

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

Tese de Doutorado

**Análise da modulação androgênica na proliferação celular e
expressão de genes alvo em hiperplasia prostática benigna e
câncer de próstata**

Lolita Schneider Pizzolato

Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre, maio de 2012

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

Tese de Doutorado

**Análise da modulação androgênica na proliferação celular e expressão de genes
alvo em hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata**

Tese de Doutorado apresentada ao PPG
Ciências Biológicas: Fisiologia como pré-
requisito obrigatório para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia

Lolita Schneider Pizzolato

Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre, maio de 2012

Dedico este trabalho a minha família,

Vinicius e Enzo,

os grandes amores da minha vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum pelo exemplo como pesquisadora, pela confiança, estímulo, tranquilidade e pelos ensinamentos valiosos. Agradeço principalmente por ter me aceito como sua aluna, pela confiança depositada em mim e no meu trabalho.

Aos professores colaboradores do nosso grupo, Dr^a. Helena von Eye Corleta e Dr. Edison Capp, por todo o conhecimento compartilhado em nossos encontros científicos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Flávia Ribeiro pelos valiosos ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Milton Berger e ao Dr. Brasil Silva Neto, Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela disponibilidade, auxílio e colaboração, principalmente na fase de coleta de materiais.

Aos professores do PPG em Ciências Biológicas: Fisiologia pelos ensinamentos na construção do meu conhecimento.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos.

Sou profundamente grata a minha amiga Gisele Branchini, pela enorme ajuda na realização deste trabalho, pela amizade e afeto inestimável, que se traduziram sempre em respostas incentivadoras, pela valiosa parceria, por sempre me dar apoio nos momentos difíceis quando eu achava que nada mais daria certo.

Agradeço eternamente a minha amiga Ana Caroline Hillebrand, pelo auxílio neste trabalho, pelo carinho, amizade, por ter me acolhido em sua casa e me feito companhia quando

eu estava longe da minha família, e principalmente por estar ao meu lado no nascimento do meu filho.

As minhas amigas Patrícia Martiny e Ana Santin, por toda a ajuda que me deram no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e solidariedades compartilhadas todo esse tempo, pelos cafés e conversas descontraídas que tornaram meu cotidiano mais leve no decorrer deste trabalho.

À minha amiga Vivian Treichel Giesel, pela amizade que começou um pouco antes do mestrado e que hoje, mesmo com a distância, permanece igual.

Ao Vanderlei Biolchi, pela amizade e pela ajuda incondicional nas práticas de laboratório e principalmente pela ajuda na parte de estatística desta tese.

A todos os colegas e amigos de laboratório, Fernanda, Gustavo, Joelson, Carol Luft, Aline Amaral, Diego, Carlos, Amanda, Gabi, pela amizade, pelos momentos agradáveis, pelo auxílio direto ou indireto para a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Alex Sander Araújo, pelas valiosas contribuições para este trabalho.

Aos meus pais, pelo amor, pela dedicação, pelo incentivo recebido ao longo destes anos e por todas as oportunidades que vocês sempre me proporcionaram.

Aos meus irmãos, pelo amor, pelo carinho, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração e de alegria nos finais de semana.

Aos meus sogros, Moacir e Rosa pelo carinho e apoio constantes.

Ao meu marido Vinicius, pelo apoio, pela cumplicidade, por estar ao meu lado, mesmo quando eu estava distante me dedicando a este trabalho, por compreender esta minha ausência e por me fazer cada dia mais feliz. Ao meu filho Enzo, pelos momentos de alegria e por ter proporcionado a melhor experiência da minha vida.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma ajudaram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
SUMÁRIO.....	6
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	18
LISTA DE TABELAS.....	20
INTRODUÇÃO	21
Glândula Prostática.....	21
Câncer de Próstata.....	22
Hiperplasia Prostática Benigna.....	23
Androgênios.....	25
Bcl2 e Bax.....	28
p53 e MDM2.....	30
p21.....	34
HIPÓTESE	37
OBJETIVOS.....	38
Objetivo Geral.....	38
Objetivos Específicos.....	38
MATERIAIS E MÉTODOS.....	39

<u>Delineamento do Estudo</u>	<u>39</u>
<u>Critérios de Inclusão</u>	<u>39</u>
<u>Obtenção das amostras de tecido prostático.....</u>	<u>40</u>
<u>Cultura primária de células.....</u>	<u>41</u>
<u>Tratamento hormonal.....</u>	<u>43</u>
<u>Avaliação da proliferação celular.....</u>	<u>44</u>
<u>Análise da expressão gênica.....</u>	<u>45</u>
<u>Síntese de cDNA.....</u>	<u>48</u>
<u>PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....</u>	<u>48</u>
<u>Disposição Final de Resíduos e Biossegurança.....</u>	<u>53</u>
<u>Análise estatística.....</u>	<u>53</u>
<u>Cálculo Tamanho da Amostra.....</u>	<u>54</u>
<u>Considerações Éticas.....</u>	<u>54</u>
<u>Locais de Realização do Projeto.....</u>	<u>54</u>
<u>Fontes de Financiamento.....</u>	<u>55</u>
<u>RESULTADOS</u>	<u>56</u>
<u> CAPÍTULO 1.....</u>	<u>57</u>
<u> Avaliação da proliferação celular em cultura primária de células prostáticas</u> <u> tratadas com diferentes concentrações de DHT e análise da expressão gênica de</u> <u> Bcl2, Bax, p53, MDM2 e p21 em cultura primária de células prostáticas tratadas</u> <u> com diferentes concentrações de DHT</u>	<u>57</u>
<u> CAPÍTULO 2.....</u>	<u>73</u>
<u> Expressão gênica de Bcl2, Bax, p53, MDM2 e p21 em tecido proveniente</u> <u> de HPB e CaP e análise da razão de chance de ter CaP</u>	<u>73</u>
<u>DISCUSSÃO.....</u>	<u>85</u>
<u>CONCLUSÕES.....</u>	<u>97</u>

<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>99</u>
<u>ANEXO 1.....</u>	<u>109</u>
<u>ANEXO 2</u>	<u>112</u>

RESUMO

Introdução: A glândula prostática depende de hormônios esteróides para ter um adequado desenvolvimento e funcionalidade secretora. Com o avanço da idade, surgem alterações no tecido prostático junto com outras doenças da próstata. As duas formas, clinicamente, mais importantes e prevalentes do crescimento anormal da próstata são hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP). Estas doenças são o resultado de alterações do ciclo celular que é regulado por dois processos: a proliferação e a apoptose. Estes processos são regulados pela expressão do produto de genes, tais como o *p53*, *MDM2*, *p21*, *Bcl2* e *Bax*. **Objetivos:** Avaliar a proliferação celular em cultura primária de células prostáticas tratadas com diferentes concentrações de diidrotestosterona (DHT); verificar os níveis do mRNA do *Bcl2*, *Bax*, *p53*, *MDM2* e *p21* em cultura primária de células prostáticas tratadas com diferentes concentrações de DHT; determinar os níveis do mRNA do *Bcl2*, *Bax*, *p53*, *MDM2* e *p21* em tecido proveniente de HPB e CaP e avaliar a razão de chance de ter CaP. **Métodos:** Para realização das culturas primárias foram utilizadas amostras de tecido com diagnóstico de HPB. As células prostáticas epiteliais e estromais foram semeadas separadamente para a análise de proliferação celular e para a expressão gênica. Os grupos referentes ao tratamento foram divididos em subgrupos tratados com diferentes doses de DHT e com o antiandrogênio hidroxiflutamida (OH-FLU): grupo controle (meio de cultivo suplementado com 5% de SBF desteroídado), grupo DHT 10^{-8} M, grupo DHT 10^{-13} M,

grupo OH-FLU 10^{-6} M, grupo DHT 10^{-8} M associado com OH-FLU 10^{-6} M e o grupo DHT 10^{-13} M associado com OH-FLU 10^{-6} M. Para a avaliação da proliferação celular as células em cultura foram avaliadas por MTT. Para a avaliação da expressão gênica foi realizada a extração total do RNA das células em cultura seguido por PCR em tempo real. Para avaliar a expressão gênica de tecido, as amostras com HPB e com CaP foram submetidas ao protocolo da extração do RNA total seguido pela técnica da PCR em tempo real. **Resultados:** A avaliação da proliferação celular das células prostáticas epiteliais, tratadas com DHT 10^{-13} M, apresentou um aumento de 33% na proliferação celular e as células tratadas com DHT 10^{-8} M, OH-FLU 10^{-6} M, DHT 10^{-13} M associada com OH-FLU 10^{-6} M e DHT 10^{-8} M associada com OH-FLU 10^{-6} M apresentaram um aumento na proliferação de 24%, 31%, 25% e 21% respectivamente, quando comparadas com o grupo controle. As células prostáticas estromais, em cultura, tratadas com diferentes doses do hormônio apresentaram uma variação na proliferação celular menor que 10% quando comparadas com o grupo controle. A expressão gênica do *MDM2*, *p53*, *p21*, *Bcl2* e *Bax* das células prostáticas epiteliais e estromais, tratadas com diferentes concentrações de DHT, não mostrou diferença estatisticamente significativa. A expressão do RNAm, no tecido prostático, dos genes *MDM2*, *p53*, *p21*, *Bcl2* mostrou um aumento estatisticamente significativo em CaP quando comparado com o grupo HPB. O gene *Bax* que não mostrou diferença significativa quando comparado com o grupo HPB. A partir da escolha do melhor ponto de corte da curva ROC, nossos resultados mostraram que indivíduos que apresentam a expressão de *MDM2* acima de 2,89 a razão de chance de o indivíduo ter CaP aumentada 69 vezes. Para a expressão dos genes *p53*, *p21*, *Bcl2* e *Bax*, quando apresentarem uma expressão mais alta que o valor do ponto de corte a chance de ter CaP aumentam 15, 31, 17 e 4 vezes respectivamente. As expressões dos genes *MDM2* e *p21* apresentaram boa sensibilidade e ótima

especificidade quando comparado ao PSA. Já os genes *p53* e *Bcl2* apresentaram boa sensibilidade e especificidade e *Bax* mostrou uma boa sensibilidade, mas uma baixa especificidade quando comparado ao PSA. Baseado nos dados de especificidade e sensibilidade foram avaliados os testes em paralelo e em série, em que a análise em paralelo apresentou melhor sensibilidade do que especificidade e a análise em série se mostrou mais específica do que sensível. **Conclusões:** O modelo de cultura primária de células para avaliar a proliferação celular é viável. As células prostáticas epiteliais e estromais, tratadas com DHT, não apresentaram diferença significativa na expressão gênica entre os grupos. O aumento da expressão gênica nas amostras de CaP indicam que os genes *MDM2*, *p53*, *p21* e *Bcl2* podem estar envolvidos no desenvolvimento do câncer de próstata. De acordo com as análises em série estes genes podem ter uma grande importância na clínica quando avaliados em série com o PSA para confirmar o diagnóstico de CaP em pacientes com níveis de PSA elevados, exame de toque retal alterado e biópsia negativa.

