre RNAs bastante relacionados e para analisar a estrutura do RNA. O método de RT-PCR em tempo real trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência (Bustin 2000). Entre as variações da técnica disponíveis, optamos pela utilização do corante fluorescente *SYBR Green I* (Morrison, Weis et al. 1998).

No presente trabalho as reações de PCR em tempo real foram realizadas com o *MiniOpticonTM System for real time PCR detection* (Bio-rad laboratories, Califórnia,

USA). Adicionou-se à mistura para reação de PCR o corante *Sybr Green I* que se liga à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1000 vezes na fluorescência. Como o corante liga-se a qualquer fita dupla de DNA foram realizadas as chamadas curvas de desnaturação (*melting-Tm*), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso conseguiu-se a especificidade do produto amplificado, uma vez que a T_m é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado apresentarão picos de desnaturação mais baixos.

3.3.4.1 Curva de Padronização

Para cada gene no estudo foi realizada uma curva de padronização, através da qual foram calculados os valores das amostras. A curva de padronização foi obtida através de reações de RT-PCR feitas a partir de diluições seriadas de DNAC de tecido prostático (de 0,0002ng a 2ng). Cada diluição do DNAC foi feita em duplicata, junto com as amostras. As diluições foram escolhidas dentro de uma faixa que incluía o valor esperado para o RNAm nas amostras. O momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência é definido como o C_T , que é inversamente proporcional ao log da quantidade de DNAC (ng) (Higuchi, Fockler et al. 1993). Portanto, a curva de padronização é gerada jogando-se os valores de C_T , num intervalo de 95% de confiança, contra a intensidade da fluorescência do *Sybr green I*, correspondendo ao logaritmo das ng de DNAC.

3.3.4.2 Curva de normalização

Para se evitar variação entre as amostras, visto que elas foram obtidas de diferentes indivíduos, amplificou-se simultaneamente ao gene de interesse um gene normalizador. O gene normalizador ou constitutivo é um gene expresso em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do desenvolvimento não sofrendo alteração pelos tratamentos experimentais. Neste trabalho foi utilizado como gene constitutivo o da β_2 -microglobulina (β_2 -m) (Taplin, Bublely et al. 1995), amplificado da mesma forma que o gene de interesse (curva padrão entre 0,0002 e 2 ng de DNAC). Em cada reação feita para a amplificação do gene de interesse foi feita a amplificação do gene constitutivo minimizando as variações de pipetagem.

3.3.5 Protocolo geral da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O protocolo geral a ser utilizado nas reações de PCR foi estabelecido, tomando-se como base as seguintes observações:

- Não se trabalhou com saturação de reação. A abundância de produtos amplificados é maior quanto menor o número de ciclos;
- Foi feita a otimização da reação com cada par de oligonucleotídeos iniciadores, Foi utilizado uma concentração final de 200nM ajustando a concentração de Mg^{+2} , *Sybr Green I* e do próprio *template*;

- Os dNTPs foram utilizados numa concentração final de 200 μ M;
- A concentração final do *Sybr green* na reação foi de 0,5 vezes;
- Usou-se a Taq DNA polimerase numa concentração de 1,25 Unidades/reação
- As Condições da reação e temperatura de desnaturação foram padronizadas para cada gene. A leitura da fluorescência foi efetuada após a extensão e em cada reação era feito o gene de interesse e o gene normalizador concomitantemente. A T_m da β 2-microglobulina foi de 83 °C. A figura 5 ilustra a reação da β 2-microglobulina, e a tabela 1 mostra o protocolo empregado para cada gene do estudo. No anexo 1 temos a curva padrão e o *melting* de cada gene em estudo.

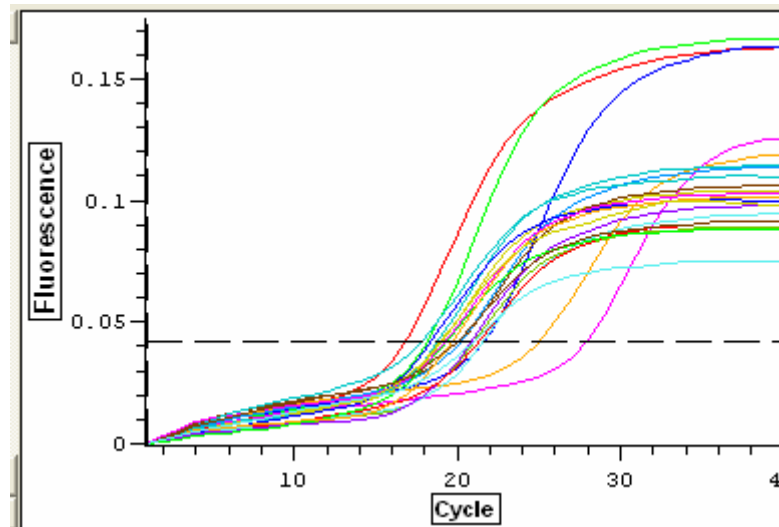
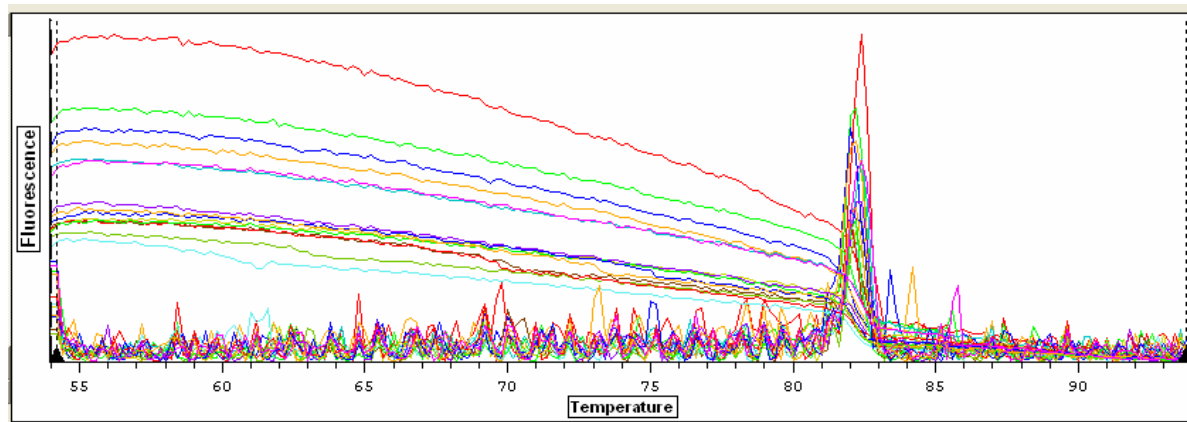
A**B**

FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DA RT-PCR EM TEMPO REAL

A: *status* da reação de amplificação da $\beta 2$ -microglobulina. Representa o aumento da fluorescência em relação ao ciclo limiar (C_T).

B: Curva de *Melting* para o gene da $\beta 2$ -microglobulina.

A curva foi construída com aumentos gradativos de $0,2^\circ$ C, entre 55 e 94° C. A fluorescência foi lida por 10s.

Tabela 1. Programas utilizados no PCR em tempo real.

Gene	Desnaturação inicial	Anelamento	extensão	Número de ciclos	T°de Melting valor aproximado
AR	94° C 30s	55° C 40s	72° C 40s	35	87°C
<i>p21</i>	94° C 50s	57° C 30s	72° C 40s	39	93°C
<i>p53</i>	94° C 40s	59° C 30s	72° C 40s	39	89° C
<i>FHL-2</i>	94° C 40s	59° C 40s	72° C 40s	39	87°C
<i>shp-1</i>	94° C 40s	58° C 40s	72° C 40s	39	91 °C

3.3.6 Oligonucleotídeos específicos

Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNAc específicos para cada RNAm 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 oligonucleotídeos eram posicionados preferencialmente nas áreas de transição íntron-éxon, 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 2 resume a localização e a seqüência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho, bem como o tamanho dos fragmentos de DNAc amplificados. Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen do Brasil Ltda.

Tabela 2 - Características dos oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de DNAc.

Gene	Sequência sintetizada	Fragmento	Referência
β_2m			
<i>sense</i>	5'CTATCCAGCGTACTCCAAAG 3'	168 pb	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
<i>antisense</i>	5'ACAAGTCTGAATGCTCCACT 3'		
β_2m			
<i>sense</i>	5' ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG 3'	623 pb	(Taplin, Bublely et al. 1995)
<i>antisense</i>	5' AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'		
AR			
<i>sense</i>	5' CATGGTGAGCAGAAGTGCCCTATC 3'	400 pb	(Taplin, Bublely et al. 1995)
<i>antisense</i>	5' TCCCAGAGTCATCCCTGCTTCAT 3'		
p21			
<i>sense</i>	5'CTCAG7AGGAGGCGCCATG 3'	517 pb	(Robson, Gnanapragasam et al. 1999)
<i>antisense</i>	5' GGGCGGATTAGGGCTTCC 3'		
p53			
<i>sense</i>	5' CTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCA 3'	371 pb	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
<i>antisense</i>	5' CTCATTGAGCTCTCGGAACATCTC 3'		
p53			
<i>sense</i>	5'AGGTGACCCAGGCTTGGAAG 3'	133pb	(Sundfors and Collan 1997)
<i>antisense</i>	5'TCCTGACTCAGAGGGGGCTC 3'		
FHL-2			
<i>sense</i>	5' AAACTCACTGGTGGACAAGC 3'	170 pb	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
<i>antisense</i>	5' AGATGAAGCAGGTCTCATGC 3'		
bcl-2			
<i>sense</i>	5' GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA 3'	304 pb	(Chen, Kayano et al. 2000)
<i>antisense</i>	5' AGGCACCCAGGGTGATGCAA 3'		

shp-1

189 pb

sense 5" CAGCTATGTGCACCTCATCG 3"

antisense 5"AGCCACCTCAAAGGTCACAG 3"

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

3.4 Extração de proteína

A extração de proteína foi feita a partir da extração do RNA total, utilizando o protocolo do fabricante do Trizol® (Invitrogen Ltda). A fase fenólica que restou da extração de RNA contém DNA e proteína. Primeiramente isolou-se o DNA precipitando a fase fenólica com etanol absoluto durante 3 minutos a 15-30°C e centrifugando a 2000xg por 5 minutos. Após este passo, transferiu-se a fase fenólica sem o DNA para tubos de microcentrifuga novos para seguir o isolamento da proteína. Precipitou-se com 1,5mL de álcool isopropílico durante 10 minutos a 15-30°C. A seguir, centrifugou-se por 10 minutos na temperatura de 4°C a 12000xg. Foi removido o sobrenadante e a proteína foi lavada três vezes (Hidroclorato de Guanidina 0,3m diluído em etanol). Estocou-se por 20 minutos e centrifugou-se a 7500xg (4°C) por 5 minutos. Após as lavagens incubou-se a proteína em etanol durante 20 minutos a 15-30°C e centrifugou-se por 5 minutos a 7500xg. Desprezou-se o sobrenadante para secar o *pellet*. Finalmente o *pellet* foi dissolvido em SDS1% e incubado durante 10 minutos a 50°C. Seguiu-se uma nova centrifugação por 10 minutos a 10000xg (4°C). Finalmente, as proteínas foram estocadas em eppendorfs a -20°C para posterior dosagem pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976) com a absorbância lida em 595 nm.

3.5 Western blot

A quantificação das proteínas sintetizadas a partir da transcrição dos genes AR e *p21* foi avaliada pela técnica de *western blot*, que consiste na transferência da proteína para uma membrana de nitrocelulose e posterior identificação da proteína de interesse mediante anticorpos específicos. O protocolo foi adaptado de *currents protocols mollecular biology*.

Para separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE (eletroforese de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) sendo que a concentração do gel foi adaptada conforme o peso molecular das proteínas de interesse. As amostras foram incubadas com solução de Laemmli (50% glicerol, 10% SDS; 62,5 mM Tris pH 6,8, mercaptoetanol (50 μ L para cada mL de Laemmli) e 0,5% azul de bromofenol) 95°C por 5 minutos e colocadas em cada poço do gel. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo 192 mM glicina, 25 mM Tris e 0,1% SDS, pH 8,3. A eletroforese foi realizada por aproximadamente 3 horas, submetidas a uma voltagem de 100v. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular.

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no sistema de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose, coberto com tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% metanol, pH 8,3). A transferência foi efetuada por 1 h e 30 min, com voltagem de 100 v.

As membranas de nitrocelulose (NC) foram incubadas durante 1 hora em solução bloqueadora, contendo TTBS (Tris 20mM, NaCl 140mM, 0,05% de Tween 20) e 3% de leite em pó desnatado, pH 7,4. Esta solução satura sítios de ligação inespecíficos da membrana de nitrocelulose.

Após o bloqueio, as membranas de NC eram incubadas por 18 horas, sob agitação constante a 4°C com os anticorpos monoclonais específicos anti-*p21/Cip1/Waf* e anti-AR (UPSTATE, NY). Foram posteriormente lavadas 3 vezes com TTBS durante 10 minutos e incubadas com um anti-anticorpo para o AR e o *p21* por 1 h. Após, as membranas foram lavadas com TBS (Tris 20mM, NaCl 140mM) 3 vezes durante 10 minutos. Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimioluminescência (ECL: ácido p-cumárico, luminol, tris 1,5M pH 8,8 e peróxido de hidrogênio) por 1 min. Após a incubação com solução para quimioluminescência, as membranas de NC foram colocadas em contato com o filme autorradiográfico por aproximadamente 15 segundos. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1 minuto; lavado com ácido acético e colocado por mais 1 minuto na solução fixadora. Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura. Após a revelação, as imagens das autorradiografias foram capturadas por um sistema de captura de imagem (Image Master, *Pharmacia Biot.*).

A verificação da quantidade total de proteínas foi feita pela coloração com *Red Ponceau S* (Sigma) na concentração de 0,2% diluído em ácido acético.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de proliferação apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, portanto foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Duncan. Os dados da expressão gênica por PCR em tempo real foram expressos considerando o valor controle como 1 e as amostras consideradas como a proporção gene de interesse/gene normalizador para cada experimento. Os resultados do gene *shp-1* foram transformados para escala logarítmica, para sua normalização. Os demais genes do estudo os dados entre os grupos apresentaram distribuição normal e foram analisados como análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan. Considerou-se o nível de significância como $p < 0,05$.

3.7 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 e Hospital Ernesto Dorneles.

O material biológico (RNA, proteína) é obtido em pequena quantidade, o que permite a realização de alguns experimentos, não sendo armazenado para estudos futuros.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

O tratamento com diidrotestosterona foi iniciado 48 horas após o plaqueamento, respeitando o período de adesão e estabilidade das células. Para averiguar se o mecanismo de ação androgênica sobre a proliferação destas células epiteliais ocorre via receptor de androgênio associou-se às concentrações de diidrotestosterona estudadas o antiandrogênio sintético hidroxiflutamida (OH-FLU), na concentração de 10^{-6} M. Este antiandrogênio liga-se ao receptor de androgênios impedindo a ligação do hormônio.

As células provenientes de no mínimo 5 pacientes foram divididas em 7 grupos sendo utilizados 5 ou 6 poços de placa *multiwell* por grupo de cada paciente, distribuídos da seguinte forma: grupo controle (células incubadas com meio 199 suplementado com 5% de SBF desteroideado), 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 3º dia de cultura o grupo tratado com DHT. 10^{-13} M mostrou um aumento significativo na proliferação em relação ao grupo C5% e ao grupo tratado com DHT. 10^{-10} M. Os grupos tratados com OH-FLU, DHT. 10^{-8} , DHT. 10^{-8} +FLU e DHT. 10^{-13} +FLU também foram diferentes do grupo C5% e do grupo tratado com DHT. 10^{-10} M.

No 6º dia de cultura, o grupo tratado com DHT 10^{-13} M mostrou um aumento significativo na proliferação em relação ao grupo C% e tratados com OH-FLU, DHT 10^{-8} e com DHT. 10^{-13} associada à OH-FLU 10^{-6} M (Figura 6).