ABSTRACT

Introduction: The prostate gland depends on the steroid hormones to have an adequate development and secretory functionality. With the advancing age, changes occur in prostate tissue with other prostate diseases. The two forms clinically most important and prevalent of abnormal growth of the prostate gland are benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa). These diseases are the result of changes in the cell cycle which is maintained by two processes: proliferation and apoptosis. These processes are regulated by expression of gene products, such as the *p53*, *MDM2*, *p21*, *Bcl2* and *Bax*. **Aims:** To evaluate the cell proliferation in primary cultures of prostatic cells treated with different concentrations of dihydrotestosterone (DHT), to verify the levels of mRNA of *Bcl2*, *Bax*, *p53*, *MDM2* and *p21* in primary culture of prostatic cells treated with different concentrations of DHT; to determine levels of mRNA of the *Bcl2*, *Bax*, *p53*, *MDM2* and *p21* in tissue from BPH and PCa and to evaluate the odds ratio for PCa. **Methods:** To perform the primary cultures were used tissue samples with the diagnosis of BPH. The epithelial and stromal prostatic cells were plated separately for the analysis of the cell proliferation and for gene expression. The groups regarding to the treatment were divided into subgroups treated with different doses of DHT and the antiandrogen hydroxiflutamide (OH-FLU): control group (culture medium supplemented with 5% of charcoal-treated FBS), group DHT 10^{-8} M, group DHT 10^{-13} M, group OH-FLU 10^{-6} M, group DHT 10^{-8} M associated with OH-FLU 10^{-6} M and the group DHT

10^{-13} M associated with OH-FLU 10^{-6} M. For the evaluation of cellular proliferation cells in culture was evaluated by MTT. For the evaluation of gene expression, was performed the total RNA extraction for the cells in culture and real time PCR. To evaluate the gene expression of tissue, the samples with BPH and with PCa were submitted to the extraction of total RNA followed by the technique of real time PCR.

Results: The evaluation cell proliferation for the prostatic epithelial cells, treated with DHT 10^{-13} M, presented an increase of 33% in the cell proliferation and the cells treated with DHT 10^{-8} M, OH-FLU 10^{-6} M, DHT 10^{-13} M associated with OH-FLU 10^{-6} M and DHT 10^{-8} M associated with OH-FLU 10^{-6} M showed an increase in the proliferation of 24%, 31%, 25% e 21% respectively, when compared with the control group. Prostatic stroma cells, in culture, treated with different doses of hormone showed a variation in cell proliferation of less than 10% when compared with the control group. The gene expression of *MDM2*, *p53*, *p21*, *Bcl2* and *Bax* of prostatic epithelial and stroma cells, treated with different concentrations of DHT, do not show statistically significant difference. The expression of mRNA into the prostatic tissue of the genes *MDM2*, *p53*, *p21*, *Bcl2* showed an increase statistically significant in PCa when compared with the group BPH. The *Bax* gene did not show significant difference when compared with the group BPH. From the choice of best cut point of the ROC curve, our results showed that person that presented the expression of *MDM2* above 2.89, the chance of the individual to have PCa is increased 69 fold. For expression of the genes *p53*, *p21*, *Bcl2* and *Bax*, when they presenting an expression higher than the value of the cut point, the chance to have PCa increased 15, 31, 17 and 4 folds respectively. The expressions of the genes *MDM2* and *p21* showed a good sensibility and optimal specificity when compared to the PSA. Since the genes *p53* and *Bcl2* showed a good sensibility and specificity, and *Bax* showed a good sensibility, but a low specificity when compared to the PSA. Based

on sensibility and specificity data, were evaluated the tests in parallel and in series, in which the analysis in parallel showed better sensibility than specificity, and the serial analysis was more specific than sensitive. **Conclusions:** The model of the primary culture of cells for assessment of cell proliferation is viable. The prostatic epithelial and stromal cells, treated with DHT, not show significant difference in gene expression between groups. The increase of the gene expression in the samples of PCa indicate that the genes *MDM2*, *p53*, *p21* and *Bcl2* may be implicated into the development of prostate cancer. In accordance with the analyzes in series, these genes may have an great importance in the clinical when evaluated in series with the PSA to confirm the diagnosis of PCa in patients with elevated levels of PSA, digital rectal examination altered and biopsy negative.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AR	Receptor de androgênios
Bax	<i>bcl2-associated x protein</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMG	Beta-2-microglobulina
CaP	Câncer de próstata
Cdk2	Quinase dependente de ciclinas 2
Cdk4	Quinase dependente de ciclinas 4
CdKI	Inibidor da quinase dependente de ciclinas
cDNA	DNA complementar
C _T	Ciclo limiar (<i>Threshold Cycle</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHT	Diidrotestosterona
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirino nucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
DU-145	Linhagem celular de carcinoma prostático
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
G1	Fase do ciclo celular – crescimento e preparação para replicação dos cromossomos
HPB	Hiperplasia prostática benigna
INCA	Instituto nacional do câncer
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilo-Dalton
LaBIMET	Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral
LaGOM	Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular
LNCaP	<i>Lymph Node Carcinoma of the Prostate</i>
mAR	Receptor de androgênios de membrana
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium
<i>n</i>	Número da amostra
nm	Nanômetro
OH-FLU	Hidroxiflutamida
PAP	Fosfatase ácida prostática específica
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PNT1A	Linhagem celular prostática humana imortalizada

PNT2	Linhagem imortalizada de células epiteliais humanas derivadas de próstata normal
PPR	Região pré-prostática
PSA	Antígeno prostático específico
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa quantitativa
R1881	Androgênio Sintético
RNA	Ácido ribonucléico
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROX	Corante de referência passiva
RT-PCR	PCR transcriptase reversa
S	Fase do ciclo celular – síntese de DNA
SBF	Soro bovino fetal
SBF-DT	Soro bovino fetal desteroídado
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
SYBR	Corante <i>Syber Green I</i>
T _m	Temperatura de dissociação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Zonas da próstata.....	página 22
Figura 2. Respostas mediadas por p53.....	página 31
Figura 3. Fluxograma I.....	página 45
Figura 4. Fluxograma II.....	página46
Figura 5. Fluxograma III.....	página 47
Figura 6. Curva de <i>meelting</i> do gene BMG.....	pagina 49
Figura 7. Amplificação e curva de diluição para o gene BMG.....	página 50
Figura 8. Células epiteliais prostáticas.....	página 58
Figura 8.1. Proliferação de células epiteliais.....	página 59
Figura 9. Cultura de células estromais.....	página 60
Figura 9.1. Proliferação de células estromais.....	página 61
Figura 10. Expressão gênica do MDM2 em cultura de células epiteliais prostáticas.....	página 63
Figura 11. Expressão gênica do p53 em cultura de células epiteliais prostáticas.....	página 64
Figura 12. Expressão gênica do p21 em cultura de células epiteliais prostáticas.....	página 65
Figura 13. Expressão gênica do Bcl2 em cultura de células epiteliais prostáticas.....	página 66

Figura 14. Expressão gênica do Bax em cultura de células epiteliais prostáticas.....	página 67
Figura 15. Expressão gênica do MDM2 em cultura de células estromais prostáticas.....	página 68
Figura 16. Expressão gênica do p53 em cultura de células estromais prostáticas.....	página 69
Figura 17. Expressão gênica do p21 em cultura de células estromais prostáticas.....	página 70
Figura 18. Expressão gênica do Bcl2 em cultura de células estromais prostáticas.....	página 71
Figura 19. Expressão gênica do Bax em cultura de células estromais prostáticas.....	página 72
Figura 20. Expressão gênica de MDM2.....	página 74
Figura 21. Expressão gênica de p53.....	página 75
Figura 22. Expressão gênica de p21.....	página 76
Figura 23. Expressão gênica de Bcl2.....	página 77
Figura 24. Expressão gênica de Bax.....	página 78
Figura 25. Distribuição de frequência dos valores de expressão gênica.....	página 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos.....página 52

Tabela 2. Análise da razão de chancepágina 82

Tabela 3. Parâmetros de diagnóstico.....página 83

Tabela 4. Análise em paralelo e em série.....página 84

INTRODUÇÃO

Glândula Prostática

A próstata é uma glândula que faz parte do sistema genital masculino e está localizada em posição inferior à bexiga e anterior ao reto. Esta glândula depende de hormônios esteroides não somente para o seu adequado desenvolvimento embrionário e crescimento puberal, mas também para o estabelecimento da sua função secretora (Isaacs 1994).

A próstata humana é constituída por três zonas: a periférica, a central e a de transição (Figura 1) (McNeal 1990). Adicionalmente, esta glândula apresenta dois diferentes compartimentos: o compartimento epitelial e o estromal separados pela membrana basal (Isaacs 1999). O compartimento epitelial da próstata é composto por dois tipos de células: as basais e as secretoras. A principal função das células secretoras é secretar o fluido prostático contendo antígeno prostático específico (PSA), fosfatase ácida prostática específica (PAP) e prostaglandinas. Estas células expressam o receptor de androgênios (AR); por isso, sua viabilidade e capacidade secretora são dependentes de androgênios (Schalken and van Leenders 2003). O compartimento estromal é composto pela matriz extracelular, fibroblastos, células musculares não estriadas, células endoteliais, nervos e células infiltrantes, como por exemplo, mastócitos e linfócitos (Isaacs 1999; Schalken and van Leenders 2003). As células estromais da próstata também expressam o AR (Berry, Maitland et al. 2008).

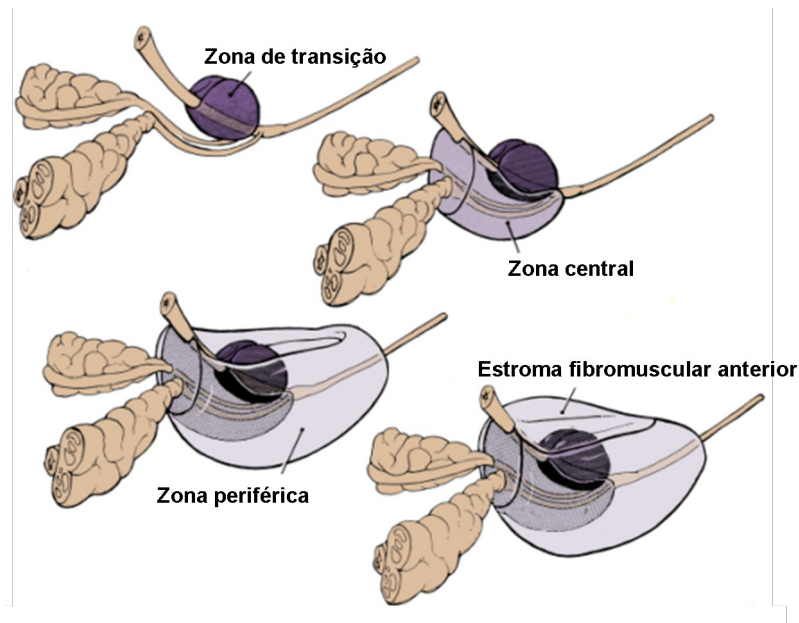


Figura 1. Zonas da próstata. A zona de transição compreende de 5-10% do tecido glandular de um homem jovem. A zona central faz parte da base da próstata e por ela passa o ducto ejaculatório. E a zona periférica compreende a maior parte da glândula. Adaptado de (McNeal 1990).

Alterações no tecido prostático aparecem com o avanço da idade, junto com outras doenças da próstata. As duas formas clinicamente mais importantes e prevalentes do crescimento anormal da próstata são hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP) (Daneshgari and Crawford 1993).

Câncer de Próstata

O câncer de próstata é uma das principais causas de morbidade e de mortalidade entre homens, sendo o segundo tipo de câncer mais comum, e o segundo em mortes, nos Estados Unidos (Jemal, Siegel et al. 2008). Entre os brasileiros, o CaP também é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens brasileiros, ficando atrás somente do câncer de pele não-melanoma. No ano de 2009 foram confirmadas 12.274 mortes por

CaP e é prevista uma estimativa de 60.180 novos casos para o ano de 2012. No estado do Rio Grande do Sul, a estimativa prevista é de 4.270 novos casos (INCA 2012). Nos Estados Unidos, foram diagnosticados, no ano de 2009, aproximadamente 192.000 casos de CaP e a expectativa de morte, para o mesmo ano, era de 27.000 homens (Wolf, Wender et al. 2010). Esse tipo de câncer é o sexto mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. O CaP é considerado um câncer da terceira idade, cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos (INCA 2012).

Existe uma variação na incidência de CaP entre os grupos étnicos, que aparece aumentada em africanos, intermediária em caucasianos e inferior em asiáticos (Hsing, Tsao et al. 2000).

O histórico familiar é um fator de risco para desenvolver o CaP. Este fator se refere não somente ao compartilhamento de genes, mas também pelos ambientes e comportamentos. Estudos epidemiológicos determinam que ter um parente de primeiro grau com CaP aumenta duas ou três vezes mais as chances deste indivíduo desenvolver o câncer de próstata (Hemminki and Czene 2002).

Hiperplasia Prostática Benigna

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é a anormalidade proliferativa da próstata mais comum e está relacionada com a idade (Silva Neto, Koff et al. 2008). As estimativas da HPB são imprecisas, pois os critérios de diagnóstico não são uniformes (Neuhouser, Kristal et al. 2004). A prevalência histológica de HPB é de aproximadamente 10% em homens com 30 anos, 20% em homens com 40 anos, entre 50 e 60% em homens com 60 anos e de 80 a 90% para homens com 70 e 80 anos (Roehrborn 2005), corroborando com estes dados, outros autores observaram que

aproximadamente 40 a 50% dos homens aos 50 anos de idade, 80% aos 70 anos e 90% dos homens aos 80 anos apresentam características histológicas de HPB (Platz, Smit et al. 2002; Carson and Rittmaster 2003).

O evento que inicia o desenvolvimento de HPB é desconhecido, mas é provável que os nódulos sejam o resultado de uma interação epitélio-estroma (Cunha 2008). A HPB é caracterizada, histologicamente, pelo crescimento excessivo do tecido glandular epitelial e do tecido estromal ao redor da uretra, com um crescimento nodular localizado na zona de transição ou periuretral (McNeal 1990; Carson and Rittmaster 2003), resultando em um processo proliferativo não maligno (Bushman 2009). Esse aumento da glândula prostática contribui para uma série de sintomas urinários, tais como, fluxo urinário fraco, hesitação durante a micção, esforço para iniciar a micção, noctúria e sensação de esvaziamento incompleto da bexiga após a micção. Estes sintomas podem afetar significativamente a qualidade de vida entre homens com mais idade (O'Leary MP 2008; Roehrborn 2011).

Uma das maneiras de se avaliar HPB é pelos níveis séricos do PSA, que é uma serina protease produzida pelo epitélio prostático. Níveis aumentados do PSA aparecem em homens com aumento benigno da glândula e com CaP. Em homens com aumento do volume prostático o PSA é elevado devido à proliferação do epitélio. Por outro lado, os indivíduos com CaP apresentam os níveis elevados de PSA, provavelmente, em razão da destruição tecidual, levando a liberação deste marcador para a circulação (Jacobsen, Girman et al. 2001).

Estudos sugerem que o desenvolvimento da HPB é dependente de androgênio, pois, uma vez desenvolvida a hiperplasia, esta pode ser suprimida pela terapia de privação de androgênio (Raz, Zeigler et al. 1973; Wang, Yin et al. 2007). Dados da literatura demonstram que o desenvolvimento da HPB depende da atividade da enzima

5-alfa redutase. Esta proteína é responsável pela conversão da testosterona em seu metabólito ativo, a diidrotestosterona (DHT) (Imperato-McGinley, Guerrero et al. 1974). 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, como exemplo, a finasterida (Silver RI 1994).

Androgênios

As ações fisiológicas dos androgênios são amplamente demonstradas na próstata humana, pela sua importância na morfogênese, na diferenciação, na proliferação celular e nas secreções da glândula prostática (Lee, Kozlowski et al. 1995; Nakano, Fukabori et al. 1999; Avances, Georget et al. 2001; Planz, Wang et al. 2001; Degraff, Aguiar et al. 2010; Lamont and Tindall 2010; Niu, Chang et al. 2010). Nos adultos, os androgênios promovem a sobrevivência das células epiteliais secretoras e de células transformadas que estão envolvidas no desenvolvimento do tumor (De Marzo, Nelson et al. 1998). Este hormônio exerce seus efeitos biológicos pela sua ligação com o receptor de androgênio (AR), um membro da superfamília de receptores nucleares que agem como fatores de transcrição dependente de ligante (Balk and Knudsen 2008).

Os efeitos dos androgênios são mediados pela testosterona e 5 α -dihidrotestosterona (DHT) nas células. Na próstata, a testosterona é convertida em DHT pela enzima 5 α -redutase (Heinlein and Chang 2004). Tanto a testosterona quanto DHT se ligam ao AR. Todavia, a DHT é mais ativa, porque possui maior afinidade de ligação ao AR, levando à formação de um complexo hormônio-receptor mais estável (Wright, Douglas et al. 1999). A ligação destes androgênios induz o AR a assumir uma conformação que conduz à ativação ou inibição da transcrição gênica. Esse fato permite a transmissão de sinais extracelulares em respostas intracelulares pela ativação de

elementos promotores responsivos (Gobinet, Poujol et al. 2002) podendo agir sobre os mecanismos de regulação da proliferação celular. Dados da literatura mostraram que o crescimento das células prostáticas é dependente da presença de androgênios, por isso, a terapia de privação androgênica tem sido um dos tratamentos de escolha para pacientes com CaP (Dutt and Gao 2009). O efeito androgênico foi 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).

Está bem descrito na literatura um efeito bifásico da ação androgênica sobre a proliferação de células prostáticas. Estudos *in vitro* utilizando linhagem celular tumoral responsiva ao androgênio, LNCaP, demonstraram que altas doses de androgênios inibem a proliferação celular enquanto baixas doses estimulam (Sonnenschein, Olea et al. 1989; Joly-Pharaboz, Soave et al. 1995; Lee, Sutkowski et al. 1995; Joly-Pharaboz, Ruffion et al. 2000). Este efeito dependente da dose também foi verificado em um estudo que utilizou células não transformadas, em um modelo de cultura primária de células epiteliais prostáticas humanas derivadas de hiperplasia prostática benigna. Neste modelo, a administração de baixas concentrações de testosterona, $2 \times 10^{-10} \text{M}$, 10^{-11}M , ou DHT 10^{-13}M estimulou significativamente a proliferação destas células, enquanto que uma alta concentração de DHT manteve a proliferação semelhante ao controle (Silva, Morsch et al. 2001; Brum, Morsch et al. 2003). Long e colaboradores demonstraram um aumento da proliferação em linhagem celular dependente de androgênio (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).

Experimentos com culturas de linhagens imortalizadas de células epiteliais prostáticas (PNT1A) e tumorais (DU-145) tratadas com o androgênio sintético (R1881) na concentração de 10^{-9} M demonstraram um aumento na atividade do AR em células PNT1A e 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 que após 2 horas de tratamento houve um aumento nos níveis da proteína do AR, com um pico em 6 horas de tratamento (Blanchere, Berthaut et al. 1998).

Além da ação clássica dos androgênios via seu receptor intracelular (AR), 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 clássicos, os quais incluem: alterações no citoesqueleto, ativação de cinases e alterações do cálcio intracelular (Kampa, Papakonstanti et al. 2002). 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).

A regulação do ciclo celular é mantida por dois processos: proliferação e apoptose. A apoptose é um dos principais mecanismos de morte celular em resposta as terapias contra o câncer (Danial and Korsmeyer 2004). A morte celular programada é um processo regulado geneticamente que necessita a expressão e ação de produtos de genes (Buttayan, Shabsigh et al. 1999) dentre eles estão os genes supressores de tumor como o *p53*, *p21* e da família *Bcl2*.

Bcl2 e Bax

A família Bcl2 apresenta vários genes relacionados, alguns com efeito anti-apoptótico (*Bcl2* e *Bclx_L*) e outros pró-apoptóticos (*Bax* e *Bclx_S*) (Hahm and Davidson 1998), sendo que a dimerização entre as moléculas anti-apoptóticas e as pró-apoptóticas mantém o equilíbrio entre a sobrevivência celular e a apoptose. O gene *Bcl2* codifica uma proteína de 26 KDa localizada na membrana mitocondrial, retículo endoplasmático e membrana nuclear (Morsi, Leers et al. 2000).

Bcl2 é anti-apoptótico e está envolvido em várias vias da carcinogênese prostática, podendo estar envolvido na inibição da apoptose e/ou na estimulação da angiogênese tumoral (Fernandez, Udagawa et al. 2001). Bcl2 é encontrado no epitélio basal da próstata e é muito estudado no câncer de próstata. O tratamento com privação de androgênio causa um aumento na expressão de Bcl2 na glândula prostática (McDonnell, Troncoso et al. 1992; Tsuji, Murakami et al. 1998; Paterson, Gleave et al. 1999; Zellweger, Ninck et al. 2003). Os estudos demonstram uma expressão aumentada de Bcl2 em mais de 30% dos casos de CaP, estando correlacionado com um estágio avançado da doença e pior prognóstico (Raffo, Perlman et al. 1995; Moul 1999; McCarty 2004). Níveis altos de expressão de Bcl2 foram observados em câncer de próstata primário, associados com um escore de Gleason alto e uma chance alta de recorrência do câncer após prostatectomia radical (Yoshino, Shiina et al. 2006).

A formação de dímeros, como por exemplo, heterodímeros *Bcl2/Bax* que atuam como proliferativos e homodímeros *Bax/Bax* que atuam como promotores da apoptose (Reed 2002; Catz and Johnson 2003), auxiliam no equilíbrio entre estas proteínas podendo direcionar a célula á vias de sinalização para a proliferação celular ou desencadear a apoptose.

Bax é uma proteína pró-apoptótica (Oltvai, Milliman et al. 1993; Li, Marani et al. 2001), a sua expressão é encontrada principalmente nas células epiteliais secretoras da próstata, mais vulneráveis a apoptose causada pela privação de androgênios (Krajewska, Krajewski et al. 1996). Estudos *in vivo* demonstraram que um aumento temporário da regulação de Bax induz a apoptose após a privação androgênica (Beham, Sarkiss et al. 1998). Em tumores independentes ao androgênio e que apresentam receptores de androgênio, foi observado a redução do crescimento do tumor via apoptose mediada por Bax após a reintrodução de androgênios neste tumor (Lin, Kokontis et al. 2006).

A via Bcl2/Bax, dada pela ativação do gene *Bax*, é mediadora da apoptose induzida por p53 (Selvankumaran M, Lin HK et al. 1994).

Um fator que pode favorecer o processo apoptótico é um aumento da expressão de Bax pela p53 e talvez por uma diminuição da expressão do Bcl2. Apakama e colaboradores mostraram que a detecção de p53 e Bcl2 é necessária para o crescimento de tumores independentes de androgênio (Apakama, Robinson et al. 1996). Basu e Haldar demonstraram que a expressão da proteína Bcl2 ficou limitada em apenas 25% dos adenocarcinomas prostáticos, parecendo ser mais freqüente em tumores avançados, ao contrário da proteína Bax que estava presente em todos os tipos de tumor de próstata, sem levar em conta o estágio da progressão (Basu and Haldar 1998).

Outra via que promove a apoptose é desencadeada pela proteína p53, uma proteína supressora de tumor que regula a transcrição de vários genes alvos envolvidos na apoptose, no controle do crescimento celular, senescência e angiogênese (Vogelstein, Lane et al. 2000; Vousden and Lu 2002).

p53 e MDM2

O gene *p53* é constituído de 11 exons e está localizado no cromossomo 17 na posição p13.1 e codifica uma fosfoproteína nuclear formada por 375 aminoácidos (Milner 1997). A forma ativa desta proteína (tipo selvagem) possui uma meia-vida muito curta (minutos) e sua função é interromper o ciclo celular na fase G1 na presença de um estresse celular para promover o reparo do DNA ou desencadear a apoptose (Stewart and Pietenpol 2001). A forma mutada desta proteína resulta na incapacidade de interromper o ciclo celular ou de desencadear a apoptose (Milner 1997).