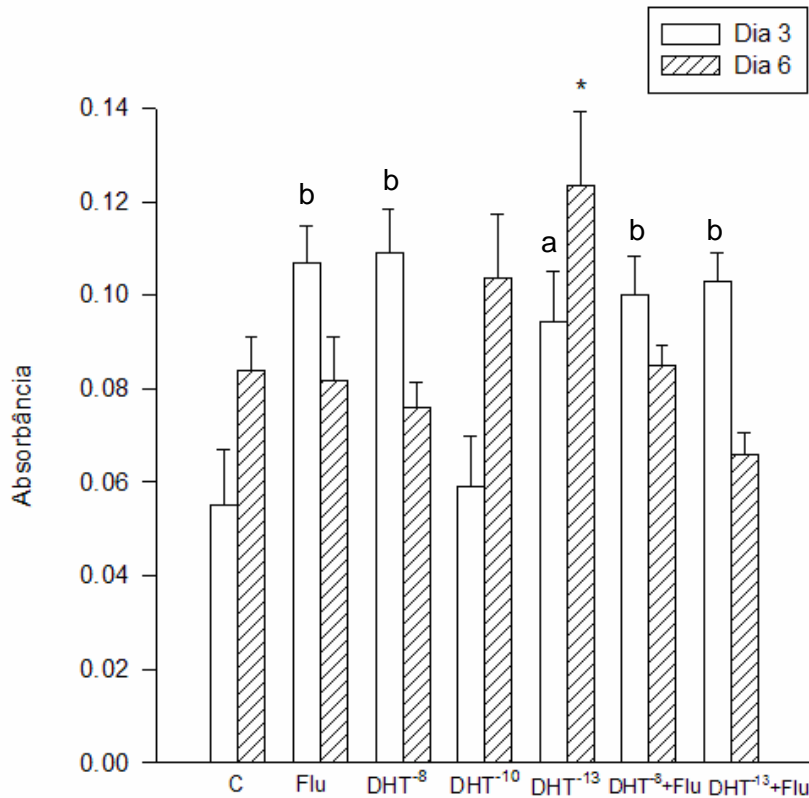


FIGURA 6: EFEITOS DA DIIDROTESTOSTERONA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HNTEP

As células foram incubadas em meio controle, meio com hidroxiflutamida e meio contendo diidrotestosterona (DHT) nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-13} M isoladas ou associadas com hidroxiflutamida ($OH-FLU \cdot 10^{-6}$). A proliferação foi avaliada no 3° e 6° dia de tratamento. Cada coluna representa a média \pm EP de no mínimo 5 pacientes. Os dados foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Duncan. a $p < 0,05$ no 3° dia em relação ao C5% e DHT^{-10} M, b $p < 0,05$ no 3° dia em relação ao C5% e DHT^{-10} M, * $p < 0,05$ no 6° dia em relação ao C5%, OH-FLU, DHT^{-8} e $DHT^{-13}+FLU$.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS

Os resultados obtidos com a técnica do RT-PCR em tempo real, para o gene do AR foram expressos como aumento de fluorescência dos diferentes grupos em relação ao grupo controle (C5%). O aumento de fluorescência é proporcional ao aumento da expressão do produto de interesse.

A cultura de células foi obtida de 5 indivíduos e os grupos analisados foram: controle com 5% de SBF-DT e tratados com OH-FLU. 10^{-6} M, DHT. 10^{-8} M, DHT. 10^{-13} M, DHT. 10^{-8} + OH-FLU e DHT. 10^{-13} + OH-FLU durante 4 horas de tratamento. Os dados foram obtidos considerando o controle como 1 e as amostras calculadas através da relação gene de interesse/gene normalizador e expressos como aumento de fluorescência (número de vezes). Não houve diferença significativa entre os grupos com o tratamento hormonal, mas observa-se uma tendência à redução da expressão do AR nos grupos que receberam o androgênio associado ao antiandrogênio (Figura 7).

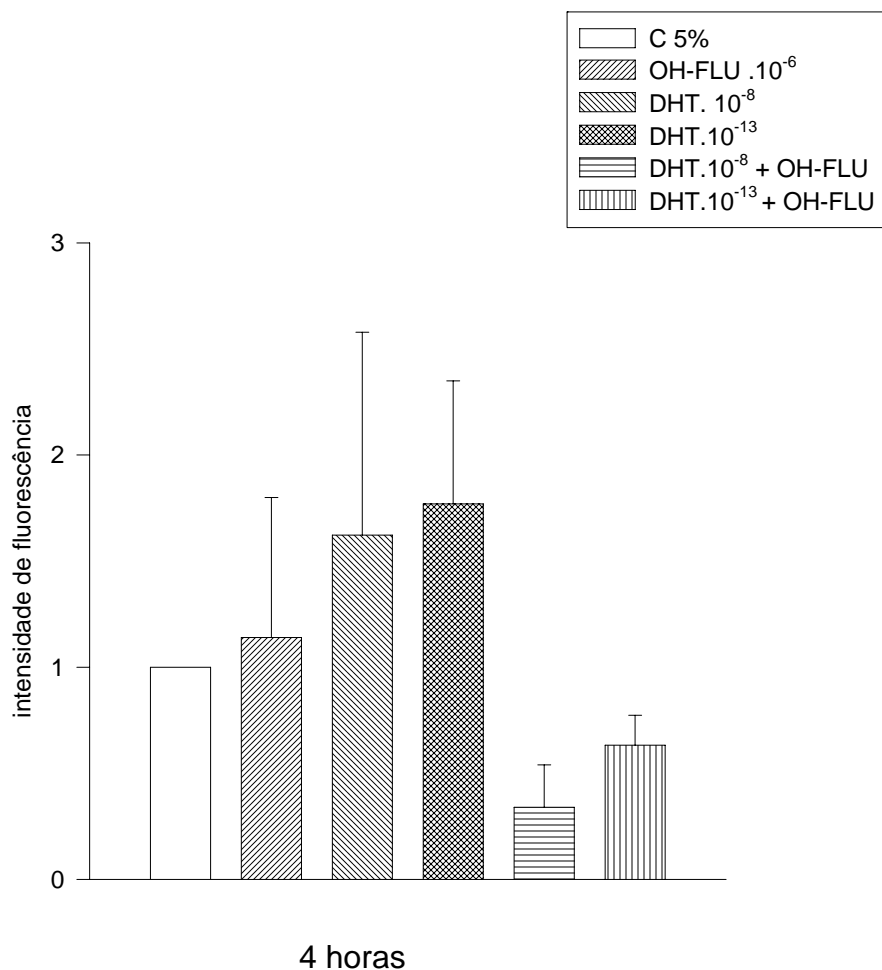


FIGURA 7. EXPRESSÃO DO AR EM CÉLULAS HNTep POR RT-PCR EM TEMPO REAL

O gráfico representa a intensidade da fluorescência dos níveis de RNAm do AR em relação à β_2 -microglobulina em células HNTep tratadas durante 4 horas com DHT.10⁻⁸, DHT.10⁻¹³ isoladas e associadas com o antiandrogênio OH-FLU. Os dados foram analisados por ANOVA seguida de teste de Duncan. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (p=0,359)

4.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS PROTÉICOS DO AR

As células HNTEP expressam a proteína do AR. A análise da proteína do AR foi realizada com 30ug de proteína em cada grupo. Os grupos foram tratados com meio controle ou DHT. 10^{-13} M durante 30 minutos, 1 e 4 horas. Os níveis protéicos do AR foram corrigidos pela quantidade de proteína na membrana corada com o corante Red Ponceau e os dados foram expressos pela relação AR/Ponceau (Figura 8A, 8B, 8C). Avaliou-se também a expressão da proteína do AR em células tratadas com diferentes concentrações de androgênio (DHT. 10^{-13} , DHT. 10^{-10} e DHT. 10^{-8} M) durante 4 horas (figura 9A e 9B). Em ambos os casos não houve mudança nos níveis protéicos do AR.

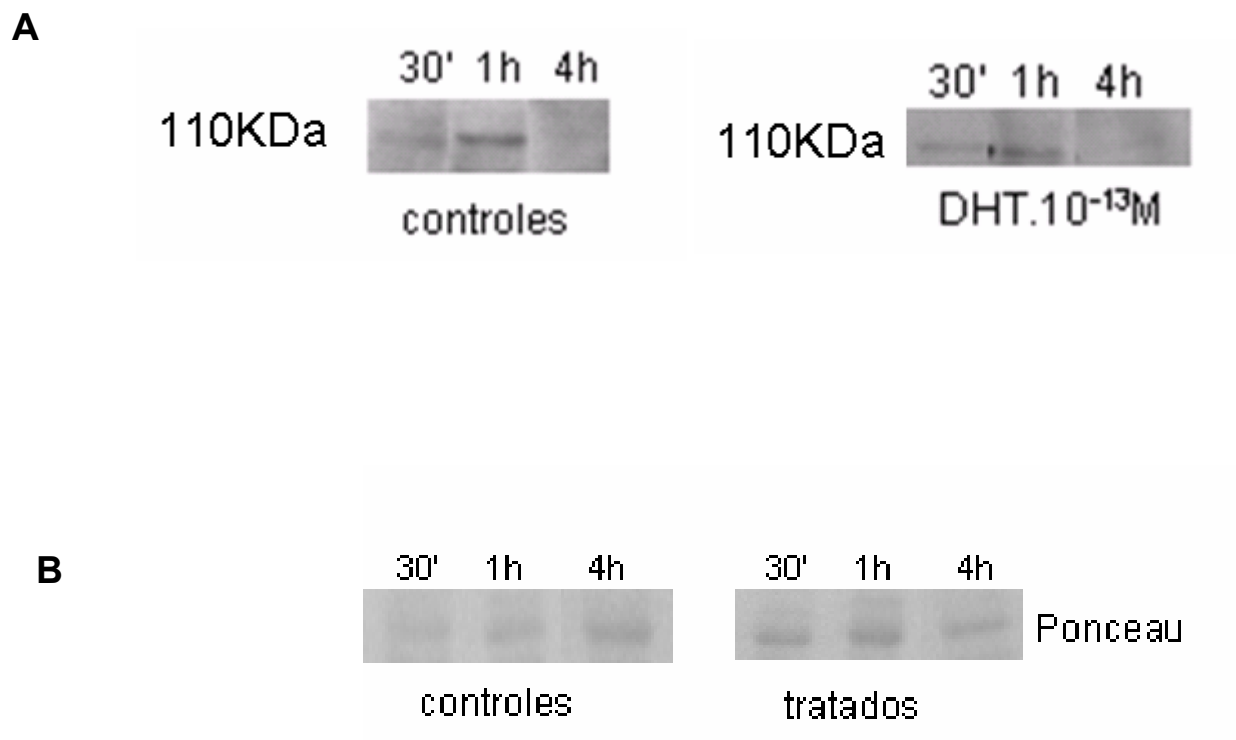


FIGURA 8A E 8B: ANÁLISE DA PROTEÍNA DO AR

As bandas representam a proteína de 110KDa do AR (A) em diferentes tempos de tratamento. (B) Normalização com *Red Ponceau*.

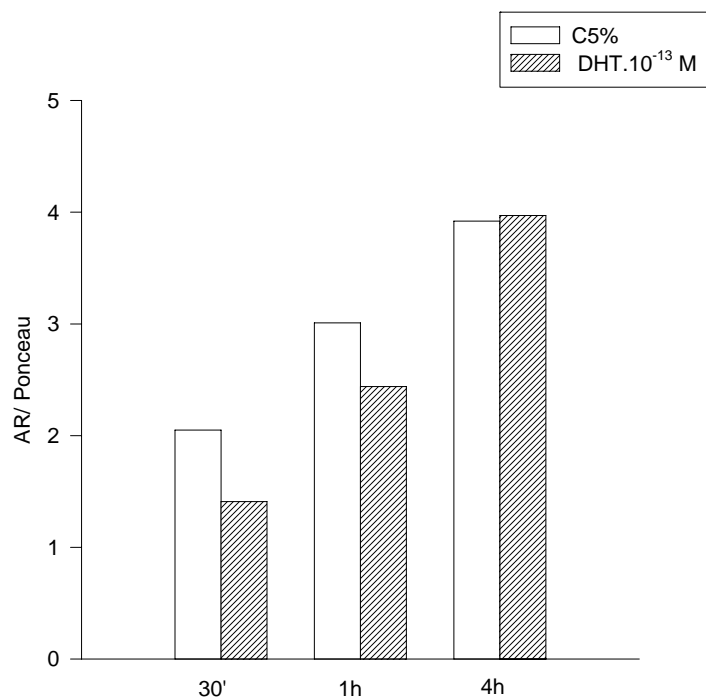
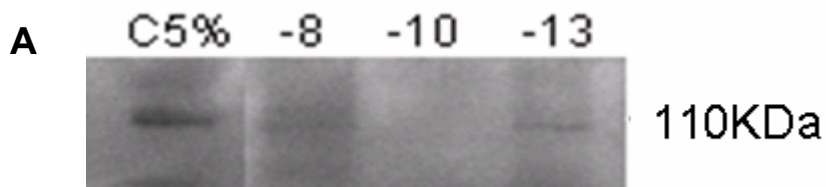


FIGURA 8C: NÍVEIS PROTÉICOS DO AR

Os dados foram obtidos através da análise densitométrica das bandas e expressos como a relação AR/ Ponceau. Não foram observadas diferenças entre os grupos analisados.



B

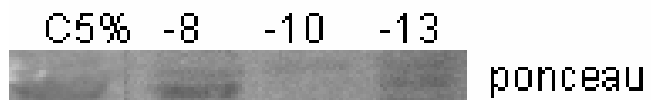


FIGURA 9A E 9B. ANÁLISE DA PROTEÍNA DO AR POR WESTERN BLOT

A: As bandas representam a proteína de 110KDa do AR com diferentes concentrações de DHT (-8, -10, -13 M) durante 4 horas de tratamento com DHT B: Normalização *Red Ponceau*. Não foram observadas diferenças entre os grupos analisados

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO CO-REGULADOR *FHL-2*

Os resultados obtidos com a técnica do RT-PCR em tempo real, para o gene do *FHL-2* foram expressos em ng de DNAc através da relação gene de interesse/ gene normalizador. Neste caso o controle não foi considerado como 1 e os grupos foram analisados pela média das ng de DNAc.

A cultura de células foi obtida de 5 indivíduos e os grupos analisados foram: controle com 5% de SBF-DT e tratados com OH-FLU. 10^{-6} M, DHT. 10^{-8} M, DHT. 10^{-13} M, DHT. 10^{-8} +OH-FLU e DHT. 10^{-13} + OH-FLU durante 4 horas de tratamento. Observou-se que o grupo que recebeu uma baixa dose de androgênio (DHT. 10^{-13} M) apresentou uma maior expressão do gene *FHL-2* em relação a todos os outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 10).

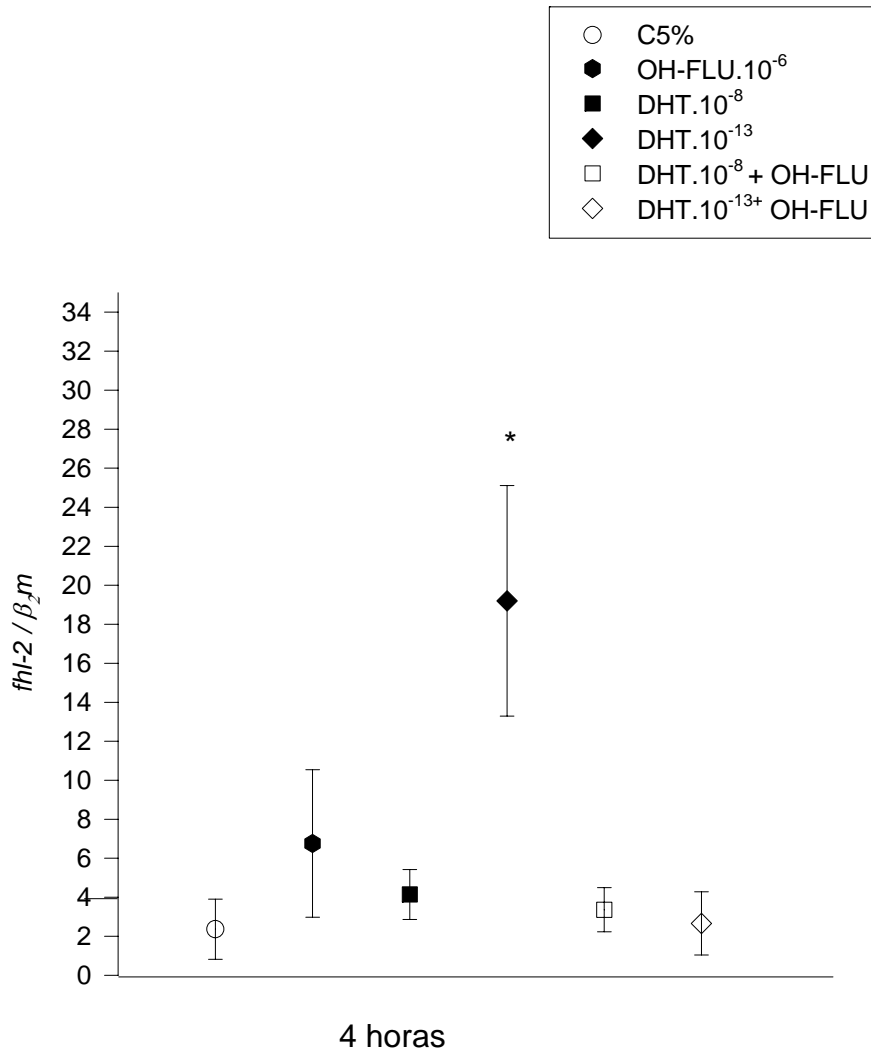


FIGURA 10: EXPRESSÃO DO GENE *FHL-2* EM CÉLULAS HNTEP POR RT-PCR EM TEMPO REAL.