Nas células normais, *p53* está expressa em concentrações baixas, mas quando ocorre um estresse celular como, por exemplo, um dano no DNA, pode promover um acúmulo de *p53* no núcleo (Oren 1999) causando o bloqueio do crescimento celular para permitir a reparação do dano, ou levar a apoptose. Essas respostas previnem a proliferação de células danificadas impedindo que as mutações passem para a próxima geração (Vousden and Lu 2002). Dependendo do tipo da célula e do estresse celular causando a ativação de *p53* pode levar a várias respostas (Figura 2).

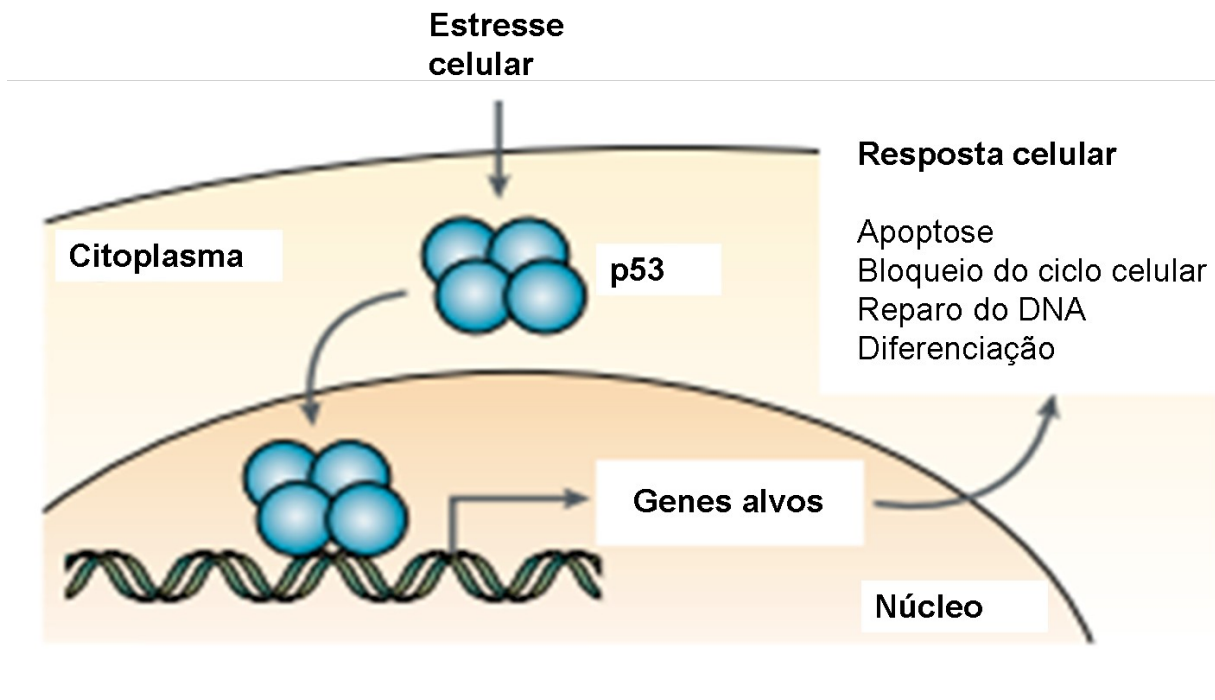


Figura 2: Respostas mediadas por p53. Adaptação (Chene 2003).

O *p53* é um dos genes que mais sofrem mutação em cânceres humanos. Cerca de 50% dos cânceres contém mutações no *p53*, enquanto que os outros 50% podem apresentar alterações nos componentes da via *p53* (Soussi and Beroud 2001). Alguns estudos observaram a existência de uma maior incidência de mutações no *p53* em câncer de próstata avançado (Bookstein, MacGrogan et al. 1993; Eastham, Stapleton et al. 1995; Osman, Drobnjak et al. 1999). Por isso, mutações no gene *p53* geralmente estão associadas com uma progressão tardia do câncer de próstata e também com a independência androgênica e metástases. Um aumento nos níveis de p53 mutado foi encontrado em tecido prostático normal, neoplasia intraepitelial benigna e hiperplasia prostática benigna (Downing, Russell et al. 2003). Em muitos tumores, p53 está presente em sua forma selvagem, oferecendo a possibilidade de estimular a sua atividade supressora de tumor para erradicar o tumor. A participação de p53 no tratamento eficaz do câncer é demonstrada pelo fato de que a radioterapia induz

proteínas que reconhecem o dano e transmitem essa informação para a p53 que, por sua vez, induz a morte celular (Komarova and Gudkov 2000).

Além de desempenhar um papel importante no bloqueio do ciclo celular e na apoptose, p53 também tem sido implicada na regulação do AR (Cronauer, Schulz et al. 2004). Porém, os mecanismos pelos quais p53 exerce seu controle sobre o AR ainda são desconhecidos. Estudos mostram que uma expressão aumentada da p53 está associada com a redução da função do androgênio aparentemente pela redução na expressão de genes dependentes de androgênio (Shenk, Fisher et al. 2001; Nesslinger, Shi et al. 2003). Isso ainda é controverso, estudo observou que níveis fisiológicos de p53 podem agir para proteger a sinalização androgênica (Cronauer, Schulz et al. 2004).

Em células não estressadas, a p53 se mantém inativa e em concentrações muito baixas em consequência de uma interação com a proteína MDM2 (*Mouse Double Minute 2*) (Tao and Levine 1999).

MDM2 é uma oncoproteína codificada por um gene localizado no cromossomo 12q13-14 (Momand and Zambetti 1997) e é transcricionalmente ativada por p53 (Barak, Juven et al. 1993). A proteína p53 estimula a expressão da proteína MDM2, que por sua vez inibe a p53. MDM2 age inibindo a ação de p53 de maneiras diferentes: a) ligando-se ao seu domínio de transativação e inibindo a sua atividade transcricional (Momand, Zambetti et al. 1992); b) atuando como uma ubiquitina ligase, em que MDM2 promove a degradação da p53 pelo proteossoma (Fang, Jensen et al. 2000; Honda and Yasuda 2000) e c) a ligação de MDM2 com p53 favorece a exportação de p53 do núcleo (Roth, Dobbstein et al. 1998).

Em condições celulares normais, p53 é constantemente degradado pelo MDM2 (Kubbutat, Jones et al. 1997), esse evento é controlado por uma alça de feedback autorregulatória (Wu, Bayle et al. 1993; Bond, Hu et al. 2005; Kruse and Gu 2009). O

resultado do bom funcionamento desta autorregulação é manter baixos os níveis de p53 e MDM2 dentro da célula. Em resposta a um estresse celular, os níveis celulares de p53 aumentam levando a ativação de vários genes alvos e a via de p53 com suas principais funções: parada do ciclo celular e apoptose (Vogelstein, Lane et al. 2000; Harris and Levine 2005).

A expressão aumentada da proteína MDM2 parece ter consequências negativas para a célula, pois diminui a sua capacidade de ativar a via da p53 nas condições de estresse celular. Vários estudos demonstraram um aumento na expressão de MDM2 em câncer de próstata humano (Ittmann, Wiczorek et al. 1994; Gao, Porter et al. 1997; Osman, Drobnjak et al. 1999; Leite, Franco et al. 2001). Essa expressão também foi associada com o desenvolvimento de doença hormônio-refratário (Agus, Cordon-Cardo et al. 1999). A expressão aumentada de MDM2 nestes tumores pode ser um fator importante para a sobrevivência do tumor, pois diminui a ativação de p53.

Leite e colaboradores demonstraram que a expressão aumentada de MDM2 desempenha um papel na carcinogênese prostática sendo frequentemente detectada e associada com a proliferação celular e com o aumento de volume tumoral, propondo que um fenótipo MDM2-positivo/p53-positivo identifica um câncer de próstata com um comportamento agressivo (Leite, Franco et al. 2001).

Desde a descoberta da proteína p53 como uma sequência específica de fator de transcrição, têm sido identificados muitos genes e vias reguladas por esta proteína. A interrupção do crescimento celular mediado por p53 resulta da transativação de p21 dependente de p53 (el-Deiry, Tokino et al. 1993).

p21

O gene *p21* codifica uma cinase inibidora dependente de ciclina (CdkI) que atua na regulação do ciclo celular. A proteína codificada (21 KDa) se liga nos complexos ciclina-Cdk2 ou -Cdk4 inibindo a atividade destes complexos, funcionando como um regulador da progressão do ciclo celular em G1, promovendo a interrupção da síntese de DNA e levando à parada do ciclo celular. Esta proteína pode desempenhar um papel regulatório na fase S da duplicação celular e no reparo do DNA (Gompel, Levy et al. 2001).

O gene *p21* apresenta sítios de ligação para p53, indicando que a transcrição do *p21* é diretamente regulada por p53 (Lee, Reynisdottir et al. 1995). Em resposta a um dano no DNA, p53 induz a expressão do p21 que interrompe o avanço do ciclo celular na transição da fase G1 para a fase S por inibição das Cdks (el-Deiry, Tokino et al. 1993; el-Deiry, Harper et al. 1994; Loewer, Batchelor et al. 2010). Pesquisadores, com dados *in vitro*, sugerem que p21 modula a apoptose induzida por p53, bem como a sobrevivência celular no câncer de próstata após a exposição a agentes prejudiciais ao DNA e a privação do fator de crescimento (Martinez 2000).

O inibidor de Cdk p21 é freqüentemente responsável pela indução da interrupção do ciclo celular de forma dependente ou independente de p53 (Somasundaram, Zhang et al. 1997). A interrupção do ciclo celular permite que as células reparem seus danos e então continuem a divisão celular. Por um lado, a função de p21 como inibidora da proliferação celular pode contribuir para a habilidade do *p21* atuar como gene supressor de tumor. Por outro lado, a capacidade de p21 para induzir a parada do ciclo celular após estresse pode proteger as células da apoptose induzida pelo estresse. A atividade anti-apoptótica do p21 pode contribuir para que ele atue como oncogene. Isto confere ao

p21 duas ações antagônicas em que ele frequentemente inibe a apoptose (pró-câncer) ao contrário de seus efeitos anti-proliferativos (anti-câncer) (Gartel and Tyner 2002).

As alterações mais comuns encontradas em câncer humano são a inativação ou mutação em um gene supressor de tumor, como *p53*, e uma redução dos níveis do *p21* (Ostrakhovitch and Cherian 2004). Foi demonstrado que a expressão de *p21* está associada com a presença de metástases e, provavelmente, com grande instabilidade genética (Ceccarelli, Santini et al. 2001). Nas células prostáticas, a expressão de *p21* pode ser aumentada pela ação direta de *p53* (Macleod, Sherry et al. 1995), dos androgênios (Lu, Liu et al. 1999; Ling, Chan et al. 2001) e também pode ser desencadeada por fatores de crescimento (Robson, Gnanapragasam et al. 1999). Estudos sugerem que *p21* está envolvida no desenvolvimento normal da próstata e pode ser regulada por androgênios (Lu, Liu et al. 1999; Waltregny, Leav et al. 2001). A expressão de *p21* ocorre em câncer de próstata e tem sido associada com o resultado clínico desses tumores (Matsushima, Sasaki et al. 1998; Aaltomaa, Lipponen et al. 1999; Cheng, Lloyd et al. 2000; Fizazi K. 2000; Omar, Behloui et al. 2001) sugerindo que *p21* possa ser um importante regulador do ciclo celular envolvido na carcinogênese e na progressão do câncer de próstata.