O gráfico representa a quantidade em ng do produto da amplificação do *FHL-2* em relação à β_2 -microglobulina em células HNTEP tratadas com DHT.10⁻⁸, DHT.10⁻¹³ isoladas ou associadas com antiandrogênio OH-FLU. Os dados foram analisados por ANOVA seguida de teste de Duncan. * ($p < 0,05$) em relação a todos os outros grupos.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO CO-REGULADOR *SHP-1*

Os resultados obtidos com a técnica do RT-PCR em tempo real, para o gene do *shp-1* foram expressos em ng de DNAc através da relação gene de interesse/ gene normalizador. Neste caso o controle não foi considerado como 1 e os dados foram expressos como a média de ng de DNAc do *shp-1*.

A cultura de células foi obtida de 5 indivíduos e os grupos analisados foram: controle com 5% de SBF-DT e tratados com DHT. 10^{-8} M, DHT. 10^{-13} M, durante 4 horas de tratamento. Observou-se que o grupo que recebeu uma alta dose de androgênio (DHT. 10^{-8} M) apresentou uma maior expressão do gene *shp-1* em relação ao controle (Figura 11).

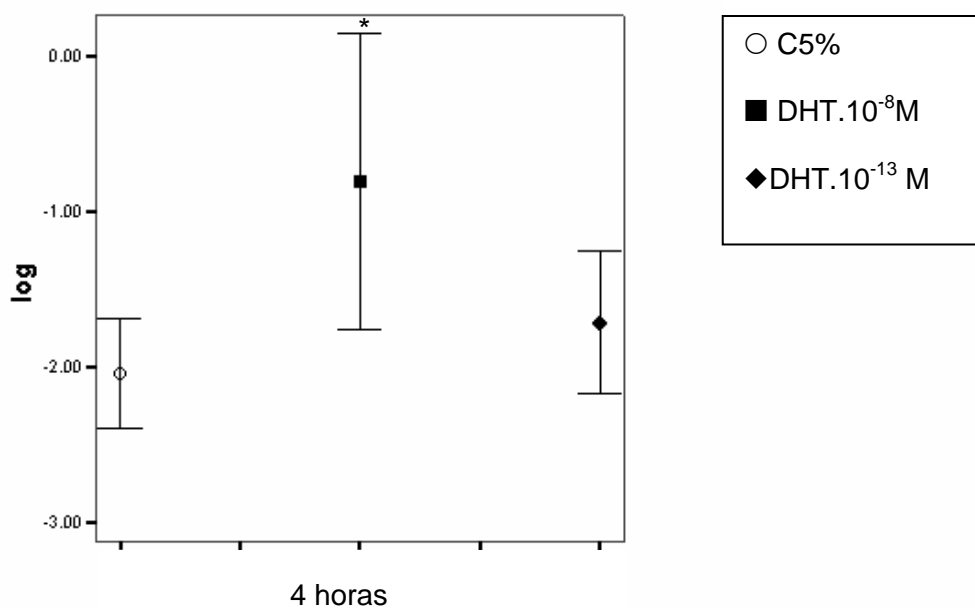


FIGURA 11: EXPRESSÃO DO SHP-1 EM CÉLULAS HNTEP POR RT-PCR EM TEMPO REAL

O gráfico representa a quantidade em ng do produto da amplificação do *shp-1* em relação à β_2 -microglobulina em células HNTEP. Grupo C5%, Grupo DHT.10⁻⁸ e grupo DHT.10⁻¹³. Os dados foram analisados por ANOVA seguida de teste de Duncan. * ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle C5%.

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO *BCL-2* POR RT-PCR CONVENCIONAL

A análise da expressão gênica do *bcl-2* foi realizada por RT-PCR convencional. A expressão do protooncogene *bcl-2* foi avaliada com diferentes doses de diidrotestosterona durante 15 minutos de tratamento, visto que este foi o tempo em que houve uma maior expressão deste gene em experimentos anteriores (dados não mostrados). As células que foram tratadas com DHT. 10^{-13} M apresentaram um aumento na expressão do *bcl-2* em relação ao grupo que não recebeu troca de meio (T "0") e DHT (10^{-8} M) ($p < 0,05$) (Figura 12A e 12B).

A

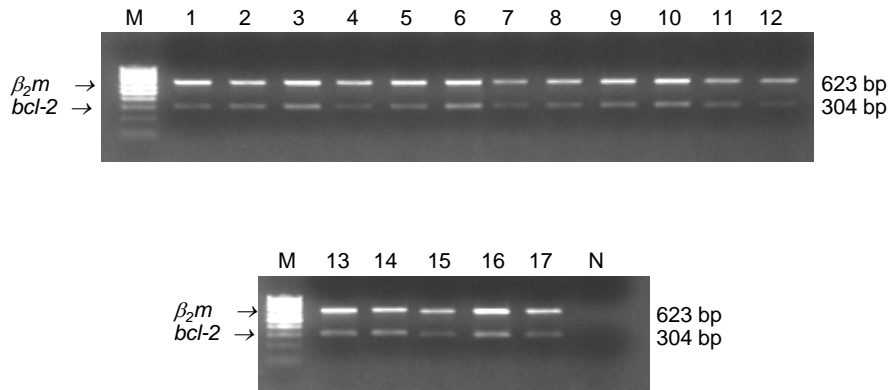


FIGURA 12A: EXPRESSÃO DO *BCL-2* EM CÉLULAS HNTEP

As células HNTEP foram tratadas com DHT durante 15 min. O fragmento de 304pb corresponde ao RNAm do *bcl-2* e o fragmento de 623 bp à β_2 -microglobulina (β_2m). Os produtos de RT-PCR foram visualizados em gel de agarose com brometo de etídio. Bandas 1-3, 0 min; 4-7 controle; 8-11, DHT 10^{-13} M; 12-14, DHT 10^{-10} M e 15-17, DHT 10^{-8} M. N = controle negativo, M= marcador de peso molecular (100pb).

B

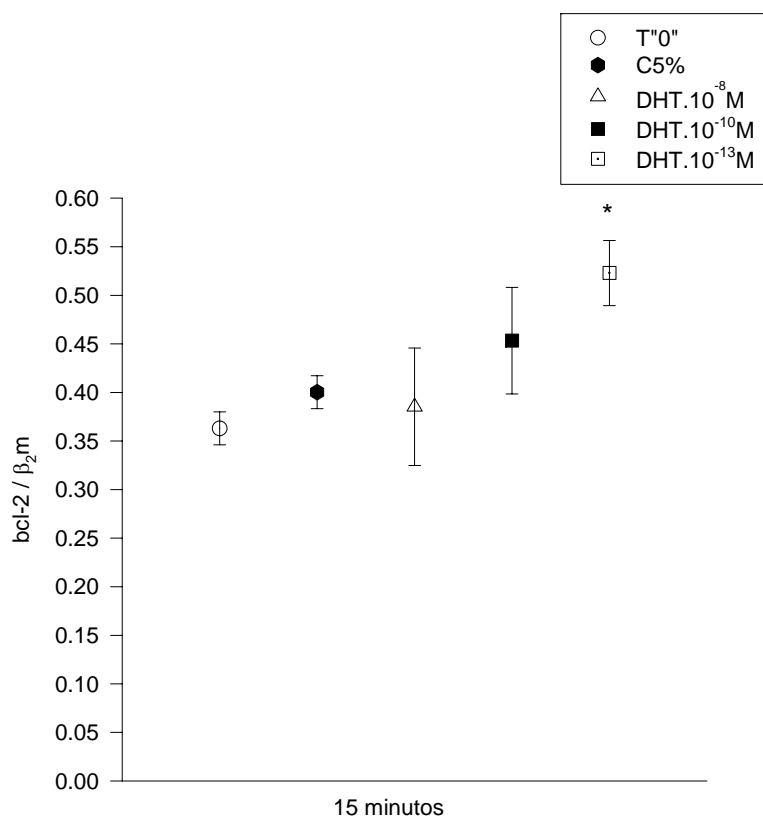


FIGURA 12 B. EXPRESSÃO DO *BCL-2* EM CÉLULAS HNTep

O gráfico representa a quantificação das bandas expressa como a relação $bcl-2/\beta_2m$ (média \pm EP). Os dados foram analisados como ANOVA seguida pelo teste de Duncan. * $p < 0,05$ em relação ao T'0" e DHT 10⁻⁸ M.

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO P53 POR PCR CONVENCIONAL EM DIFERENTES TEMPOS DE TRATAMENTO

A análise da expressão gênica do p53 em diferentes tempos foi realizada por RT-PCR convencional. As células HNTEP expressam o gene *p53* em cultura primária. Foi realizada uma curva de tempo para avaliar a expressão deste gene no grupo controle e tratado com DHT na dose de 10^{-3} durante diferentes tempos de tratamento. Os dados demonstram que a expressão deste gene é similar no período de tempo de zero às 6h de tratamento (Figura 13A e 13B)

A

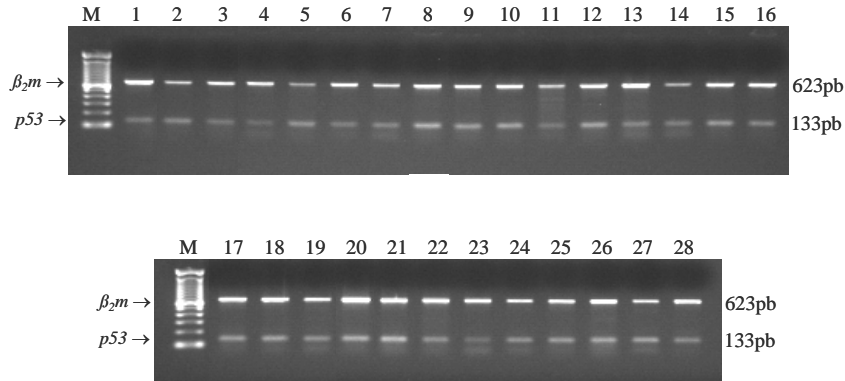


FIGURA 13A. EXPRESSÃO DO *P53* EM CÉLULAS HNTEP

O fragmento de 133pb corresponde ao gene *p53* e o fragmento de 623pb ao da β_2 -microglobulina. Os produtos de RT-PCR foram visualizados em um gel de agarose com brometo de etídio, correspondendo a: 1 a 4 T "0", 5 a 7 C2h, 8 a 11 C4h, 12 a 15 C6h, 16 a 19 DHT. 10^{-13} M 2h, 20 a 24 DHT. 10^{-13} M 4h e 25 a 28 DHT. 10^{-13} M 6h. M= marcador de peso molecular (100pb)

B

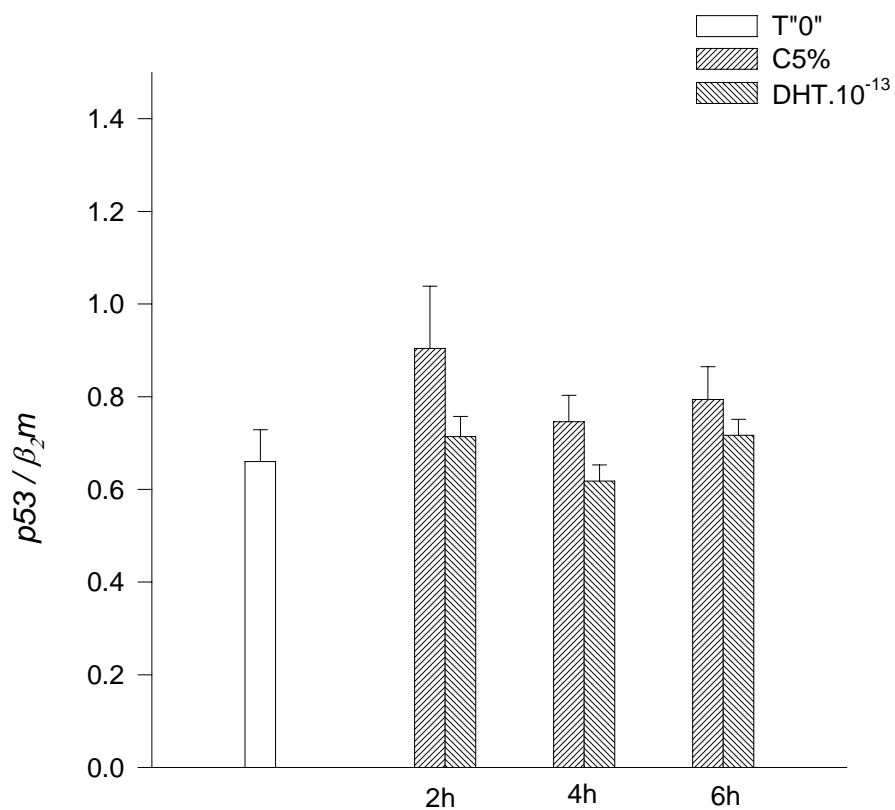


FIGURA 13B: EXPRESSÃO DO P53 EM CÉLULAS HNTep

O gráfico representa a análise densitométrica das bandas. Os dados foram expressos como a relação $p53/\beta_2m$. Não houve diferenças entre os grupos analisados.

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *P53*

Os resultados obtidos com a técnica do RT-PCR em tempo real, para o gene do *p53* foram expressos, como aumento de fluorescência dos diferentes grupos em relação ao grupo controle (C5%).

A cultura de células foi obtida de 5 indivíduos e os grupos analisados foram: controle com 5% de SBF-DT e tratados com OH-FLU. 10^{-6} M, DHT. 10^{-8} M, DHT. 10^{-13} M, DHT. 10^{-8} +OH-FLU e DHT. 10^{-13} +OH-FLU durante 4 horas de tratamento. Os dados foram obtidos considerando o controle como 1 e as amostras calculadas através da relação gene de interesse/gene normalizador e expressos como aumento de fluorescência (número de vezes).

Observou-se que o grupo tratado com uma alta dose de androgênio (DHT. 10^{-8} M) apresentou uma maior expressão do gene *p53* em relação aos grupos: controle, OH-FLU, DHT. 10^{-13} M e DHT. 10^{-8} + OH-FLU ($p < 0,05$) (Figura 14)

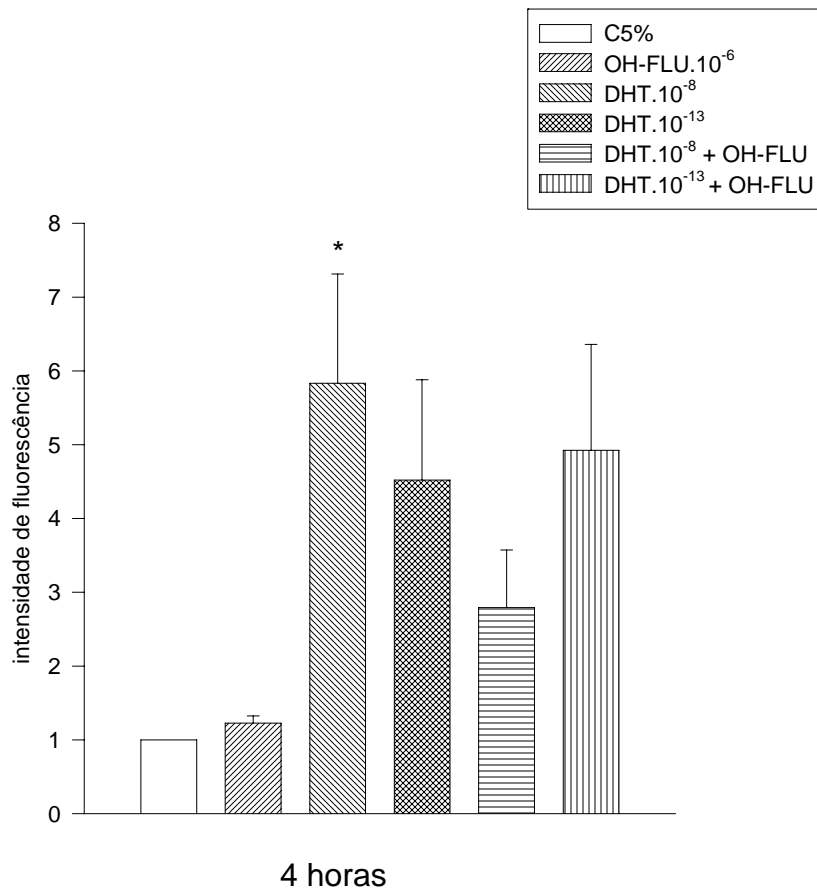


FIGURA 14: EXPRESSÃO DO *P53* EM CÉLULAS HNTep POR RT-PCR EM TEMPO REAL

O gráfico representa a intensidade da fluorescência dos níveis de RNAm do *p53* em relação à β_2 -microglobulina em células HNTep tratadas durante 4 horas com DHT.10⁻⁸, DHT.10⁻¹³ isoladas ou associadas com antiandrogênio OH-FLU. Os dados foram analisados por ANOVA seguida de teste de Duncan. * ($p < 0,05$) em relação ao grupo C5%, OH-FLU, DHT.10⁻¹³M e DHT.10⁻⁸ + OH-FLU.