O surgimento e progressão, tanto do CaP quanto da HPB, geralmente é o resultado de um aumento da proliferação celular associado com a inibição da apoptose. Estudos em amostras de tecido prostático, desenvolvido a partir de técnicas avançadas de biologia molecular, poderão esclarecer melhor as interações entre os fatores que regulam a proliferação celular, diferenciação e a apoptose. Sabe-se que os androgênios possuem um papel importante no desenvolvimento, na manutenção e na regulação da glândula prostática. Muitos pesquisadores buscam esclarecer o papel dos androgênios no desenvolvimento de HPB e de CaP em estudos de cultura primária de células

prostáticas. Este modelo permite o desenvolvimento de um micro ambiente mais próximo do processo que ocorre com a glândula prostática durante a senescência. O estudo dos diferentes mecanismos envolvidos na regulação da proliferação e/ou diferenciação celular, assim como a identificação de genótipos de maior risco para o desenvolvimento das alterações prostáticas, poderão auxiliar no desenvolvimento de medidas de prevenção e diagnósticos precoces para HPB e CaP.

Mudanças na expressão dos genes envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação celular resultam na codificação alterada de proteínas, assim como diferentes concentrações de androgênios podem estar envolvidas no desenvolvimento precoce da HPB e/ou estar relacionadas com uma maior incidência e uma maior malignidade do CaP.

HIPÓTESE

A proliferação das células prostáticas epiteliais e estromais pode ser influenciada pela ação dos androgênios, bem como a alteração da expressão de genes envolvidos na regulação da proliferação celular.

A mudança no padrão da expressão gênica de genes envolvidos na regulação do ciclo celular pode estar envolvida no desenvolvimento precoce da HPB e/ou do carcinoma de próstata.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a expressão do mRNA de genes alvo de androgênios em tecido proveniente de hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata assim como sua possível modulação pelos androgênios em um modelo de cultura primária de células prostáticas.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a proliferação celular em cultura primária de células prostáticas tratadas com diferentes concentrações de DHT;
2. Verificar a expressão do mRNA do *Bcl2*, *Bax*, *p53*, *MDM2* e *p21* em cultura primária de células prostáticas tratadas com diferentes concentrações de DHT;
3. Determinar os níveis do mRNA do *Bcl2*, *Bax*, *p53*, *MDM2* e *p21* em tecido proveniente de HPB e CaP;
4. Avaliar o envolvimento dos genes estudados no risco relativo de desenvolver CaP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do Estudo

O estudo da cultura celular tratou-se de um estudo experimental e o estudo do tecido prostático tratou-se de um estudo transversal.

Crítérios de Inclusão

CaP: Foram incluídos neste estudo pacientes provenientes do ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com diagnóstico de câncer de próstata, que não tenham recebido hormonioterapia ou quimioterapia e que não possuam diagnóstico de outra neoplasia concomitante e pacientes submetidos à cirurgia para CaP no HCPA.

HPB: pacientes com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna, com volume prostático medido por ecografia abdominal acima de 30g, toque retal sem suspeita de neoplasia maligna, que não estejam em tratamento com inibidores da 5 α -redutase e que não possuam diagnóstico de neoplasia concomitante, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do HCPA. Diagnóstico de HPB comprovado pelo exame anatomopatológico do espécime cirúrgico.

Os pacientes envolvidos neste estudo foram consultados e autorizaram a utilização do material para este estudo (Anexo 1).

Obtenção das amostras de tecido prostático

Para a coleta do tecido prostático todos os pacientes foram consultados e autorizaram a utilização do material para este estudo. Os objetivos da pesquisa foram explicados e foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

As amostras de tecido prostático para o grupo CaP foram coletadas de pacientes submetidos à prostatectomia radical ou prostatovesiculectomia no momento transoperatório, sob condições estéreis, por um médico da equipe do Serviço de Urologia. Em um campo limpo, o material coletado foi pintado com nankin e foram realizados cortes transversais com o cuidado de que todos os cortes não atingissem a base, deixando-os unidos por esta. Os nódulos tumorais foram localizados com o auxílio da imagem da ecografia abdominal e por análise macroscópica. Um fragmento do nódulo com tumor foi retirado e seccionado em dois novos fragmentos, no qual um fragmento foi encaminhado para o exame anatomopatológico e o outro foi armazenado para esta pesquisa. O fragmento para a pesquisa foi acondicionado em um criotubo e imediatamente imerso em nitrogênio líquido. O material foi transportado para o Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral do departamento de Fisiologia da UFRGS e armazenado a -80°C.

As amostras de tecido prostático para o grupo HPB foram coletadas de pacientes submetidos à prostatectomia ou ressecção transuretral sob as mesmas condições citadas acima. Nas cirurgias de prostatectomia, os fragmentos de tecido hiperplásico foram retirados pelo urologista e acondicionados em dois criotubos. Para as amostras coletadas de pacientes submetidos à ressecção transuretral os fragmentos retirados com o cautério foram depositados em uma peneira, coletados com uma pinça e também acondicionados em dois criotubos. As amostras coletadas em ambos os procedimentos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e transportados ao laboratório.

Cultura primária de células

Obtenção do tecido prostático

Para realização das culturas primárias a população em estudo envolveu pacientes com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna, submetidos à prostatectomia. No dia da cirurgia foi coletado o tecido no período transoperatório, sob condições estéreis. Parte do tecido hiperplásico foi coletada e o restante enviado para o exame anatomopatológico para confirmação do diagnóstico de HPB. Os fragmentos, foram acondicionados em frasco estéril contendo solução salina com sais de Hank's (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) ou 0,5 mg/mL de kanamicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) 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's, transferido para um frasco de vidro pesado previamente e determinado o peso do tecido. Após a pesagem, adicionava-se a este frasco solução de Hank's e o tecido era armazenado a 4°C por 12 a 24 horas para posterior dissociação.

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

Após a dissociação enzimática, a ação da colagenase era inibida pela adição de igual volume de solução de Hank's. Esta suspensão celular era vertida em filtros de nylon de 250 e 150 μm (Polylabo, Strasbourg, France) para reter porções de tecido não digeridas. O filtrado era centrifugado a 370xg durante 10 minutos, e o precipitado ressuspendido em solução de Hank's. As células epiteliais eram separadas das células estromais em filtro de nylon de 40 μm (Cell Stainer, USA). O filtro contendo as células epiteliais era lavado em solução de Hank's duas vezes e esta solução centrifugada novamente durante 10 minutos a 370xg. As células foram novamente ressuspendidas em meio de DMEN (Meio Eagle modificado por Dulbecco) (LCG Biotecnologia, Brasil) suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL, NY, EUA) para serem semeadas em placas de cultura. O filtrado contendo as células estromais foi centrifugado novamente durante 10 minutos a 370xg e as células ressuspendidas em meio DMEN e suplementadas com 10% de SBF para serem semeadas em placas de cultura.

As células em suspensão, tanto as epiteliais quanto as estromais, foram submetidas a um teste de viabilidade antes do plaqueamento, pela coloração com azul de Tripán, contagem no hemocitômetro observado em microscópio invertido (CKX 41 Olympus, Japão). Em seguida, as células foram distribuídas em placas de plástico estéreis do tipo *multiwell* 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 total. As células foram incubadas em estufa (Revco Elite TM II, USA) a 37°C com 5% CO₂.

Manutenção das células em cultura

As células em cultura eram observadas a cada 48 horas em microscópio invertido (CKX 41 Olympus, Japão), 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.

Tratamento hormonal

Respeitando o período de adesão e estabilidade celular, os grupos referentes ao tratamento foram divididos em subgrupos no 3º dia após a semeadura e tratados com diferentes doses de diidrotestosterona (DHT) e com o antiandrogênio hidroxiflutamida (OH-FLU): grupo controle [meio DMEM suplementado com 5% de SBF desteroideado SBF-DT)], grupo DHT 10^{-8} M, grupo DHT 10^{-13} M, grupo OH-FLU 10^{-6} M, grupo DHT 10^{-8} M associado com OH-FLU 10^{-6} M e o grupo DHT 10^{-13} M associado com OH-FLU 10^{-6} M. A diidrotestosterona e a hidroxiflutamida foram dissolvidas em etanol absoluto nas concentrações DHT 10^{-5} M e DHT 10^{-10} M, OH-FLU 10^{-3} M. Nos dias de tratamento, foi acrescentado 1 μ L/mL de DHT e 1 μ L/mL de OH-FLU para cada mL de meio de cultivo acrescido de 5% de SBF desteroideado. No grupo controle foi acrescentado 1 μ L/mL de etanol absoluto (Silva, Morsch et al. 2001).

Avaliação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pela técnica do MTT (dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann 1983) adaptado para este modelo de cultura. As células epiteliais, provenientes de 4 pacientes, foram distribuídas em placas *multiwells* de 96 poços numa densidade de 1×10^3 células/100 μ L de meio de cultura, as células estromais, provenientes de 7 pacientes, foram distribuídas em placas *multiwells* de 24 poços numa densidade de 1×10^4 células/100 μ L de meio de cultura sendo incubadas com 100 μ L de meio com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina. Após 48h, considerado o dia zero, as células foram divididas em grupos para o tratamento hormonal (Figura 3) e cada grupo foi feito em quintuplicata (foram semeados 5 poços das placas de cultura para cada grupo de tratamento para as células epiteliais e estromais). No 3º dia de tratamento foram retirados 10 μ L de meio de cultura e adicionados 10 μ L de uma solução de 5 mg/mL de MTT diluído em PBS (tampão salina-fosfato) pH 7,2, seguindo-se uma incubação a 37°C por 4 horas. Após a incubação, todo o meio da placa foi aspirado e adicionou-se 100 μ L de DMSO (dimetyl sulfoxide) (Sigma, St Louis, MO, EUA) por poço, o qual reage com o MTT formando uma solução de coloração violeta, que tem sua densidade óptica medida em uma leitora de ELISA no comprimento de onda de 540 nm.

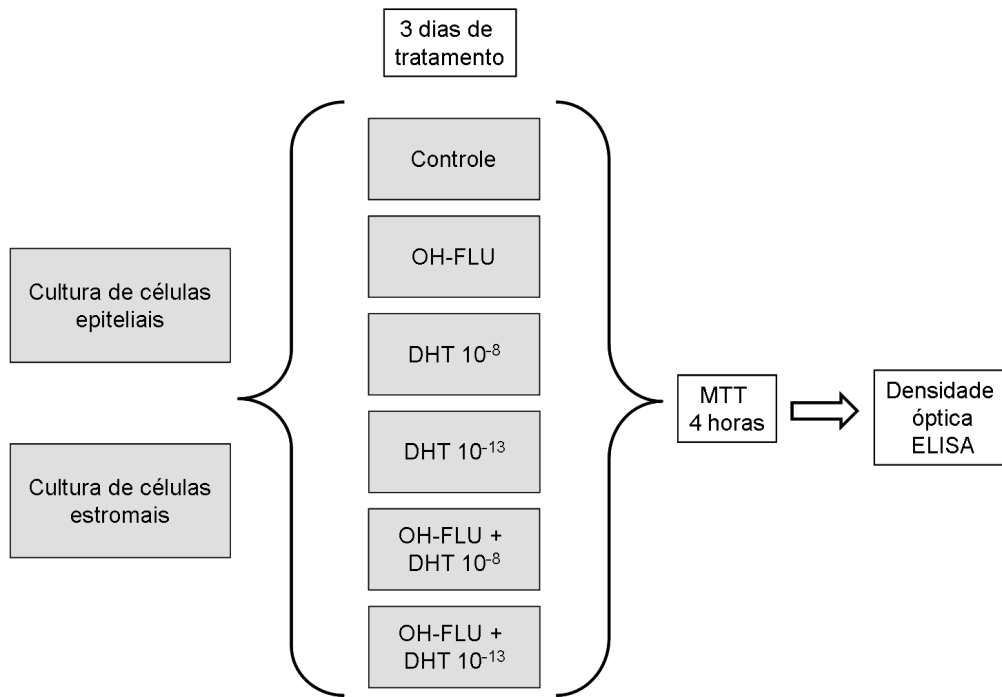


Figura 3. Fluxograma I. Fluxograma dos grupos de tratamento das culturas de células prostáticas para avaliação da proliferação celular.

Análise da expressão gênica

As células epiteliais ($n=3$) e estromais ($n=5$) receberam os tratamentos hormonais durante 4 horas. O RNA total das culturas de células prostáticas foi extraído lisando as células diretamente nas placas com 1 mL do reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. O RNA total dos fragmentos de tecido com HPB e CaP também foi extraído com o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação foi feita a partir de 1 μ L da solução de RNA das amostras diluído em água com DEPC (dietilpirocarbonato) e lidas em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, EUA), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm foi superior

a 1,6, e a quantidade de RNA foi calculada a partir da absorbância a 260 nm ($[RNA] = A_{260} \times \text{diluição} \times 40 \mu\text{g/mL}$).

A avaliação da expressão do mRNA dos fatores em estudo foi realizada a partir da técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa (qRT-PCR). A técnica consiste de duas etapas, sendo a primeira a transcrição reversa do RNA mensageiro a DNA complementar (cDNA), e a segunda a amplificação de cDNA pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Figura 4 e figura 5).

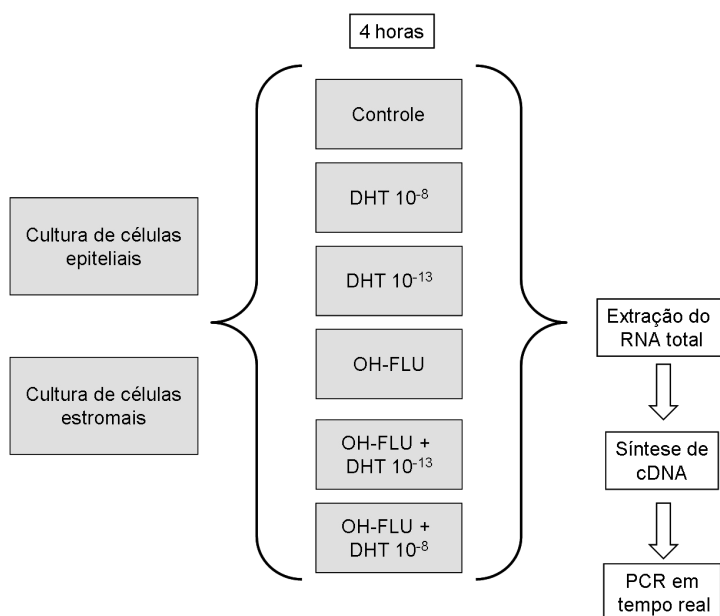


Figura 4. Fluxograma II. Fluxograma dos grupos de tratamento das culturas de células prostáticas para avaliação da expressão gênica.

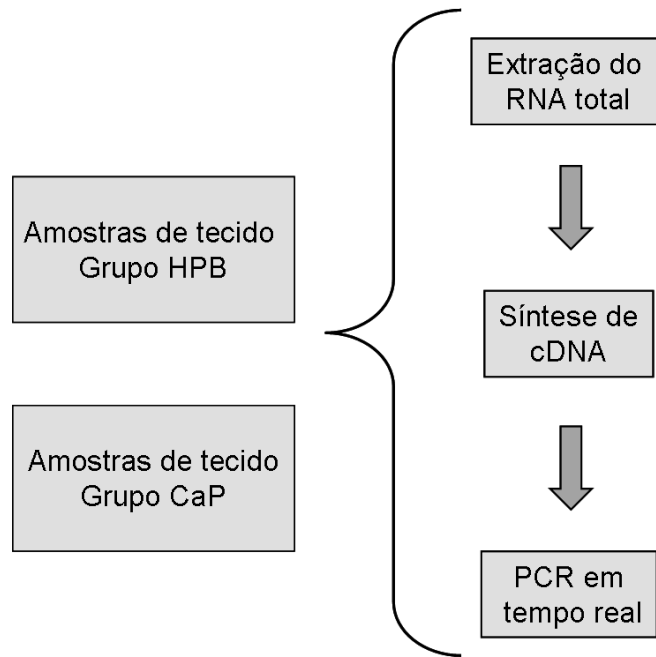


Figura 5. Fluxograma III. Fluxograma para avaliação da expressão gênica de tecido prostático.

Síntese de cDNA

A síntese do cDNA (DNA complementar) foi feita a partir de 1 µg de RNA total, com o kit *SuperScript First-Strand Synthesis System* (Invitrogen), utilizando um oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do mRNA, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Antes de proceder à transcrição reversa, o RNA foi tratado com a enzima DNase I (Invitrogen, EUA), para degradar qualquer DNA contaminante na amostra. Um µg do RNA total foi incubado com 1U da enzima por 15 minutos a temperatura ambiente e depois a atividade da enzima foi inativada pela adição de EDTA 25 mM, incubando-se a 65°C por 10 minutos. Em seguida, procedeu-se à síntese do DNA complementar.

O RNA foi desnaturado a 65°C por 5 min com o *primer Oligo(DT)*¹²⁻¹⁸ e os desoxirribonucleotídeos (dNTPs). Em seguida foi adicionada uma mistura contendo tampão Tris-HCl 200 mM pH 8,4 com KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, DTT 0,1M e 40 unidades (U) da enzima RNase OUT, e incubado por 2 min a 42°C. Após, foram adicionadas 50U da enzima transcriptase reversa, incubando-se a 42°C por 50 min. Após nova desnaturação a 70°C por 15 min para inibir a atividade enzimática, a mistura foi incubada com 2U da enzima RNase H de *E. coli* por 20 min a 37°C para degradar o RNA presente no tubo. A reação totalizou um volume de 21 µL, que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

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), que se liga à fita dupla de DNA com um aumento

de 800 a 1000 vezes na fluorescência. O reagente utilizado nas amplificações foi o *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen).

Como o corante *SYBR Green* liga-se a qualquer fita dupla de DNA, foram realizadas as chamadas curvas de desnaturação ou dissociação (*melting-Tm*), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso se pode se testar a especificidade do produto amplificado, uma vez que a *Tm* é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado apresentam picos de desnaturação mais baixos.

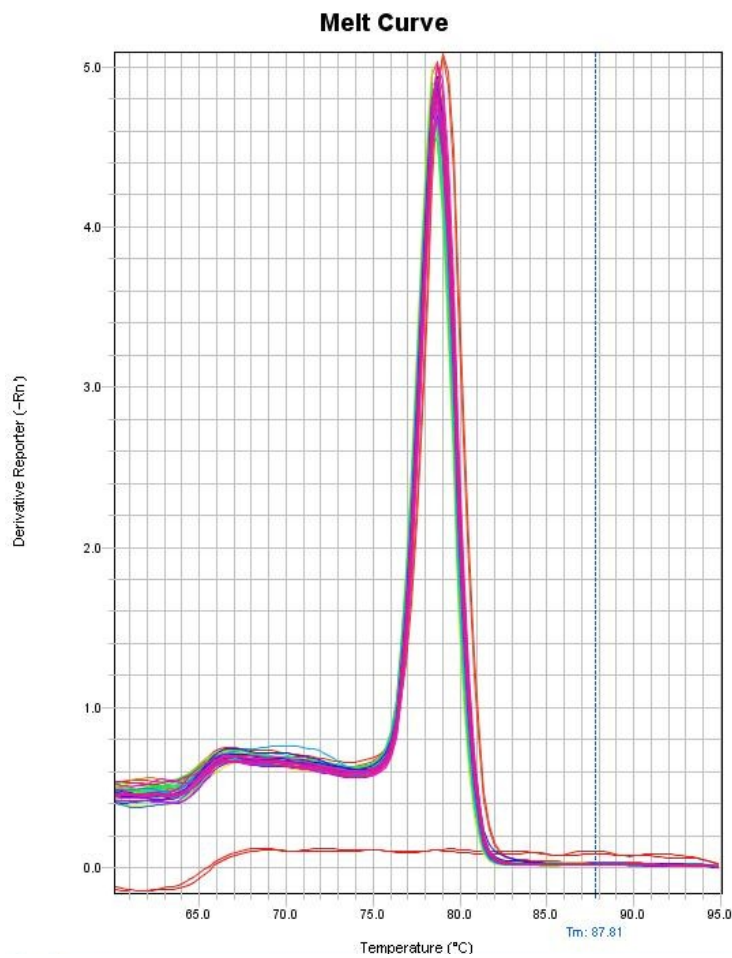


Figura 6: Curva de *melting* do gene *BMG*. Representação da curva de *melting* do gene *BMG* pela PCR em tempo real. O pico em 79°C é específico para o gene.

Curva Padrão

Para cada gene em estudo foi realizada uma curva padrão, pela qual foram calculados os valores (em ng) das amostras. A curva padrão foi obtida através de reações de RT-PCR feitas a partir de diluições seriadas de cDNA de tecido prostático (de 0,0004 ng a 4 ng). Cada diluição do cDNA foi feita em duplicata, juntamente com as amostras. As diluições foram escolhidas dentro de uma faixa que incluía o valor esperado para o mRNA nas amostras. O ciclo limiar (C_T) é definido no momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência, que é inversamente proporcional ao logaritmo (log) da quantidade de cDNA (ng) (Higuchi, Fockler et al. 1993). Portanto, a curva de padronização é gerada plotando-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 cDNA.

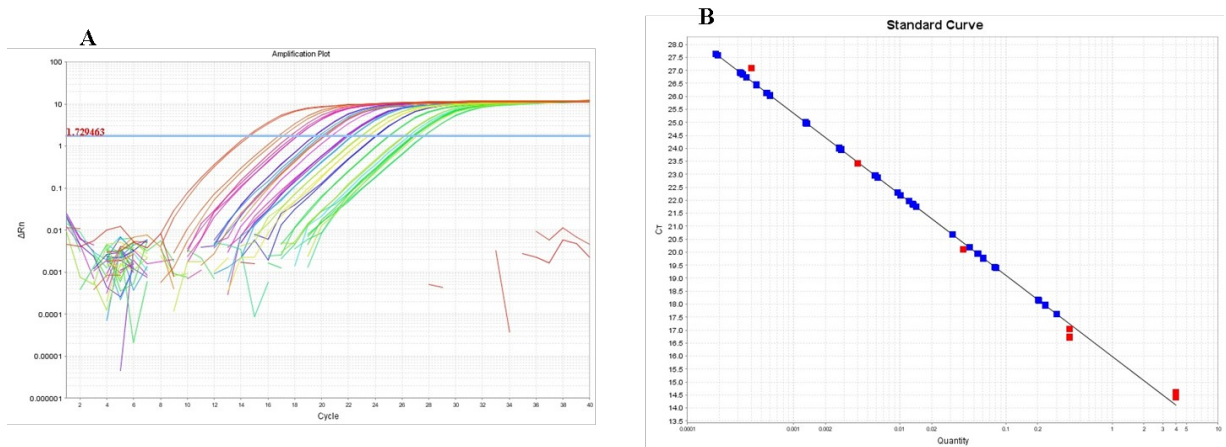


Figura 7: Amplificação e curva de diluição para o gene *BMG*. **A.** Representação da amplificação do gene *BMG* pela PCR em tempo real. **B.** Representação da curva de diluição para o gene *BMG* para a quantidade de 4; 0,4; 0,04; 0,004 e 0,0004 ng de RNAm

Normalização

A normalização por gene de referência é um método simples para controle interno de erros na PCR em tempo real (Huggett, Dheda et al. 2005). Para ser usado como referência, um gene deve apresentar estabilidade, expressão não regulada no tipo de amostra analisado, não sofrer variações sob diferentes condições de tratamento experimental e deve ter seu nível de expressão semelhante aos níveis de transcritos dos genes em estudo (Bustin 2002).