4.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *P21*

Os resultados obtidos com a técnica de RT-PCR em tempo real para o gene *p21* foram expressos, como aumento de fluorescência dos diferentes grupos em relação ao grupo controle (C5%).

A cultura de células foi obtida de 5 indivíduos e os grupos analisados foram: controle com 5% de SBF-DT e tratados com OH-FLU. 10^{-6} M, DHT. 10^{-8} M, DHT. 10^{-13} M, DHT. 10^{-8} +OH-FLU e DHT. 10^{-13} +OH-FLU durante 4 horas de tratamento. Os dados foram obtidos considerando o controle como 1 e as amostras calculadas através da relação gene de interesse/ gene normalizador e expressos como aumento de fluorescência (número de vezes). Observou-se que o grupo que recebeu uma alta dose de androgênio (DHT. 10^{-8} M) apresentou uma maior expressão do gene *p21* em relação a todos os outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 15).

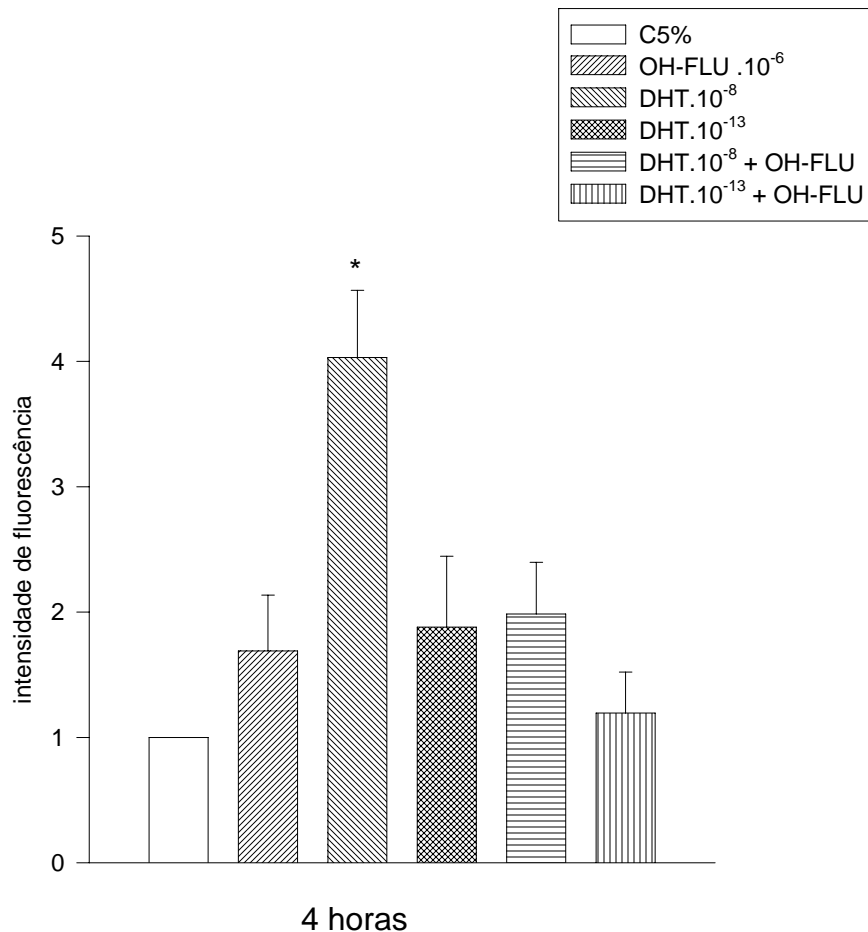


FIGURA 15: EXPRESSÃO DO *P21* EM CÉLULAS HNTep POR RT-PCR EM TEMPO REAL.

O gráfico representa a intensidade da fluorescência dos níveis de RNAm do *p21* em relação à β_2 .microglobulina em células HNTep tratadas durante 4 horas com DHT.10⁻⁸, DHT.10⁻¹³ isoladas ou associadas com antiandrogênio OH-FLU em relação ao grupo controle. Os dados foram analisados por ANOVA seguida de teste de Duncan. * ($p < 0,05$) em relação a todos os outros grupos.

4.10 ANÁLISE DOS NÍVEIS PROTÉICOS DO *P21*:

A análise de proteína do *p21* foi realizada com 7 μ g de proteína em cada grupo. Os grupos foram tratados com meio controle, OH-FLU, DHT. 10⁻⁸ e DHT. 10⁻⁸ + OH-FLU durante 4 horas (Figura 16A e 16B). Em relação aos tratamentos observamos uma maior marcação da proteína *p21* no grupo que recebeu a alta dose de androgênio (DHT.10⁻⁸M).

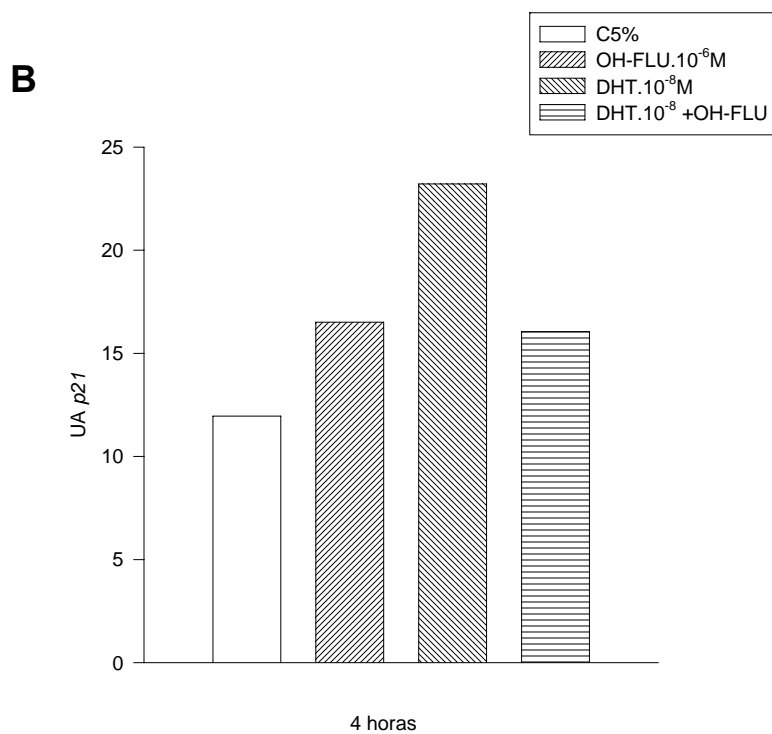
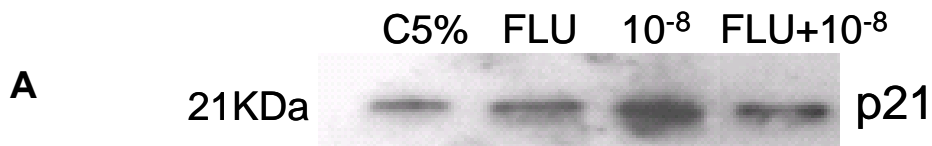


FIGURA 16. ANÁLISE DA PROTEÍNA DO P21 POR WESTERN BLOT.

A: As bandas representam a proteína de 21KDa do p21 com diferentes tratamentos durante 4 horas. **B:** O gráfico representa a análise densitométrica das bandas, expresso como unidades arbitrárias.

5. DISCUSSÃO

A resposta ao estímulo androgênico pode variar de acordo com o tipo de célula estudada. O modelo de cultura de células HNTEP empregado neste estudo foi caracterizado funcional e morfológicamente (Spritzer, Silva et al. 1995). Permite a análise de células epiteliais não-transformadas e elimina outros fatores que poderiam interferir na resposta ao tratamento androgênico, como por exemplo, várias passagens para obter linhagens celulares imortalizadas.

A proliferação mediada por androgênios tem sido estudada em culturas de células prostáticas normais, hiperplásicas e tumorais (Sonnenschein, Olea et al. 1989; Joly-Pharaboz, Soave et al. 1995; Berthon, Waller et al. 1997; Joly-Pharaboz, Ruffion et al. 2000; Silva, Morsch et al. 2001; Brum, Morsch et al. 2003). No presente trabalho, avaliou-se a proliferação de células epiteliais prostáticas humanas não-transformadas (HNTEP) derivadas de HPB e tratadas com androgênio, em cultura primária. Os dados obtidos demonstraram que a menor concentração de androgênio usada ($DHT.10^{-13}M$) provocou um aumento significativo na proliferação das células HNTEP a partir do terceiro dia de tratamento, sendo este efeito mais pronunciado no sexto dia de tratamento. A adição do antiandrogênio hidroxiflutamida inibiu a proliferação celular,

indicando que o efeito mitótico deve-se à ação do androgênio e não a outros fatores existentes no meio de cultura que poderiam mascarar este processo. Além disso, as células que receberam uma dose alta de androgênio ($DHT \cdot 10^{-8}M$) mantiveram um nível de proliferação semelhante ao controle no período avaliado. Estes dados estão de acordo com o efeito bifásico descrito para a ação dos androgênios na proliferação celular, em outros modelos de cultura, onde foi demonstrado que altas doses de androgênio inibiram a proliferação e baixas doses estimularam (Sonnenschein, Olea et al. 1989; Joly-Pharaboz, Soave et al. 1995; Lee, Sutkowski et al. 1995; Joly-Pharaboz, Ruffion et al. 2000). Embora a figura 6 demonstre haver diferença significativa entre os grupos tratados em relação ao controle no 3º dia de tratamento, os níveis de proliferação são similares entre os demais grupos tratados. Isto pode ser devido ao tempo precoce de avaliação da proliferação celular para verificar o efeito das diferentes doses de DHT empregadas.

Dados anteriores do nosso grupo, empregando o mesmo modelo de cultura de células, também já haviam demonstrado este efeito proliferativo. Nesses experimentos anteriores, foi observado que baixas concentrações de testosterona ($2 \cdot 10^{-10} M$ e $2 \cdot 10^{-11} M$) e de diidrotestosterona ($10^{-13}M$) estimularam a atividade mitogênica das células quando comparadas com as células que receberam altas concentrações destes hormônios (Silva, Morsch et al. 2001; Brum, Morsch et al. 2003). Utilizando a linhagem celular LNCaP, Joly-Paraboz e colaboradores demonstraram uma estimulação da proliferação celular até a dose máxima de 0,1nM por 7 dias de tratamento com R1881 ou DHT enquanto que a taxa de proliferação diminuiu conforme a dose era aumentada

até 100nM (Joly-Pharaboz, Soave et al. 1995). Blanchere e colaboradores demonstraram que o tratamento com DHT na concentração de $5.10^{-9}M$, em uma linhagem imortalizada de células epiteliais prostáticas (PTN2), provocou aumento na proliferação destas células (Blanchere, Berthaut et al. 1998).

Células epiteliais prostáticas derivadas de CaP, tratadas durante 48 horas com DHT nas concentrações de 0,01 a 10nM, também demonstraram um aumento na proliferação quando receberam 1 e 10nM (Planz, Wang et al. 2001).

A ação dos androgênios na próstata ocorre mediante a ligação com o seu receptor. O receptor de androgênio é um fator de transcrição cuja atividade depende da ligação com o hormônio cognato e interação de várias proteínas reguladoras, além de regular a expressão de genes-alvo da ação androgênica.

O AR é expresso nas células HNTEP. Anteriormente havíamos demonstrado com a técnica de RT-PCR convencional, que estas células tratadas com $DHT.10^{-13}M$, em diferentes tempos, apresentaram um aumento nos níveis de RNAm do AR a partir das 3 horas de tratamento, permanecendo até 6 horas de estímulo androgênico. (Pozzobon 2002).

Como a técnica de RT-PCR fornece dados semi-quantitativos buscou-se uma técnica mais sensível para avaliar a expressão do AR e dos demais genes em estudo. A técnica de PCR em tempo real nos permite avaliar quantitativamente os níveis de RNAm a partir da detecção contínua da amplificação do gene de interesse. Além disso, permite determinar os valores na fase exponencial da amplificação excluindo a possibilidade de se estar trabalhando com saturação da reação. No presente estudo,

observamos que durante 4 horas do tratamento com DHT nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-13} M e o tratamento com o antiandrogênio OH-FLU (10^{-6} M) isolado e associado à DHT não provocou alteração nos níveis de RNAm do AR. Este fato pode ser explicado devido à variação biológica do receptor nos diferentes indivíduos que forneceram material para as culturas, e também pela expressão do AR poder ser regulada por várias moléculas co-reguladoras tanto em nível transcricional como pós-transcricional.

A expressão do AR tem sido extensivamente relatada em estudos com amostras de próstatas hiperplásicas, tumorais e normais apresentando resultados contraditórios. Nakano e colaboradores demonstraram em cultura primária de células estromais obtidas de HPB que a expressão do AR por PCR em tempo real diminuiu cerca de 50% em presença de alta concentração de DHT (10^{-8} M) (Nakano, Fukabori et al. 1999). Em contrapartida, um outro autor usando a linhagem de células epiteliais PNT1A e a linhagem DU-145, transfectadas com um AR funcional, demonstrou um aumento significativo da atividade do AR quando as células foram tratadas com R1881 e DHT na concentração de 10^{-9} M, enquanto que a adição de antiandrogênios como a bicalutamida e hidroxiflutamida promoveu uma diminuição na atividade (Avances, Georget et al. 2001).

O RNAm do AR é mais detectável em tumores prostáticos sensíveis ao androgênio e na linhagem celular de CaP, LNCaP, enquanto que uma baixa expressão do AR ocorre em tumores prostáticos insensíveis ao androgênio e nas linhagens celulares de CaP, DU-145 e PC-3 (Trapman, Ris-Stalpers et al. 1990). Um estudo recente mostrou através de um modelo de progressão tumoral ortotópico, com

implantação de células LNCaP em camundongos submetidos à ablação hormonal, que as amostras de tumores insensíveis ao androgênio apresentaram uma significativa redução na expressão protéica do AR enquanto os níveis de RNAm do AR aumentaram. Isto indica que a privação androgênica pode ter efeitos diferentes na maquinaria transcricional do AR e reforça que o AR pode ser regulado em níveis traducionais e pós traducionais (Zhou, Yu et al. 2004). Por outro lado, também foi demonstrado em amostras de tecido prostático normal e tumoral que a expressão do AR, por RT-PCR, apresentou-se em quantidades iguais em ambos os tecidos. (Mestayer, Blanchere et al. 2003).

Neste estudo, além dos níveis de RNAm também avaliou-se os níveis protéicos do AR nas células HNTEP. A marcação de uma proteína de 110KDa correspondeu ao AR nestas células. De acordo com alguns estudos esta marcação de 110KDa é análoga à marcação da isoforma B do AR, cuja ativação é dependente do ligante (Gregory, He et al. 2001; Liegibel, Sommer et al. 2003). Os níveis protéicos do AR não foram modificados pelo tratamento com androgênio nas condições analisadas. É possível que o tempo de 4 horas de tratamento seja precoce para se detectar variação nos níveis protéicos. A análise com tempos maiores de tratamento, diferente daqueles utilizados para análise do RNAm não foi possível pela escassez de material, visto que o rendimento obtido com cultura primária é muito menor do que as quantidades de material obtidas em estudos que utilizam linhagens imortalizadas.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com resultados obtidos na linhagem celular LNCaP, na qual os níveis protéicos do AR permaneceram inalterados

durante 5 dias de tratamento com androgênio (0,05 nM de R1881) (Nesslinger, Shi et al. 2003). No entanto, os estudos a cerca da proteína do AR são muito controversos. Os níveis protéicos do AR foram analisados por Blanchere e colaboradores, em células epiteliais prostáticas imortalizadas (PNT2) tratadas com DHT 5.10^{-9} M por no mínimo duas e no máximo 48 horas. O aumento nos níveis da proteína do AR foi alcançado em 6 horas de tratamento (Blanchere, Berthaut et al. 1998).

A importância do AR nos processos de proliferação celular foi recentemente reforçada com a utilização da técnica do silenciamento por RNA de interferência. Os níveis protéicos do AR foram significativamente reduzidos em células LNCaP através desta técnica, assim como os níveis de RNAm e também a proliferação celular (Haag, Bektic et al. 2005).

Conforme já relatado, a expressão do AR sofre a influência de várias moléculas reguladoras que facilitam a interação entre os domínios de transativação e de ligação com o hormônio. No presente estudo, também foi analisada a expressão de co-reguladores da expressão do AR. O *FHL-2* é um co-ativador específico do AR, não agindo em outros receptores nucleares. Promove aumento da atividade transcricional do AR de maneira dependente do AF-2 e de agonistas androgênicos (Muller, Isele et al. 2000). Neste trabalho, demonstrou-se que as células HNTEP expressam o gene do *FHL-2* em cultura primária. Os níveis de RNAm do *FHL-2* foram maiores nas células que receberam o tratamento com uma baixa dose de androgênios ($DHT.10^{-13}$ M) em relação aos outros grupos.

Existem poucos dados na literatura sobre a expressão do *FHL-2* relacionada com o estímulo androgênico. Gobinet e colaboradores usaram células CVI, derivadas do rim de macacos co-transfectadas com AR e *FHL-2* e tratadas com 10^{-9} M de R1881, observando-se um aumento na atividade transcricional do AR (Gobinet, Auzou et al. 2001). No presente estudo, a observação do aumento da expressão do *FHL-2* com DHT. 10^{-13} M torna-se relevante, pois esta é a dose que provoca aumento na proliferação celular. Embora os níveis de RNAm do AR permaneçam inalterados, um aumento na expressão deste co-ativador indica um maior potencial transcricional do AR. A ativação do AR também depende de muitos outros co-reguladores que podem estar influenciando na avaliação de sua expressão.

A expressão de outros co-reguladores como ARA54, ARA55, ARA70 que são co-ativadores específicos do AR e o SRC-1 que é um co-ativador inespecífico já foram analisadas por RT-PCR em tecido prostático normal e tumoral. A expressão do ARA54, ARA70 e SRC-1 foi semelhante nesses tecidos, enquanto a expressão do ARA55 apresentou uma diminuição no tecido tumoral (Mestayer, Blanchere et al. 2003). Este mesmo autor avaliou a expressão desses co-ativadores nas linhagens LNCaP, DU145, PC-3 e PNT2 (linhagem imortalizada de células epiteliais derivadas de próstata normal) e nestas células a expressão do ARA54 só diminuiu em DU145. O ARA70 e o SRC-1 foram expressos em quantidades iguais e o ARA55 não foi expresso em LNCaP e DU-145. Quando as células PNT2 foram tratadas com DHT 5.10^{-9} M ocorreu uma diminuição nos níveis de RNAm de todos estes co-ativadores após 2 horas de tratamento (Mestayer, Blanchere et al. 2003). A inibição da atividade desses co-ativadores pode

ser atribuída à utilização de uma dose alta de androgênio, a qual estaria relacionada com uma inibição da proliferação mediada pelo AR e não com o estímulo à proliferação, como observamos usando baixas doses de androgênio via aumento da expressão do *FHL-2* nas células HNTEP.

No presente trabalho também se avaliou a expressão de um co-regulador negativo do AR, o *shp-1*. O *shp-1* foi descrito como um co-repressor do AR promovendo uma diminuição da sua atividade bem como interrupção da ação de outros co-reguladores positivos. O *shp-1* age como co-repressor por inibir ambos os domínios LDB e NT do AR (Gobinet, Auzou et al. 2001).

Observou-se um aumento na expressão do *shp-1* nas células que receberam uma alta dose de androgênio em relação ao grupo controle o que provavelmente pode indicar uma modulação negativa do AR com altas doses de DHT e uma conseqüente diminuição na proliferação mediada pelo hormônio. Estes resultados são comparáveis aos obtidos por Gobinet e colaboradores nas células CV1 e CHO. Estas células, quando transfectadas com *shp-1* apresentaram uma repressão da atividade do AR induzida pelo androgênio sintético R1881 na concentração de 10^{-9} M. Os mesmos autores demonstraram que nas células CV1 transfectadas com *shp-1* a ativação do AR induzida pelo *FHL-2* foi reprimida e, de maneira inversa, o tratamento com *FHL-2* foi capaz de reverter a inibição induzida pelo *shp-1*, ambos dependentes da dose (Gobinet, Auzou et al. 2001).

Além dos co-reguladores do receptor de androgênios, também avaliamos neste estudo a expressão do protooncogene *bcl-2* e dos genes *p21* e *p53* que são alvo da

ação androgênica. Uma das hipóteses do presente estudo para a indução da proliferação com baixas doses de androgênio é a expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2*. A presença do *bcl-2* tem sido relacionada a vários graus de neoplasias e tumores prostáticos humanos, estando envolvido na progressão para o estágio não-responsivo a androgênio (Kyprianou, Tu et al. 1996; Colombel, Vacherot et al. 1998; Tsuji, Murakami et al. 1998; Zhou, Yu et al. 2004) .

O *bcl-2* foi descrito como sendo um gene regulatório precoce. Avaliou-se sua expressão com diferentes concentrações de androgênio durante 15 minutos de tratamento. A escolha do tempo precoce baseou-se em dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, que avaliaram a expressão do *bcl-2* no intervalo de tempo de 0 até 6 horas de tratamento. Neste período o aumento significativo da expressão do *bcl-2* ocorreu durante 15 minutos de estímulo hormonal (Pozzobon 2002). No presente estudo, durante 15 minutos de tratamento hormonal, observou-se um aumento da expressão do *bcl-2* no grupo que recebeu a baixa dose de DHT (10^{-13} M) quando comparado ao grupo que recebeu a alta dose de DHT (10^{-8} M). Estes resultados podem ser comparados com os obtidos por Bruckheimer, que mostrou uma diminuição nos níveis protéicos e no RNAm do *bcl-2* em células LNCaP tratadas com DHT (10^{-9} M), com o efeito abolido através da adição do antiandrogênio bicalutamida. Além disso, o mesmo trabalho mostrou a presença de dois possíveis elementos responsivos ao androgênio na seqüência promotora do gene *bcl-2*, indicando que o *bcl-2* é alvo direto da ação androgênica nestas células (Bruckheimer, Spurgers et al. 2003).

Em células LNCaP foi mostrado um aumento na expressão do *bcl-2* quando estas células foram tratadas com testosterona ligada à albumina e concomitante aumento na expressão do receptor de androgênios de membrana (mAR). O aumento da expressão do *bcl-2* nessas células pode indicar que as células estão tentando sobreviver a esta via apoptótica induzida pelo mAR. A ativação do mAR pelo androgênio induziu uma diminuição na proliferação enquanto que o tratamento com testosterona livre induziu a proliferação em LNCaP (Hatzoglou, Kampa et al. 2005). O mecanismo através do qual o *bcl-2* exerce seus efeitos permanece desconhecido. Postulam-se várias ações, incluindo efeitos no transporte através da membrana, concentração intracelular de íons e vias envolvendo espécies reativas de oxigênio.

Buscando compreender os mecanismos envolvidos na supressão da proliferação celular com altas doses de androgênios, investigamos também a expressão de reguladores negativos da proliferação, ou seja, inibidores do ciclo celular.

O *p53* é um dos genes supressores da proliferação mais estudados. É capaz de interromper o ciclo celular em presença de dano no DNA e também pela indução de outros genes inibidores do ciclo (Benchimol 2001).

A forma normal do gene *p53* codifica uma proteína que é pouco expressa em células normais. Mutações no *p53* são geralmente associadas com tumores e distúrbios proliferativos do tecido prostático (Downing, Jackson et al. 2001). Neste estudo avaliou-se os níveis de RNAm do *p53* usando a seqüência que amplifica a forma normal e não a mutada, durante diferentes tempos de tratamento androgênico (de 0 até 6 horas). Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado com DHT e seu

respectivo controle durante o intervalo de tempo avaliado. A expressão similar do gene *p53* entre o grupo tratado e o controle pode ser devida à utilização da DHT na concentração de 10^{-13} M, que conforme demonstrado, foi a dose que causou proliferação nestas células. Como o *p53* é um gene inibidor do ciclo celular, não seria esperado um aumento na expressão deste gene com a dose proliferativa.

Buscando aprofundar o conhecimento da modulação androgênica na expressão do *p53*, analisou-se a sua expressão nas células HNTEP tratadas com diferentes concentrações de DHT e com o antiandrogênio hidroxiflutamida. Nesta análise através da técnica de RT-PCR em tempo real foi observado um aumento significativo dos níveis de RNAm do *p53* nas células que receberam uma alta dose de DHT (10^{-8} M), durante 4 horas de tratamento, se comparado com o grupo controle. A adição do antiandrogênio bloqueou este efeito indicando que os androgênios podem modular diretamente a expressão do *p53*. Este efeito está de acordo com o esperado, visto que as altas doses de androgênios estão relacionadas com a inibição da proliferação celular nestas células (Silva, Morsch et al. 2001; Brum, Morsch et al. 2003). Os dados do *p53* neste estudo podem ser comparados aos de Bruckheimer e colaboradores. Estes autores demonstraram que os níveis protéicos de *bax* e *p53* estavam aumentados com o tratamento com 1nM de DHT (Bruckheimer, Spurgers et al. 2003), concentração esta que é muito próxima da concentração de androgênio que causou o aumento da expressão do *p53* (10^{-8} M) no presente estudo.

Neste estudo não avaliamos os níveis protéicos do *p53*, pois as amostras foram esgotadas durante a padronização da técnica de western blot e avaliação protéica do

AR e do *p21*. Um trabalho realizado por Nantermet e colaboradores demonstrou que 24 horas de tratamento com DHT (10^{-10} a 10^{-7} M) provocou uma diminuição nos níveis protéicos do *p53* em LNCaP, que expressa a forma normal do *p53*, fato este abolido pelo tratamento com hidroxiflutamida (10^{-6} M) (Nantermet, Xu et al. 2004).

Existem poucos trabalhos que analisam a expressão do *p53* em cultura de células prostáticas normais e hiperplásicas submetidas a estímulo androgênico. A maioria dos estudos está relacionada com a expressão do *p53* em tumores prostáticos ou linhagem de células prostáticas tumorais. Células LNCaP quando submetidas à privação androgênica param de crescer. Em contrapartida quando estas células foram transfectadas com alelos mutantes do *p53* foram capazes de crescer em privação androgênica. Nesse mesmo estudo para averiguar como a forma mutante do *p53* interfere na independência androgênica, as células transfectadas com a forma mutante do *p53* foram submetidas a 5 dias de privação hormonal e posteriormente avaliados os níveis protéicos do AR. Foi observada uma redução na proteína do AR indicando que nas células LNCaP, com o *p53* mutante, o AR não é necessário para o crescimento independente de androgênio (Nessler, Shi et al. 2003).

O trabalho de Zhou e colaboradores também reforça este crescimento independente de androgênio, visto que demonstraram por imunistoquímica, usando anticorpo contra a forma mutada do *p53*, um aumento na imunoreatividade à proteína desse gene em amostras de diferentes estágios de tumores prostáticos independentes de androgênio em relação a tumores dependentes. Pela técnica de westernblot eles também mostraram uma redução dos níveis protéicos do AR e um aumento na

marcação do *bcl-2* nestes tumores. Esse trabalho mostra a íntima relação entre a expressão do *p53* e *bcl-2* na evolução de tumores prostáticos (Zhou, Yu et al. 2004).

O papel do *p53* tem sido investigado durante a senescência celular. Estudando células epiteliais prostáticas imortalizadas com o vírus do papiloma humano 16 E6 e E7 (HPECs), um grupo de pesquisa investigou o papel de vários genes relacionados com este processo, dentre eles vários tipos de ciclinas, *p53*, *p21*, *p27*, *p15* e outros. Nessa análise foi demonstrado que os genes do *p15*, *p21* e *p53* tinham sua expressão aumentada na pré-senescência, demonstrando a influência destes genes inibidores do crescimento celular neste período (Schwarze, Shi et al. 2001).

Como o *p53* pode agir influenciando a expressão de vários outros genes, este trabalho averiguou a expressão do gene *p21* que tem sido descrito como alvo direto da ação do *p53* (Li, Waga et al. 1994; Waga, Hannon et al. 1994; Macleod, Sherry et al. 1995). Algumas evidências obtidas mediante estudos com as linhagens LNCaP e HPr-1 sugerem que o *p21* participa do mecanismo de ação androgênica e sofre influência conforme a dose hormonal (Lu, Liu et al. 1999; Yeh, Hu et al. 2000; Ling, Chan et al. 2001; Wang, Ossowski et al. 2001).

Baseando-se em dados anteriores onde foi observado por RT-PCR que a expressão do *p21* em células HNTEP não foi alterada até 6 horas de tratamento com DHT. 10^{-13} M, e que, quando tratadas com DHT. 10^{-8} M por 4 horas estas células apresentaram um aumento nos níveis de RNAm do *p21* (Pozzobon 2002), avaliou-se a expressão do *p21* por RT-PCR em tempo real. Os dados obtidos no presente estudo mostram um aumento significativo da expressão do *p21* nas células HNTEP tratadas

com DHT. 10^{-8} M quando comparado com todos os outros grupos analisados. A associação com antiandrogênio aboliu este efeito. Estes resultados podem ser comparados aos resultados de Lu e colaboradores, os quais demonstraram que os níveis de RNAm do *p21* aumentaram 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 a androgênio, como a linhagem PC-3 (Lu, Liu et al. 1999). Reforçando esta hipótese, um outro grupo também demonstrou que o estímulo androgênico em altas concentrações induz a expressão do *p21* em células PC-3 transfectadas com um AR funcional, e que a adição de hidroxiflutamida aboliu este efeito (Yeh, Hu et al. 2000).

Embora o papel do *p21* ainda seja pouco esclarecido no desenvolvimento das doenças prostáticas, a existência de um elemento responsivo a androgênio na região promotora do gene *p21* sugere que este gene possa ser modulado pelo AR (Lu, Jenster et al. 2000).

No presente trabalho também se avaliou os níveis protéicos do *p21*. As células HNTEP apresentaram uma forte marcação para proteína *p21* no grupo que recebeu a alta dose de androgênio (DHT. 10^{-8} M), o que fortalece a idéia de que nestas células a inibição da proliferação com esta dose pode ocorrer também via *p21*. Estes dados concordam com estudos de Ling e colaboradores que demonstraram, em células prostáticas transfectadas com AR, um aumento dos níveis protéicos do *p21* com o tratamento de 5nM do androgênio sintético mibolerone (Ling, Chan et al. 2001). Por outro lado, são opostos aos dados observados por um outro grupo, que demonstrou

uma diminuição nos níveis protéicos do *p21* em células LNCaP tratadas com 10^{-8} M de R1881 (Wang, Ossowski et al. 2001). Essas diferenças de resultados demonstram a complexidade da proliferação mediada por hormônios, visto que as diferenças metodológicas já são suficientes para acarretar variação nos resultados.