O gene de referência é amplificado da mesma forma que o gene de interesse (curva padrão de 0,0004 a 4 ng de cDNA). Em cada reação realizada para a amplificação do gene de interesse foi feita a amplificação do gene normalizador escolhido, sendo os resultados expressos como a relação gene de interesse/gene normalizador, em unidades arbitrárias.

Protocolo geral da RT-PCR em tempo real

As condições da reação de PCR para cada gene foram padronizadas, antes de proceder-se à quantificação das amostras. Foram testadas a concentração dos oligonucleotídeos e a diluição das amostras. O laboratório dispunha de *primers* para análise da expressão gênica do β 2-microglobulina, desenhado pelo programa Primer 3 (Rozen and Skaletsky 2000) e sintetizados pela Invitrogen. Os oligonucleotídeos iniciadores para avaliar a expressão gênica de *Bcl2*, *Bax*, *p53*, *MDM2* e *p21* foram desenhados utilizando a ferramenta *PrimeTime qPCR Assay Entry* (IDT, Integrated DNA Technologies), disponível on-line (<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>), e sintetizados pela IDT. As sequências dos oligonucleotídeos estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Sequencias dos oligonucleotídeos. Sequencias dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do mRNA dos genes e tamanho do fragmento amplificado

Oligo	Fita	Sequência (5' – 3')	Fragmento (pb)
Bax	Forward	GACATGTTTTCTGACGGCAAC	137
	Reverse	AAGTCCAATGTCCAGCCC	
Bcl2	Forward	GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA	304
	Reverse	AGGCACCCAGGGTGATGCAA	
BMG	Forward	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	165
	Reverse	ACAAGTCTGAATGCTCCACT	
MDM2	Forward	GATCCTGAAATTTCTTAGCTGAC	144
	Reverse	GATTTCCCCTTTATCTTTCCCTTTATC	
p21	Forward	TGTCACTGTCTTGTACCCTTG	517
	Reverse	GGCGTTTGGAGTGGTAGAA	
p53	Forward	GTACCACCATCCACTACAACACTAC	141
	Reverse	CACAAACACGCACCTCAAAG	

As reações foram realizadas adicionando-se, para cada amostra, 6,25 µL da mix, 0,15 µL da solução de uso de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 µL do corante referência ROX (0,25 µM), 1 µL da amostra e 3,95 µL de água, totalizando um volume final de 12,5 µL. As amostras foram amplificadas no equipamento *Step One Plus* (Applied Biosystems, EUA).

As leituras de fluorescência emitidas por cada amostra nas reações foram feitas ao final de cada ciclo. As reações foram realizadas com 40 ciclos, mas a quantificação das amostras foi realizada durante o início do aumento exponencial da fluorescência (C_T limiar), conforme descrito anteriormente.

Disposição Final de Resíduos e Biossegurança

Após os experimentos, restos de tecidos foram acondicionados em sacos brancos, lacrados e identificados com o rótulo de lixo biológico de tamanho adequado com todas as informações requeridas. Meios de cultura celulares e células, tudo em garrafas de poliestireno, foram embalados em sacos apropriados, autoclavados, etiquetados como Lixo Biológico e entregues, também, ao serviço de coleta competente licitado pela UFRGS. Resíduos de fenol foram tratados como Lixo Químico, que foi coletado pelo serviço de coleta sediado no Instituto de Química da UFRGS.

Análise estatística

Os dados de expressão gênica das células prostáticas epiteliais de p53, p21 e Bcl2 apresentaram distribuição normal e foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA de uma via) seguido de pos-hoc de Tukey. Os dados de expressão gênica das células prostáticas epiteliais de MDM2 e Bax não apresentaram distribuição normal e foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis.

Os dados de expressão gênica de todos os genes analisados nas células prostáticas estromais não apresentaram distribuição normal e foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis.

Os dados de expressão gênica de todos os genes analisados nas amostras de tecido prostático não apresentaram distribuição normal e foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney. Foi realizado o teste Qui-quadrado para o cálculo do risco relativo (OD – odds ratio).

Foi considerado o nível de significância quando $P < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando-se o processador de dados SPSS 20 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Cálculo Tamanho da Amostra

O tamanho da amostra para a análise da expressão gênica foi calculado através do programa PEPI 3, utilizando-se dados de estudos prévios realizados pelo nosso laboratório (Brum e cols. 2003). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90% e diferença entre as médias de 0,1, chegando-se a um n de 25 pacientes por grupo.

Considerações Éticas

O tecido prostático utilizado foi proveniente de material de descarte de pacientes submetidos à cirurgia de prostatectomia. Uma vez que se trata de informações genéticas específicas, foi garantido aos pacientes o sigilo em relação às informações obtidas e uso absolutamente restrito para fins de pesquisa científica.

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS) para avaliação de seus aspectos científicos e éticos, tendo sido aprovado, sob o número 07-534.

Locais de Realização do Projeto

Este estudo foi realizado em diferentes locais, os quais dispunham da infraestrutura adequada para cada técnica realizada. As culturas celulares foram realizadas na Sala de Cultivo da Unidade de Análise Molecular e de Proteínas, lotada no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. No Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET), instalado no Departamento de Fisiologia, UFRGS, foram executados os procedimentos de análise de expressão gênica. No Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular (LaGOM),

também instalado no Centro de Pesquisa no HCPA foram realizados os experimentos de análise protéica.

Fontes de Financiamento

Este projeto foi executado com recursos provenientes do CNPq (Edital Universal - processo nº 474847/2008-0 e taxa de bancada de bolsa de doutorado), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto 07-534) e da CAPES (Programa de Fomento à Pós-Graduação – PROF).

RESULTADOS

O presente trabalho terá seus resultados divididos em dois capítulos:

1. Avaliação da proliferação celular em cultura primária de células prostáticas tratadas com diferentes concentrações de DHT e análise da expressão gênica de Bcl2, Bax, p53, MDM2 e p21 em cultura primária de células prostáticas tratadas com diferentes concentrações de DHT.

2. Expressão gênica de Bcl2, Bax, p53, MDM2 e p21 em tecido proveniente de HPB e CaP e análise da razão de chance de ter CaP.

CAPÍTULO 1

Avaliação da proliferação celular em cultura primária de células prostáticas tratadas com diferentes concentrações de DHT e análise da expressão gênica de Bcl2, Bax, p53, MDM2 e p21 em cultura primária de células prostáticas tratadas com diferentes concentrações de DHT

Para respeitar o período de adesão e estabilidade celular o tratamento com DHT foi iniciado 48 horas após a semeadura das células prostáticas. As concentrações de DHT (10^{-8}M e 10^{-13}M) foram administradas isoladas ou associadas ao antiandrogênio sintético hidroxiflutamida (OH-FLU) na concentração de 10^{-6}M para verificar o mecanismo de ação androgênica sobre a proliferação das células epiteliais e estromais. O antiandrogênio OH-FLU se liga ao receptor de androgênios impedindo a ligação do hormônio. Foi possível observar que as células prostáticas epiteliais mantiveram-se viáveis durante o tempo de cultura (Figura 8).

Para avaliar a proliferação celular, das células epiteliais e estromais, com um n limitado foi realizado uma análise descritiva.

No 3º dia de cultura o grupo de células epiteliais tratadas com DHT 10^{-13}M mostrou um aumento de 33% na proliferação em relação ao grupo controle, já os grupos tratados com DHT 10^{-8}M e OH-FLU 10^{-6}M isolada o aumento foi de 24% e 31% (respectivamente) quando comparado com o grupo controle. O grupo tratado com DHT 10^{-13}M associada à OH-FLU 10^{-6}M mostrou um aumento de 25% na proliferação em relação ao grupo controle e o grupo DHT 10^{-8}M associado à OH-FLU 10^{-6}M mostrou um aumento de 21% na proliferação quando comparado ao grupo controle (Figura 8.1).

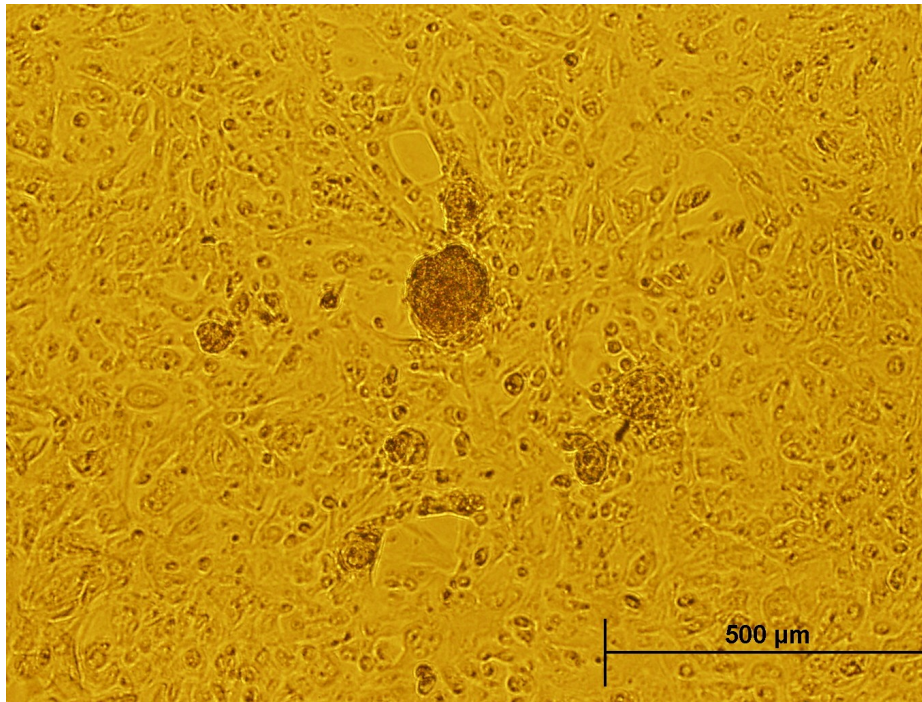


Figura 8. Células epiteliais prostáticas. Cultura de células epiteliais prostáticas para avaliação da proliferação celular (aumento de 200x).

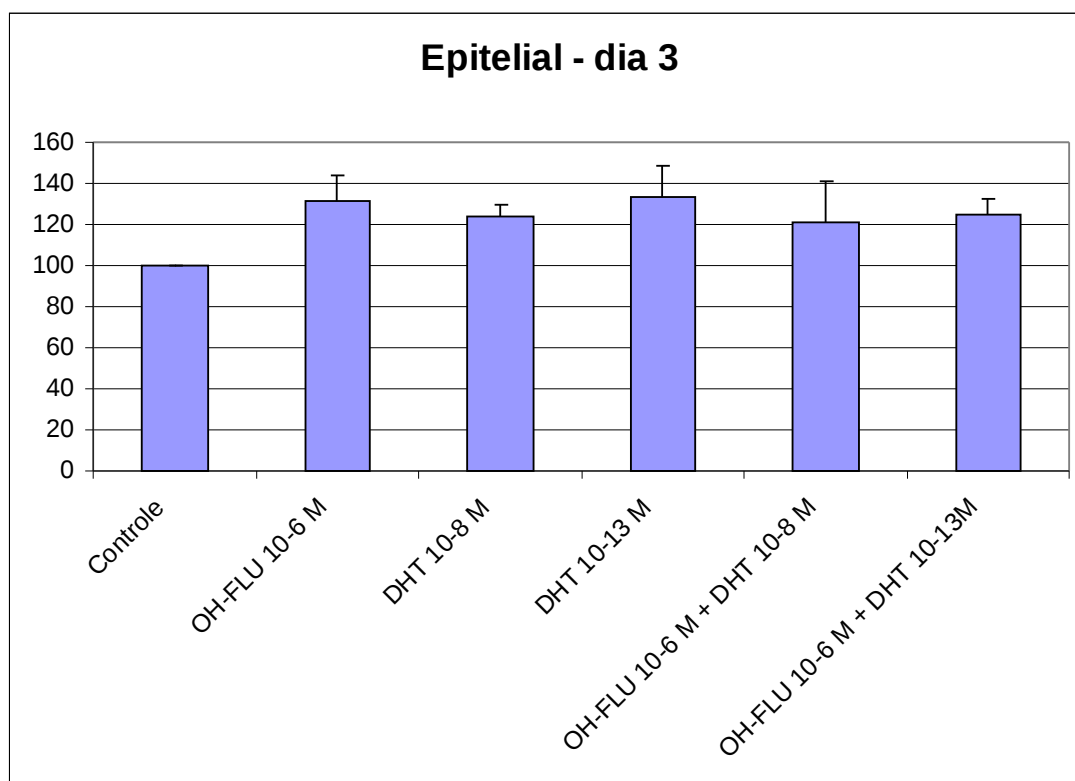


Figura 8.1. Proliferação de células epiteliais. As células epiteliais prostáticas foram incubadas em meio controle, meio com hidroxiflutamida (OH-FLU) e meio contendo diidrotestosterona (DHT) nas concentrações de 10^{-8} M e 10^{-13} M isoladas ou associadas com OH-FLU 10^{-6} M. A proliferação foi avaliada no 3º dia de tratamento. Cada coluna representa a média de 4 pacientes. Os dados foram expressos em porcentagem tendo o grupo controle como 100%.