A modulação dos androgênios sobre a expressão do *p21*, *bcl-2*, *p53* e AR tem sido relatada por vários autores (Ling, Chan et al. 2001; Bruckheimer, Spurgers et al. 2003; Nesslinger, Shi et al. 2003; Zhou, Yu et al. 2004). Ling e colaboradores demonstraram que enquanto a expressão do *bcl-2* em uma linhagem de células epiteliais prostáticas responsivas ao androgênio diminuía com o tratamento com altas doses de androgênio (5nM) a expressão do *p21* estava aumentada (Ling, Chan et al. 2001). Já Bruckheimer mostrou que enquanto a expressão do *bcl-2* estava diminuída com alta dose (1nM) a expressão do *p53* estava aumentada (Bruckheimer, Spurgers et al. 2003). Nesslinger mostrou uma regulação para cima da expressão do *bcl-2* em células prostáticas transfectadas com a forma mutante do *p53* (Nesslinger, Shi et al. 2003). Também foi relatado um aumento da proporção do *bcl-2/bax* em tumores prostáticos com crescimento independente de androgênio e que apresentava a forma mutada da proteína *p53*. Estes fatos podem ser explicados pela perda da forma normal do *p53* que conduz à perda da expressão do *bax* e conseqüente predomínio do *bcl-2* (Ling, Chan et al. 2001; Bruckheimer, Spurgers et al. 2003; Nesslinger, Shi et al. 2003; Zhou, Yu et al. 2004).

Os experimentos usados no presente estudo para avaliar a expressão gênica do AR, *FHL-2*, *shp-1*, *bcl2*, *p53* e *p21* foram os mesmos. Trabalhar com o mesmo grupo de

indivíduos do qual se obteve o material para a cultura de células, submetidas ao mesmo tratamento androgênico e posterior avaliação da expressão gênica, nos dá maior segurança para a análise dos mecanismos de ação androgênica neste modelo experimental.

Na presente tese é proposto um mecanismo de regulação da proliferação celular mediada pelo androgênio que pode ser crucial para o desenvolvimento de distúrbios do epitélio prostático. Os resultados indicam que nestas células, o aumento da expressão do *p21* com a alta dose de androgênio pode ter sido causado por um efeito direto da ação androgênica, assim como pela ativação do *p53*, o qual também pode ser modulado diretamente pelo androgênio. O efeito final do aumento da expressão destes dois genes nas células HNTEP foi ausência da proliferação induzida pela alta concentração hormonal empregada. Além disso, a ativação do *p53* pode causar uma inibição da expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* que teve sua expressão diminuída com a alta dose. Por outro lado, as baixas concentrações de androgênio causaram efeito oposto nesta regulação devido a uma maior atividade transcricional do AR, influenciado por um aumento na expressão do *FHL-2* e ativação da transcrição de protooncogenes proliferativos como o *bcl-2*. Este processo é reforçado por dados anteriores do nosso grupo que demonstraram um aumento na expressão dos protooncogenes *c-myc*, *c-fos* e *c-jun* nas células HNTEP tratadas com baixa dose de androgênio (Silva, Morsch et al. 2001; Brum, Morsch et al. 2003). As figuras 17 e 18 ilustram o mecanismo proposto no presente trabalho para a modulação androgênica na proliferação das células HNTEP.

Existem poucos trabalhos que empregam o uso de cultura primária de células epiteliais prostáticas. Este modelo permite o desenvolvimento de estudo mais próximo do processo que ocorre com a glândula prostática durante a senescência. Aliado a este fato, o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e precisas para análise da expressão gênica tem permitido uma maior reprodutibilidade dos dados obtidos e com isso é possível aprofundar o conhecimento dos fatores que levam ao desenvolvimento de doenças prostáticas como a HPB e o CaP. O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação hormonal da próstata, pode propiciar no futuro, o desenvolvimento de terapias menos invasivas, especialmente para o tratamento da HPB, assim como melhorar a qualidade de vida desses pacientes durante a senescência.

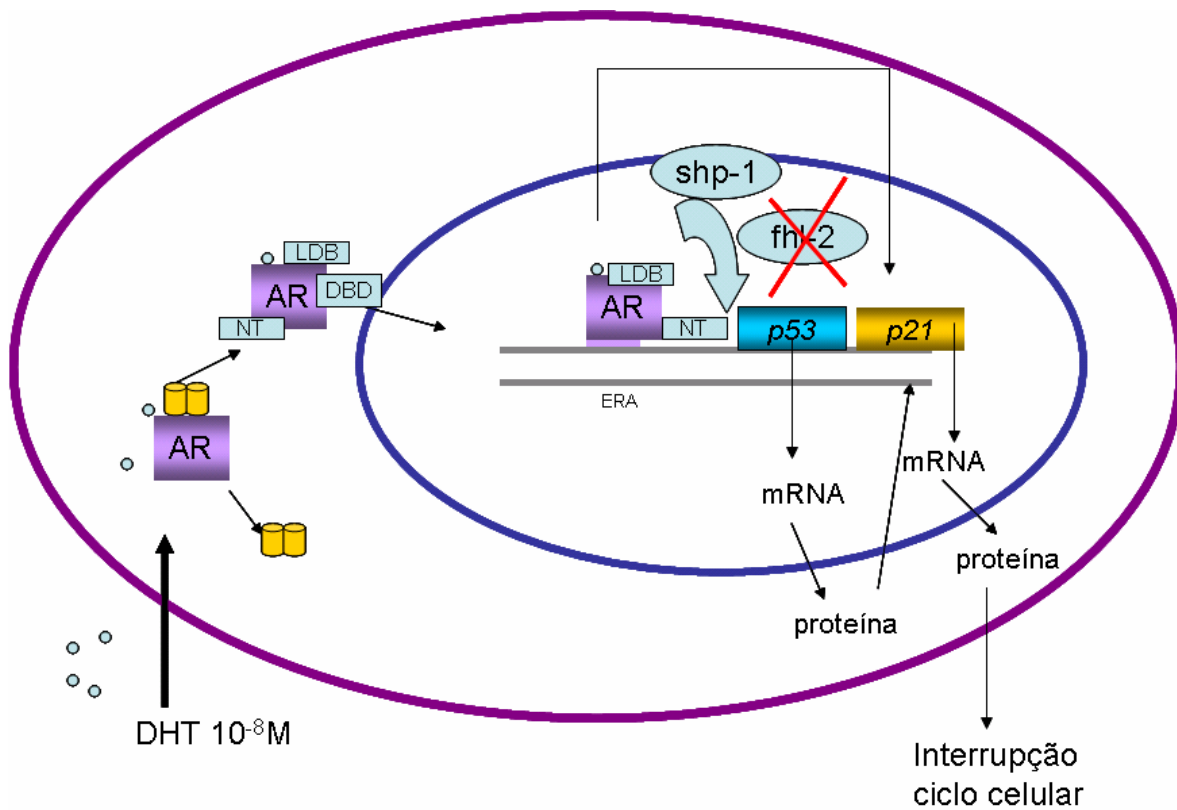


FIGURA 17: HIPÓTESE PROPOSTA PARA O MECANISMO DE AÇÃO DE ALTAS DOSES DE ANDROGÊNIOS NAS CÉLULAS HNTep

AR: receptor de androgênios, NT: domínio de transativação, LDB: domínio de ligação com o hormônio, DBD: domínio de ligação com o DNA, ERA: elemento responsivo ao esteróide, RNAm: RNA mensageiro

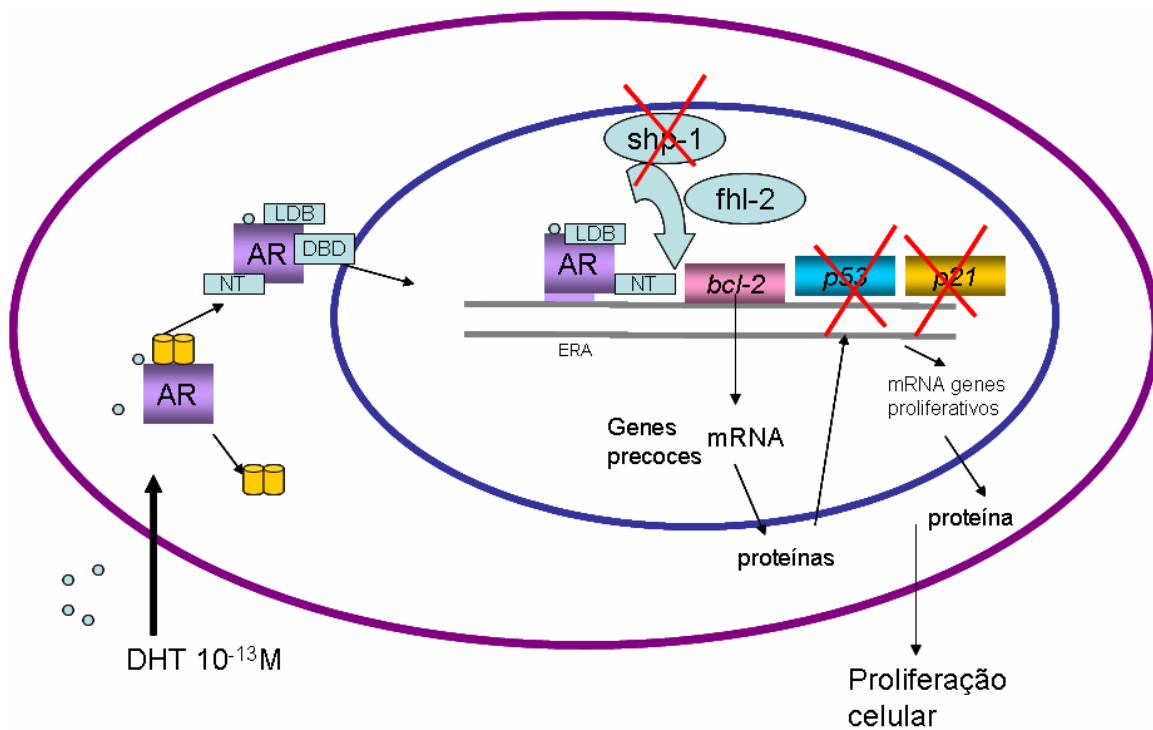


FIGURA 18: HIPÓTESE PROPOSTA PARA O MECANISMO DE AÇÃO DE BAIXAS DOSES DE ANDROGÊNIOS NAS CÉLULAS HNTep

AR: receptor de androgênios, NT: domínio de transativação, LDB: domínio de ligação com o hormônio, DBD: domínio de ligação com o DNA, ERA: elemento responsivo ao esteróide, RNAm: RNA mensageiro

6.CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que nas células HNTEP a ausência da proliferação causada pelo tratamento com altas concentrações de DHT pode estar relacionada com o aumento nos níveis de RNAm do *p21*, *p53* e do co-repressor do AR, *shp-1*. Enquanto que a proliferação celular observada no tratamento com baixas concentrações de androgênio pode ser mediada pelo aumento da expressão do co-ativador do AR, *FHL-2* e a ativação da transcrição de protooncogenes proliferativos como o *bcl-2*.

- No 6º dia de tratamento as células HNTEP tratadas com uma baixa dose de androgênio ($\text{DHT} \cdot 10^{-13}\text{M}$) proliferaram mais que as células não tratadas e as que receberam uma alta dose de androgênio ($\text{DHT} \cdot 10^{-8}\text{M}$). Este efeito foi abolido pela adição do antiandrogênio hidroxiflutamida, indicando que este efeito ocorre via AR.

- O tratamento com diferentes concentrações de androgênio não provocou alteração significativa nos níveis de RNAm e de proteína do AR nas células HNTEP.
- As células HNTEP expressam o gene do *FHL-2*, um co-ativador do AR. O tratamento com DHT. 10^{-13} M induziu a um aumento significativo nos níveis de RNAm do *FHL-2* nestas células.
- As células HNTEP expressam o gene *shp-1*, um co-repressor do AR. O tratamento com DHT. 10^{-8} M causou um aumento significativo nos níveis de RNAm do *shp-1* nestas células.
- Nas células HNTEP tratadas com DHT. 10^{-13} M ocorreu um aumento significativo nos níveis de RNAm do protooncogene *bcl-2*
- As células HNTEP expressam o gene *p53*. A expressão do p53 permaneceu inalterada no intervalo de tempo 0 até 6 horas de tratamento com DHT. 10^{-13} M. Entretanto o tratamento das células HNTEP durante 4 horas com DHT. 10^{-8} M provocou um aumento significativo nos níveis de RNAm do *p53*.
- O tratamento das células HNTEP com DHT. 10^{-8} M provocou um aumento significativo nos níveis de RNAm do *p21*, além de uma maior imunoreatividade da proteína do *p21*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apakama, I., M. C. Robinson, et al. (1996). "bcl-2 overexpression combined with p53 protein accumulation correlates with hormone-refractory prostate cancer." Br J Cancer **74**(8): 1258-62.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." Physiol Rev **81**(3): 1269-304.
- Avances, C., V. Georget, et al. (2001). "Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens." Mol Cell Endocrinol **184**(1-2): 13-24.
- Baretton, G. B., U. Klenk, et al. (1999). "Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression." Br J Cancer **80**(3-4): 546-55.
- Benchimol, S. (2001). "p53-dependent pathways of apoptosis." Cell Death Differ **8**(11): 1049-51.

- Berry, S. J., D. S. Coffey, et al. (1984). "The development of human benign prostatic hyperplasia with age." J Urol **132**(3): 474-9.
- Berthon, P., A. S. Waller, et al. (1997). "Androgens are not a direct requirement for the proliferation of human prostatic epithelium in vitro." Int J Cancer **73**(6): 910-6.
- Blanchere, M., I. Berthaut, et al. (1998). "Hormonal regulation of the androgen receptor expression in human prostatic cells in culture." J Steroid Biochem Mol Biol **66**(5-6): 319-26.
- Bonkhoff, H., T. Fixemer, et al. (1998). "Relation between Bcl-2, cell proliferation, and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer." Prostate **34**(4): 251-8.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brinkmann, A. O. (2001). "Lessons to be learned from the androgen receptor." Eur J Dermatol **11**(4): 301-3.
- Bruckheimer, E. M., K. Spurgers, et al. (2003). "Regulation of Bcl-2 expression by dihydrotestosterone in hormone sensitive LNCaP-FGC prostate cancer cells." J Urol **169**(4): 1553-7.
- Brum, I. S., D. M. Morsch, et al. (2003). "Androgen-dependent expression of c-jun and c-fos in human non-transformed epithelial prostatic cells: association with cell proliferation." Horm Res **60**(5): 209-14.

- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-93.
- Buttayan, R., A. Shabsigh, et al. (1999). "Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids." Trends Endocrinol Metab **10**(2): 47-54.
- Chen, Y., T. Kayano, et al. (2000). "Dysregulated expression of bcl-2 and bax in oral carcinomas: evidence of post-transcriptional control." J Oral Pathol Med **29**(2): 63-9.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Colombel, M., F. Vacherot, et al. (1998). "Zonal variation of apoptosis and proliferation in the normal prostate and in benign prostatic hyperplasia." Br J Urol **82**(3): 380-5.
- Crawford, L. V., D. C. Pim, et al. (1981). "Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 41-5.
- Culig, Z., J. Hoffmann, et al. (1999). "Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system." Br J Cancer **81**(2): 242-51.
- Downing, S. R., P. Jackson, et al. (2001). "Mutations within the tumour suppressor gene p53 are not confined to a late event in prostate cancer progression. a review of the evidence." Urol Oncol **6**(3): 103-110.

- Downing, S. R., P. J. Russell, et al. (2003). "Alterations of p53 are common in early stage prostate cancer." Can J Urol **10**(4): 1924-33.
- Fujimoto, N., A. Mizokami, et al. (2001). "Different expression of androgen receptor coactivators in human prostate." Urology **58**(2): 289-94.
- Gao, T., M. Marcelli, et al. (1996). "Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor." J Steroid Biochem Mol Biol **59**(1): 9-20.
- Gobinet, J., G. Auzou, et al. (2001). "Characterization of the interaction between androgen receptor and a new transcriptional inhibitor, SHP." Biochemistry **40**(50): 15369-77.
- Gobinet, J., N. Poujol, et al. (2002). "Molecular action of androgens." Mol Cell Endocrinol **198**(1-2): 15-24.
- Gregory, C. W., B. He, et al. (2001). "The putative androgen receptor-A form results from in vitro proteolysis." J Mol Endocrinol **27**(3): 309-19.
- Haag, P., J. Bektic, et al. (2005). "Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells." J Steroid Biochem Mol Biol **96**(3-4): 251-8.
- Harris, C. C. and M. Hollstein (1993). "Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene." N Engl J Med **329**(18): 1318-27.
- Hastak, K., M. K. Agarwal, et al. (2005). "Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate." Faseb J **19**(7): 789-91.

- Hatzoglou, A., M. Kampa, et al. (2005). "Membrane androgen receptor activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo." J Clin Endocrinol Metab **90**(2): 893-903.
- Heinlein, C. A. and C. Chang (2002). "Androgen receptor (AR) coregulators: an overview." Endocr Rev **23**(2): 175-200.
- Heinlein, C. A. and C. Chang (2004). "Androgen receptor in prostate cancer." Endocr Rev **25**(2): 276-308.
- Hesketh, R. (1995). The oncogene facts book. London.
- Higuchi, R., C. Fockler, et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-30.
- Hollstein, M., D. Sidransky, et al. (1991). "p53 mutations in human cancers." Science **253**(5015): 49-53.
- Hu, Y. C., S. Yeh, et al. (2004). "Functional domain and motif analyses of androgen receptor coregulator ARA70 and its differential expression in prostate cancer." J Biol Chem **279**(32): 33438-46.
- Huggins, C. and C. V. Hodges (1941). "Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. ." J Urol **168**(1): 9-12.
- Ikonen, T., J. J. Palvimo, et al. (1997). "Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators." J Biol Chem **272**(47): 29821-8.

- Isaacs, J. T. (1994). "Etiology of benign prostatic hyperplasia." Eur Urol **25 Suppl 1**: 6-9.
- Jacobsen, S. J., C. J. Girman, et al. (2001). "Natural history of benign prostatic hyperplasia." Urology **58**(6 Suppl 1): 5-16; discussion 16.
- Joly-Pharaboz, M. O., A. Ruffion, et al. (2000). "Inhibition of growth and induction of apoptosis by androgens of a variant of LNCaP cell line." J Steroid Biochem Mol Biol **73**(5): 237-49.
- Joly-Pharaboz, M. O., M. C. Soave, et al. (1995). "Androgens inhibit the proliferation of a variant of the human prostate cancer cell line LNCaP." J Steroid Biochem Mol Biol **55**(1): 67-76.
- Kampa, M., E. A. Papakonstanti, et al. (2002). "The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton." Faseb J **16**(11): 1429-31.
- Kinoshita, M., T. Nakagawa, et al. (2005). "Differently regulated androgen receptor transcriptional complex in prostate cancer compared with normal prostate." Int J Urol **12**(4): 390-7.
- Kokontis, J., K. Takakura, et al. (1994). "Increased androgen receptor activity and altered c-myc expression in prostate cancer cells after long-term androgen deprivation." Cancer Res **54**(6): 1566-73.
- Kyprianou, N., H. Tu, et al. (1996). "Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia." Hum Pathol **27**(7): 668-75.

- Lee, C., D. M. Sutkowski, et al. (1995). "Regulation of proliferation and production of prostate-specific antigen in androgen-sensitive prostatic cancer cells, LNCaP, by dihydrotestosterone." Endocrinology **136**(2): 796-803.
- Li, R., S. Waga, et al. (1994). "Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair." Nature **371**(6497): 534-7.
- Liegibel, U. M., U. Sommer, et al. (2003). "Androgen receptor isoforms AR-A and AR-B display functional differences in cultured human bone cells and genital skin fibroblasts." Steroids **68**(14): 1179-87.
- Ling, M. T., K. W. Chan, et al. (2001). "Androgen induces differentiation of a human papillomavirus 16 E6/E7 immortalized prostate epithelial cell line." J Endocrinol **170**(1): 287-96.
- Linja, M. J., K. P. Porkka, et al. (2004). "Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer." Clin Cancer Res **10**(3): 1032-40.
- Long, B. J., D. N. Grigoryev, et al. (2000). "Antiandrogenic effects of novel androgen synthesis inhibitors on hormone-dependent prostate cancer." Cancer Res **60**(23): 6630-40.
- Lu, S., G. Jenster, et al. (2000). "Androgen induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene: role of androgen receptor and transcription factor Sp1 complex." Mol Endocrinol **14**(5): 753-60.
- Lu, S., M. Liu, et al. (1999). "Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter." Mol Endocrinol **13**(3): 376-84.

- LV, L. D. a. C. (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells.;
." Nature **278**: 261-263.
- Macleod, K. F., N. Sherry, et al. (1995). "p53-dependent and independent expression of
p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage." Genes Dev **9**(8): 935-
44.
- Matias, P. M., P. Donner, et al. (2000). "Structural evidence for ligand specificity in the
binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic
gene mutations." J Biol Chem **275**(34): 26164-71.
- McNeal, J. (1990). "Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology." Urol
Clin North Am **17**(3): 477-86.
- McVary, K. T. (2006). "BPH:Epidemiology and comorbidities." Am J Manag Care **12**(5
Suppl): S122-8.
- Meigs, J. B., B. Mohr, et al. (2001). "Risk factors for clinical benign prostatic hyperplasia
in a community-based population of healthy aging men." J Clin Epidemiol **54**(9):
935-44.
- Mestayer, C., M. Blanchere, et al. (2003). "Expression of androgen receptor coactivators
in normal and cancer prostate tissues and cultured cell lines." Prostate **56**(3):
192-200.
- Milner, J. (1997). "Structures and functions of the tumor suppressor p53." Pathol Biol
(Paris) **45**(10): 797-803.

- Morrison, T. B., J. J. Weis, et al. (1998). "Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification." Biotechniques **24**(6): 954-8, 960, 962.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Muller, J. M., U. Isele, et al. (2000). "FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor." Embo J **19**(3): 359-69.
- Nakano, K., Y. Fukabori, et al. (1999). "Androgen-stimulated human prostate epithelial growth mediated by stromal-derived fibroblast growth factor-10." Endocr J **46**(3): 405-13.
- Nantermet, P. V., J. Xu, et al. (2004). "Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland." J Biol Chem **279**(2): 1310-22.
- Nessler-Menardi, C., I. Jotova, et al. (2000). "Expression of androgen receptor coregulatory proteins in prostate cancer and stromal-cell culture models." Prostate **45**(2): 124-31.
- Nesslinger, N. J., X. B. Shi, et al. (2003). "Androgen-independent growth of LNCaP prostate cancer cells is mediated by gain-of-function mutant p53." Cancer Res **63**(9): 2228-33.

- Nishigori, H., H. Tomura, et al. (2001). "Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japanese subjects." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 575-80.
- Oesterling, J. E. (1996). "Benign prostatic hyperplasia: a review of its histogenesis and natural history." Prostate Suppl **6**: 67-73.
- Planz, B., Q. Wang, et al. (2001). "Regulation of keratinocyte growth factor receptor and androgen receptor in epithelial cells of the human prostate." J Urol **166**(2): 678-83.
- Pozzobon, A. (2002). "Ações da diidrotestosterona sobre a proliferação celular, expressão do AR, bcl-2 e p21 em células prostáticas humanas não transformadas." Dissertação de Mestrado, UFRGS.
- Prives, C. and P. A. Hall (1999). "The p53 pathway." J Pathol **187**(1): 112-26.
- Rahman, M. M., H. Miyamoto, et al. (2003). "Reducing the agonist activity of antiandrogens by a dominant-negative androgen receptor coregulator ARA70 in prostate cancer cells." J Biol Chem **278**(22): 19619-26.
- Reed, J. C. (1994). "Bcl-2 and the regulation of programmed cell death." J Cell Biol **124**(1-2): 1-6.
- Roberts RO, J. D., Rhodes T, Klee GG, Leiber MM, Jacobsen SJ (2004). "Serum sex hormones and measures of benign prostatic hyperplasia." Prostate **61**: 124-131.
- Robson, C. N., V. Gnanapragasam, et al. (1999). "Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium." J Endocrinol **160**(2): 257-66.

- Rokhlin, O. W., A. F. Taghiyev, et al. (2005). "Androgen regulates apoptosis induced by TNFR family ligands via multiple signaling pathways in LNCaP." Oncogene **24**(45): 6773-84.
- Sampaio, F. (1992). "Neoplasia prostática: conceitos anatômicos fundamentais para compreensão da patologia benigna e maligna." J Bras Urol **18**: 121-125.
- Schwarze, S. R., Y. Shi, et al. (2001). "Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells." Oncogene **20**(57): 8184-92.
- Seol, W., H. S. Choi, et al. (1996). "An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors." Science **272**(5266): 1336-9.
- Shapiro, E., V. Hartanto, et al. (1997). "Morphometric analysis of pediatric and nonhyperplastic prostate glands: evidence that BPH is not a unique stromal process." Prostate **33**(3): 177-82.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-12.
- Shibata, Y., K. Ito, et al. (2000). "Changes in the endocrine environment of the human prostate transition zone with aging: simultaneous quantitative analysis of prostatic sex steroids and comparison with human prostatic histological composition." Prostate **42**(1): 45-55.

- Silva, I. S., D. M. Morsch, et al. (2001). "Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture." Endocr Res **27**(1-2): 153-69.
- Silver RI, W. E., Thigpen AE, Guileyardo JM, McConnell JD, Russell DW. (1994). "Cell Type specific expression of steroid 5 alpha-reductase 2." J. Urology **152**: 438-442.
- Simental, J. A., M. Sar, et al. (1991). "Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor." J Biol Chem **266**(1): 510-8.
- Solomon, M. J. and P. Kaldis (1998). "Regulation of CDKs by phosphorylation." Results Probl Cell Differ **22**: 79-109.
- Sonnenschein, C., N. Olea, et al. (1989). "Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens." Cancer Res **49**(13): 3474-81.
- Spritzer, P. M., I. S. Silva, et al. (1995). "Culture of adult human prostatic epithelial cells: A simplified method fo obtaining primary cultures." Med Sci Res **23**: 379-381.
- Stewart, Z. A. and J. A. Pietenpol (2001). "p53 Signaling and cell cycle checkpoints." Chem Res Toxicol **14**(3): 243-63.
- Sundfors, C. H. and Y. U. Collan (1997). "Target length and primer concentration affect the gain of c-erbB2 and p53 amplicons." Faseb J **11**(11): 897-903.
- Taplin, M. E., G. J. Bubley, et al. (1995). "Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer." N Engl J Med **332**(21): 1393-8.

- Thompson, J., F. Saatcioglu, et al. (2001). "Disrupted amino- and carboxyl-terminal interactions of the androgen receptor are linked to androgen insensitivity." Mol Endocrinol **15**(6): 923-35.
- Trapman, J., C. Ris-Stalpers, et al. (1990). "The androgen receptor: functional structure and expression in transplanted human prostate tumors and prostate tumor cell lines." J Steroid Biochem Mol Biol **37**(6): 837-42.
- Tsuji, M., Y. Murakami, et al. (1998). "Immunohistochemical analysis of Ki-67 antigen and Bcl-2 protein expression in prostate cancer: effect of neoadjuvant hormonal therapy." Br J Urol **81**(1): 116-21.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, et al. (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." Science **228**(4706): 1440-3.
- Veldscholte, J., C. A. Berrevoets, et al. (1992). "Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors." Biochemistry **31**(32): 7422-30.
- Waga, S., G. J. Hannon, et al. (1994). "The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA." Nature **369**(6481): 574-8.
- Wang, L., C. L. Hsu, et al. (2005). "Androgen receptor corepressors: an overview." Prostate **63**(2): 117-30.
- Wang, L. G., L. Ossowski, et al. (2001). "Overexpressed androgen receptor linked to p21WAF1 silencing may be responsible for androgen independence and

- resistance to apoptosis of a prostate cancer cell line." Cancer Res **61**(20): 7544-51.
- Wang, T. and M. J. Brown (1999). "mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection." Anal Biochem **269**(1): 198-201.
- Wei JT, C. E., Jacobsen SJ. (2005). "Urologic Diseases in America project: benign prostatic hyperplasia. ." J. Urology **173**: 1256-1261.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-30.
- Wurtz, J. M., W. Bourguet, et al. (1996). "A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors." Nat Struct Biol **3**(1): 87-94.
- Yang, Q., K. M. Fung, et al. (2005). "Androgen receptor signaling is required for androgen-sensitive human prostate cancer cell proliferation and survival." Cancer Cell Int **5**(1): 8.
- Yeap, B. B., J. A. Wilce, et al. (2004). "The androgen receptor mRNA." Bioessays **26**(6): 672-82.
- Yeh, S. and C. Chang (1996). "Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5517-21.
- Yeh, S., Y. C. Hu, et al. (2000). "Increase of androgen-induced cell death and androgen receptor transactivation by BRCA1 in prostate cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11256-61.

- Yeh, S., H. Miyamoto, et al. (1998). "Retinoblastoma, a tumor suppressor, is a coactivator for the androgen receptor in human prostate cancer DU145 cells." Biochem Biophys Res Commun **248**(2): 361-7.
- Zeng, L., R. G. Rowland, et al. (2004). "Apoptosis incidence and protein expression of p53, TGF-beta receptor II, p27Kip1, and Smad4 in benign, premalignant, and malignant human prostate." Hum Pathol **35**(3): 290-7.
- Zhou, J. R., L. Yu, et al. (2004). "Progression to androgen-independent LNCaP human prostate tumors: cellular and molecular alterations." Int J Cancer **110**(6): 800-6.
- Zhou, Z. X., C. I. Wong, et al. (1994). "The androgen receptor: an overview." Recent Prog Horm Res **49**: 249-74.
- Zhuang, T. N., L. P. Ly, et al. (2005). "Growth and development during early manhood as determinants of prostate size in later life." J Clin Endocrinol Metab **90**(11): 6055-63.

ANEXO 1

REPRESENTAÇÃO DAS REAÇÕES DE RT-PCR EM TEMPO REAL

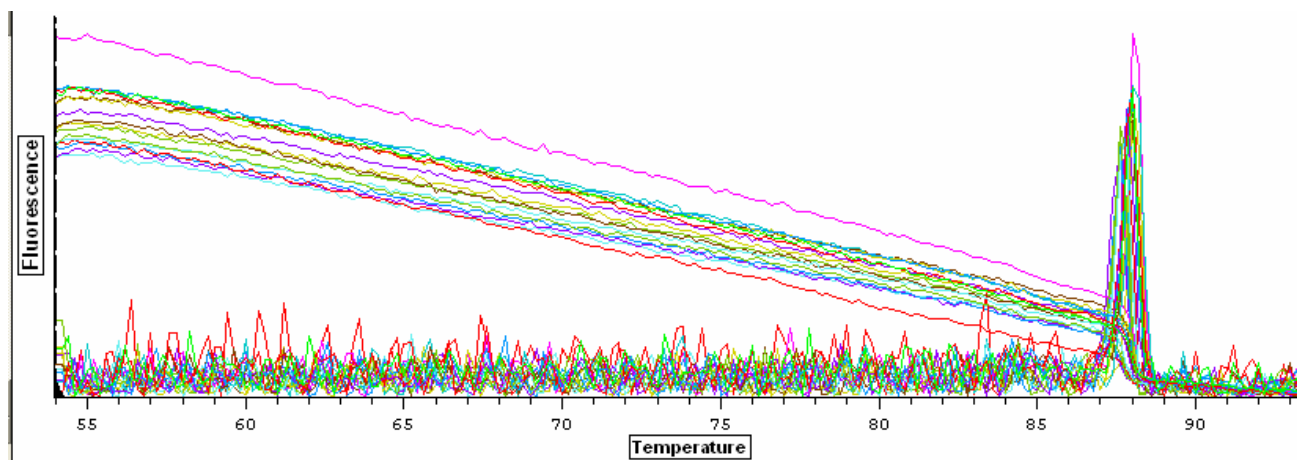


Figura 19: Curva de Melting para o gene do AR.

A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2° C , entre 55 e 94° C. E a fluorescência lida por 10s.

O pico indicado na Tm de 87°C corresponde ao produto de 400pb do gene do AR.

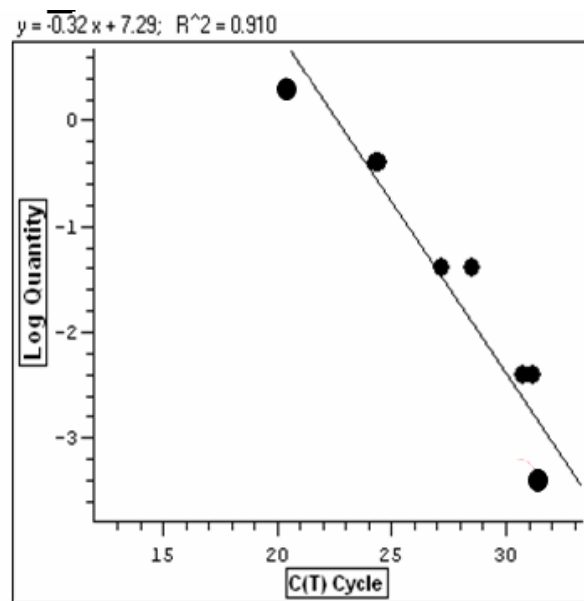


Figura 20. Curva padrão para o gene do AR

A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de tecido prostático. De 2 a 0,0002 ng de DNAc.

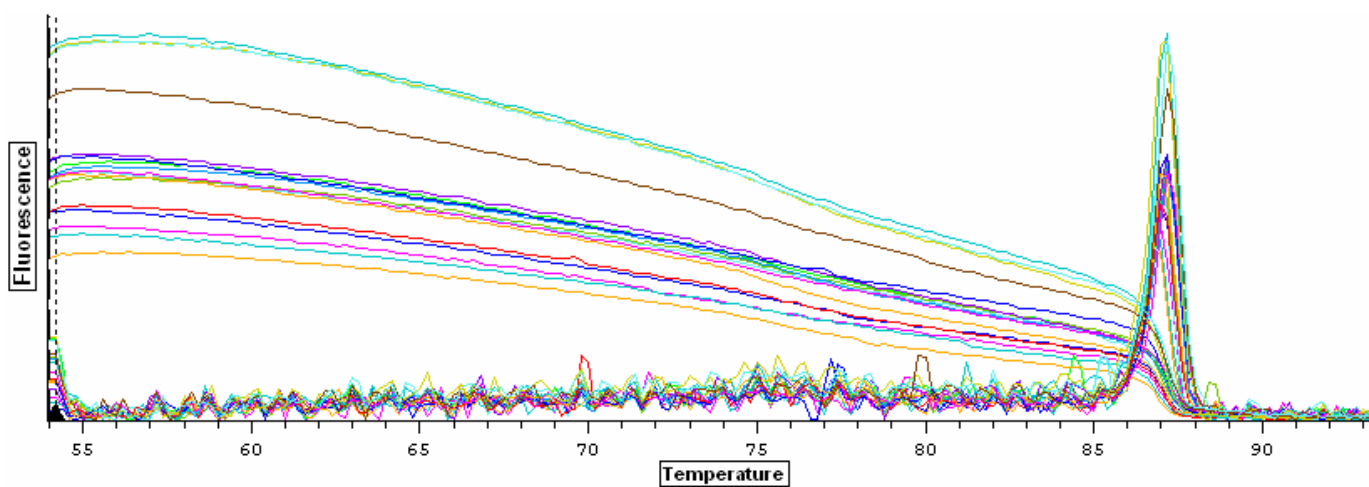


Figura 21: Curva de Melting para o gene do *FHL-2*

A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2° C , entre 55 e 94° C. E a fluorescência lida por 10s.

O pico indicado na Tm de 87°C corresponde ao produto de 170pb do gene do *FHL-2*

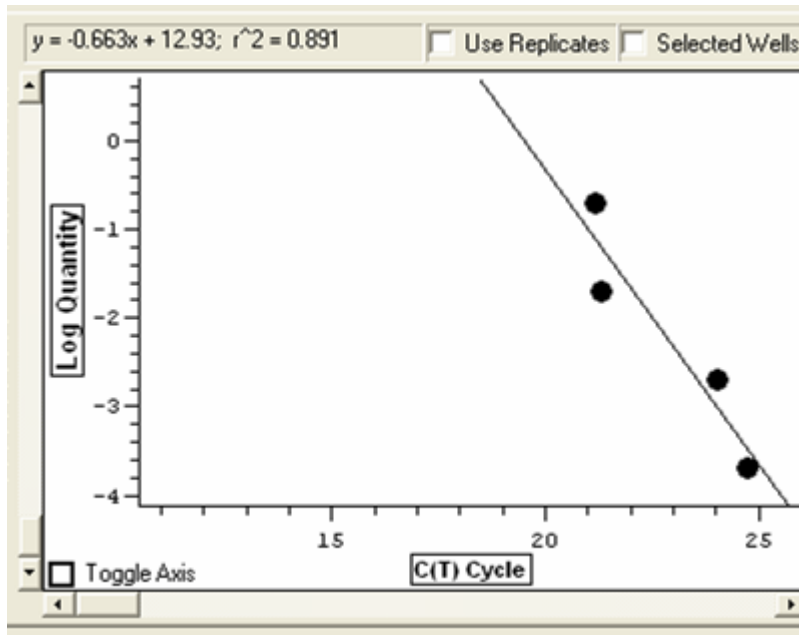


Figura 22. Curva padrão para o gene do *FHL-2*

A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de tecido prostático. De 2 a 0,0002 ng de DNAc.

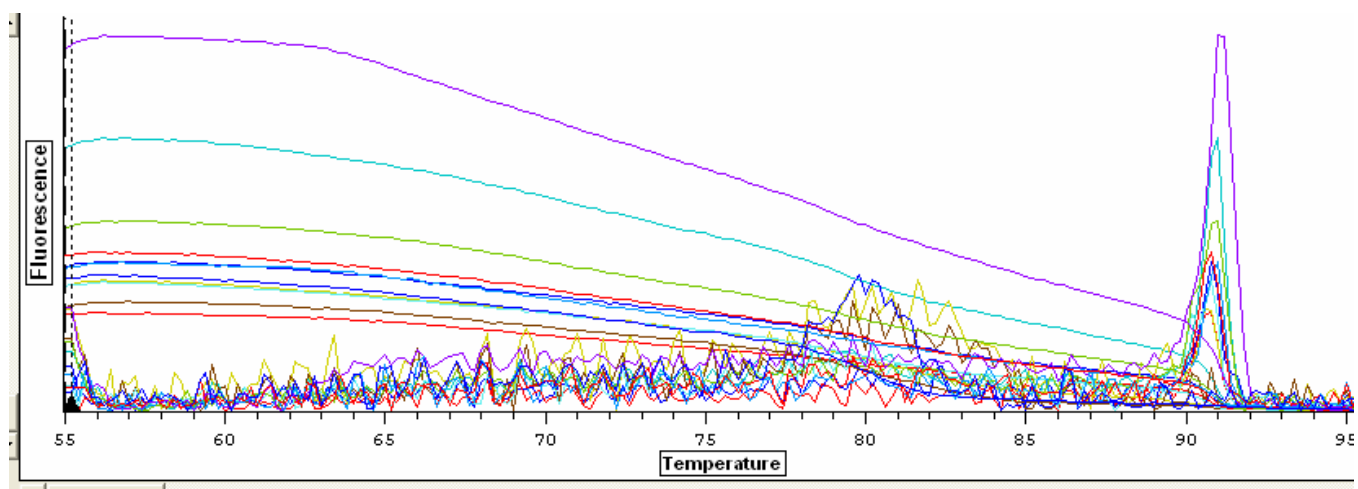


Figura 23: Curva de Melting para o gene do *shp-1*

A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2° C, entre 55 e 96° C. E a fluorescência lida por 10s.

O pico indicado na Tm de 91 °C corresponde ao produto de 189 pb do gene do *shp-1*

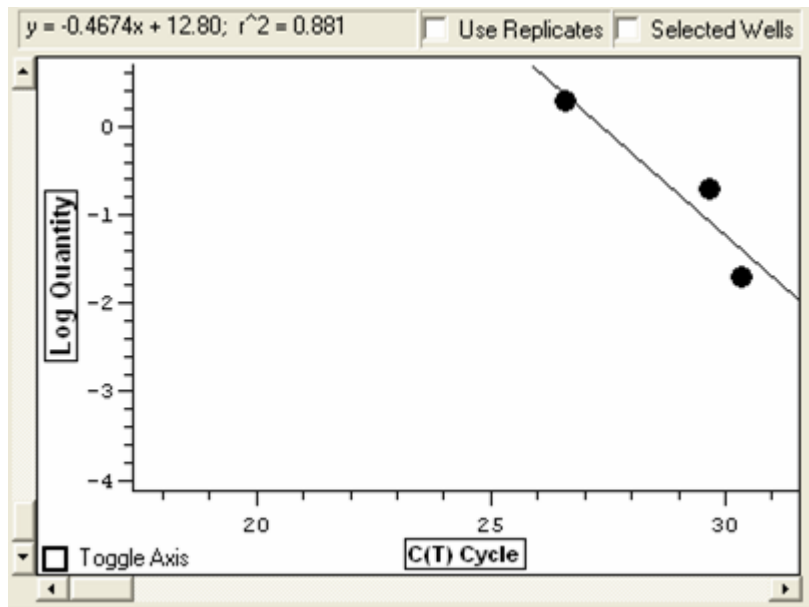


Figura 24. Curva padrão para o gene do *shp-1*

A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAC de tecido prostático. De 2 a 0,0002 ng de DNAC.

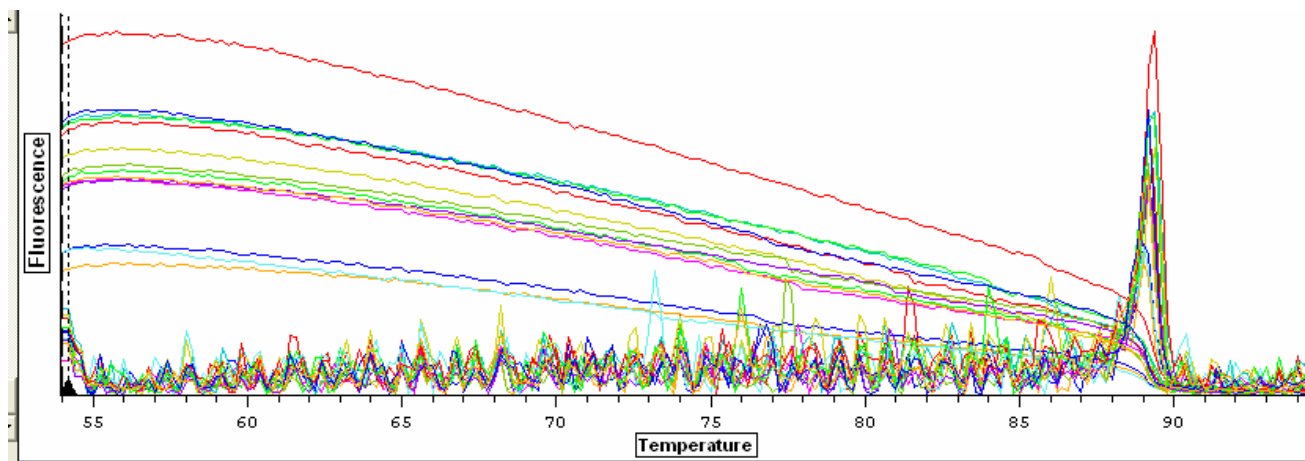


Figura 25: Curva de Melting para o gene do *p53*

A curva foi construída com aumentos gradativos de $0,2^{\circ}\text{C}$, entre 55 e 96°C . E a fluorescência lida por 10s .

O pico indicado na T_m de 89°C corresponde ao produto de 371 pb do gene do *p53* .

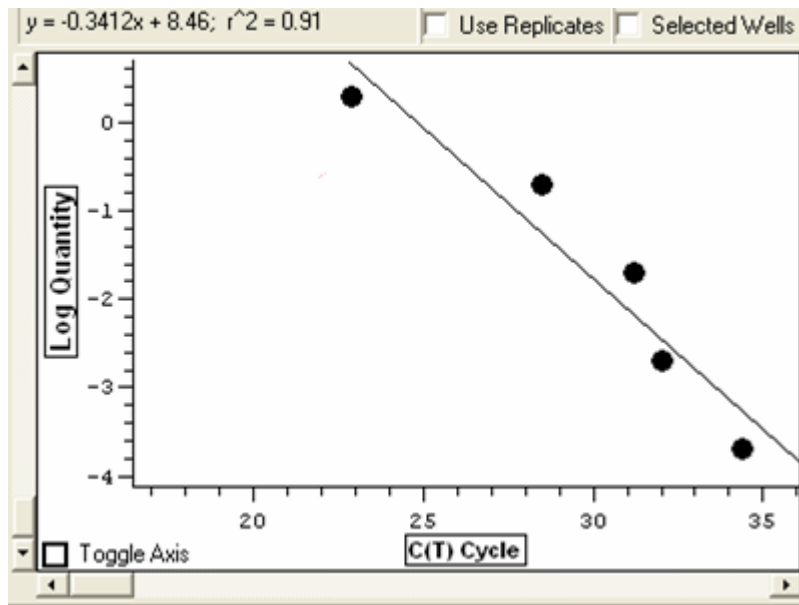


Figura 26. Curva padrão para o gene do *p53*

A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAC de tecido prostático. De 2 a 0,0002 ng de DNAC.

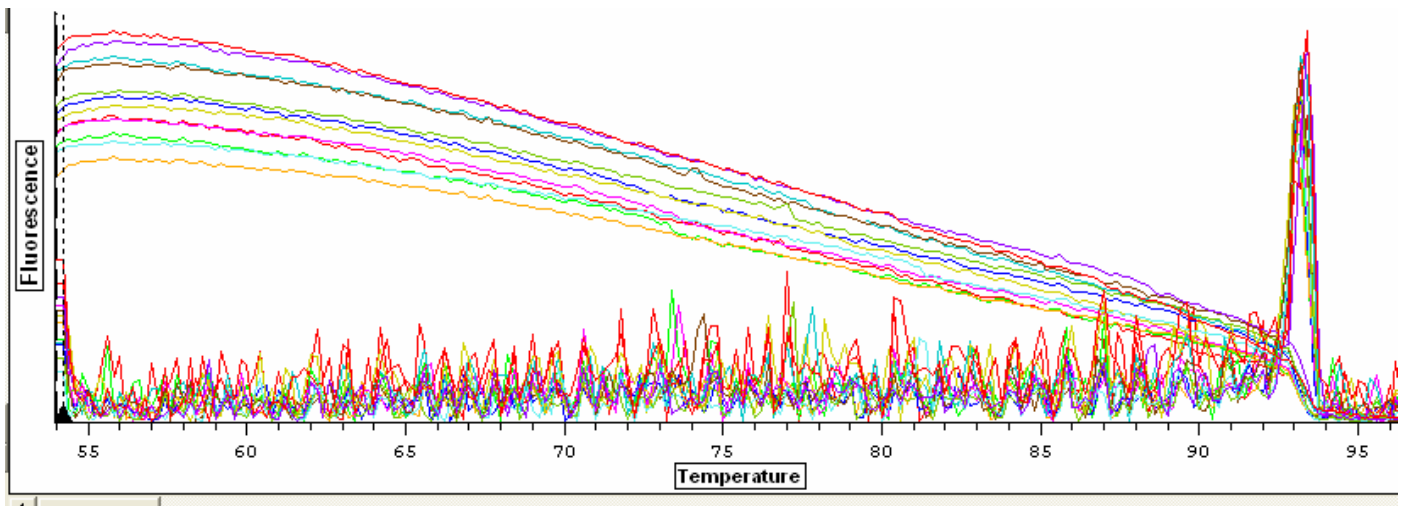


Figura 27: Curva de Melting para o gene do *p21*

A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2° C, entre 55 e 96° C. E a fluorescência lida por 10s.

O pico indicado na Tm de 93°C corresponde ao produto de 517 pb do gene do *p21*

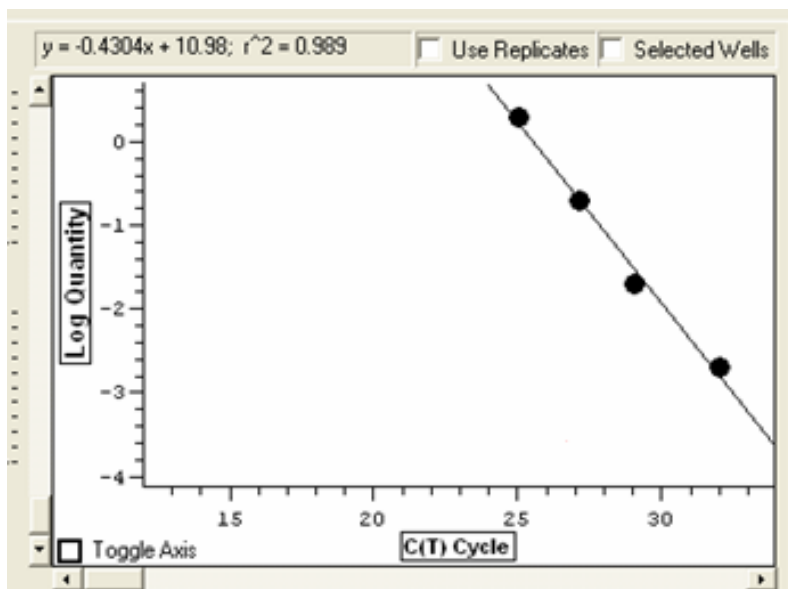


Figura 28. Curva padrão para o gene do *p21*

A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAC de tecido prostático. De 2 a 0,0002 ng de DNAC.