As células prostáticas estromais também se mantiveram viáveis durante o tempo de cultura (Figura 9). As células estromais também foram avaliadas no 3º dia de cultura, demonstrando uma resposta proliferativa inferior a 10% aos tratamentos. O grupo de células tratadas com DHT 10^{-13} M mostrou uma pequena variação (aumento de 5%) na proliferação em relação ao grupo controle, já os grupos tratados com DHT 10^{-8} M e OH-FLU 10^{-6} M a variação foi de 4% e 1% (respectivamente) quando comparado com o grupo controle. O grupo tratado com DHT 10^{-13} M associada à OH-FLU 10^{-6} M mostrou uma variação de 4% na proliferação em relação ao grupo controle e o grupo DHT 10^{-8} M associado à OH-FLU 10^{-6} M mostrou uma variação de 2% na proliferação quando comparado ao grupo controle (Figura 9.1).

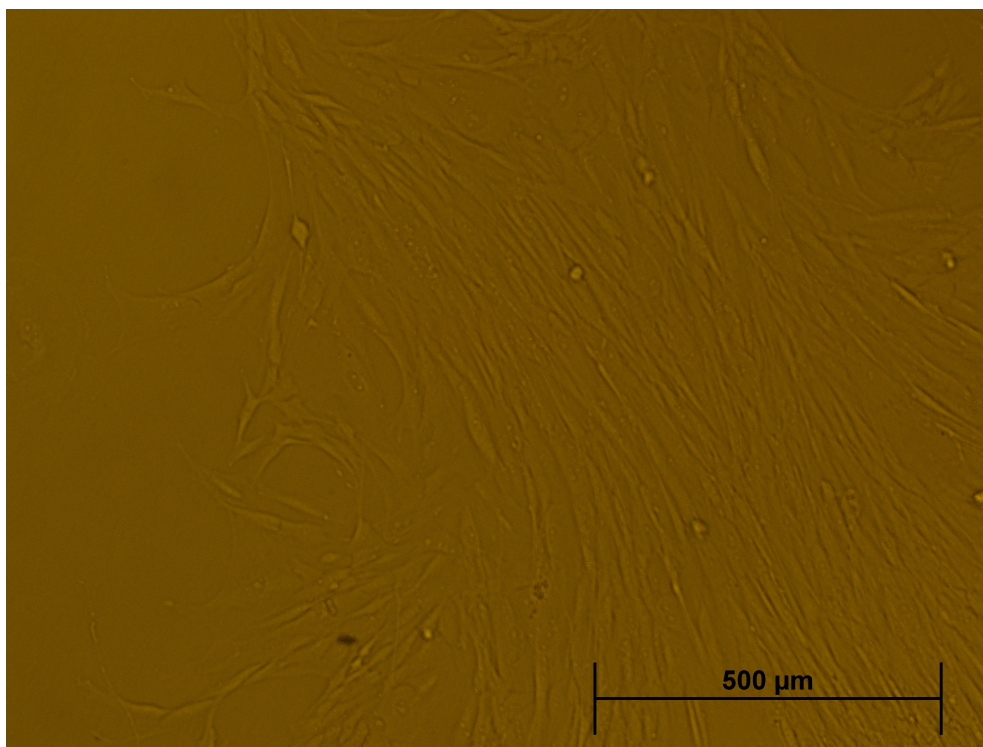


Figura 9. Cultura de células estromais. Cultura de células estromais prostáticas para avaliação da proliferação celular (aumento de 200x)

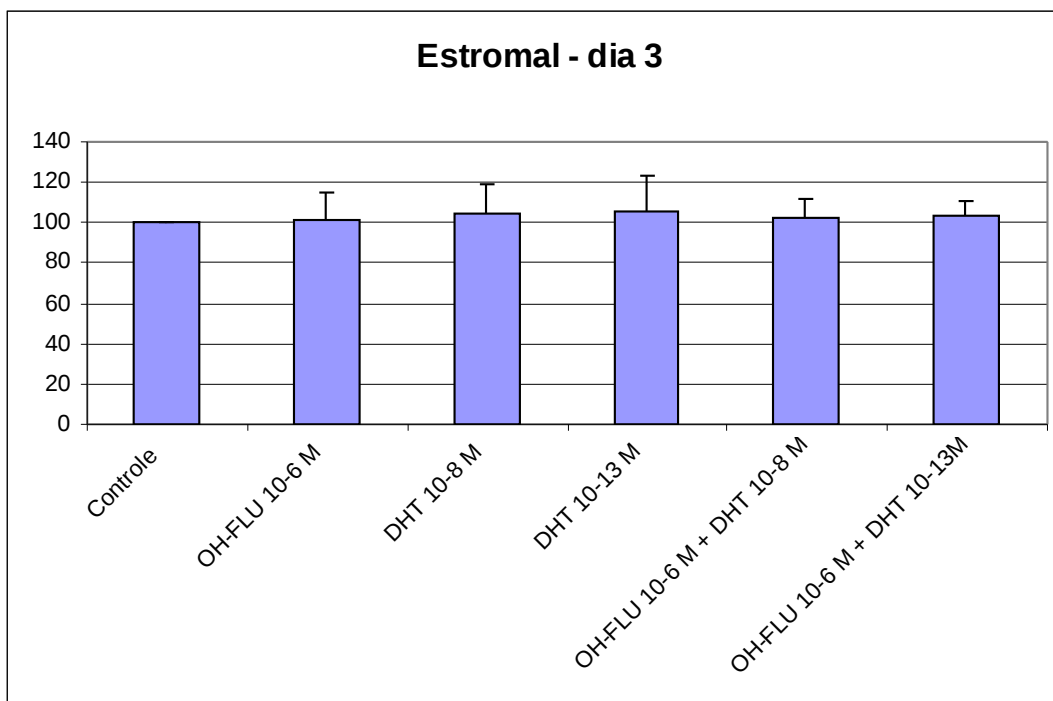


Figura 9.1. Proliferação de células estromais. As células estromais prostáticas foram incubadas em meio controle, meio com hidroxiflutamida (OH-FLU) e meio contendo diidrotestosterona (DHT) nas concentrações de 10^{-8} M e 10^{-13} M isoladas ou associadas com OH-FLU 10^{-6} M. A proliferação foi avaliada no 3º dia de tratamento. Cada coluna representa a média de 7 pacientes. Os dados foram expressos em porcentagem tendo o grupo controle como 100%.

A análise da expressão do mRNA do MDM2, p53, p21, Bcl2 e Bax foi quantificada por qRT-PCR e a expressão gênica foi representada como mediana (percentil 25% - 75%) de unidades arbitrárias. Os grupos analisados foram: controle com 5% de SBF-DT e tratados com DHT 10^{-8} M, DHT 10^{-13} M, OH-FLU 10^{-6} M, DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M.

Na cultura de células prostáticas epiteliais, a expressão do mRNA dos genes em estudo não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com o tratamento hormonal, com valores de $P=0,651$ para o gene MDM2 (Figura 10), $P=0,394$ para p53 (Figura 11), $P=0,547$ para p21 (Figura 12), $P=0,56$ para Bcl2 (Figura 13) e $P=0,794$ para o gene Bax (Figura 14).

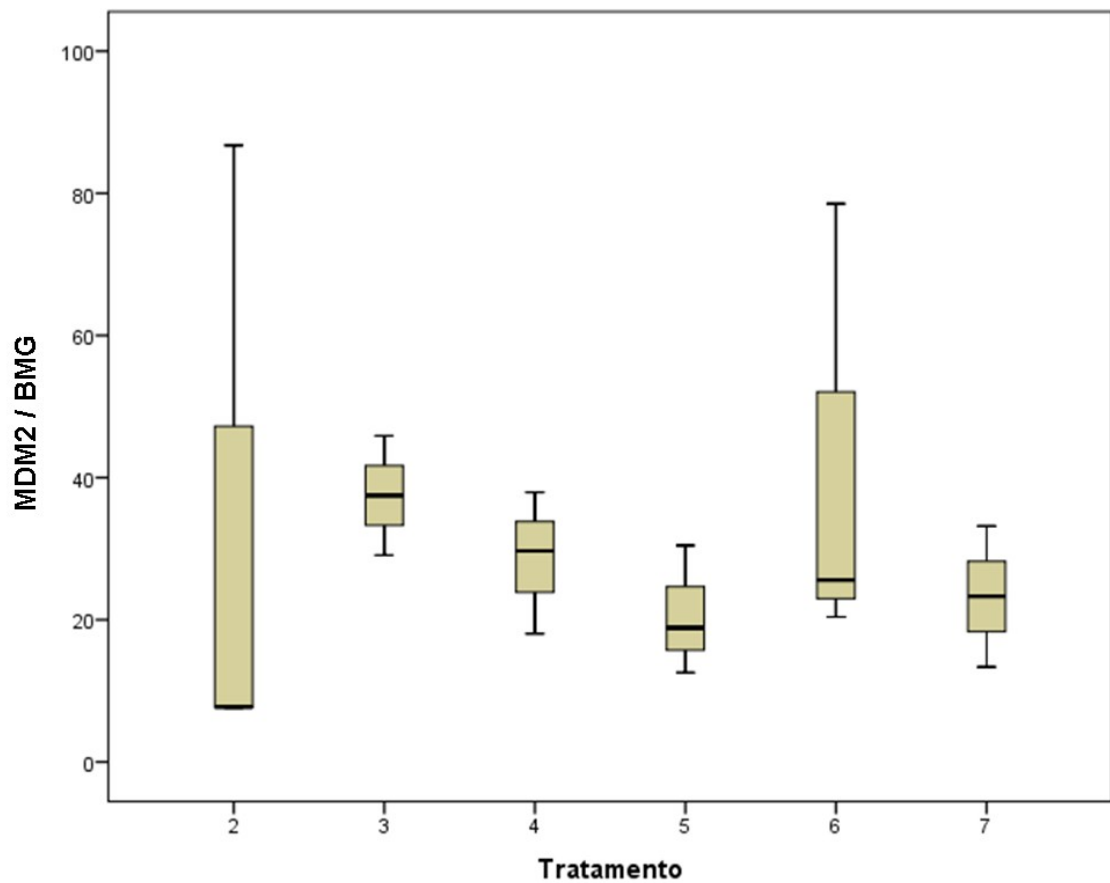


Figura 10. Expressão gênica do MDM2 em cultura de células epiteliais prostáticas.

Expressão do mRNA do MDM2 entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=3$.

Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,651$.

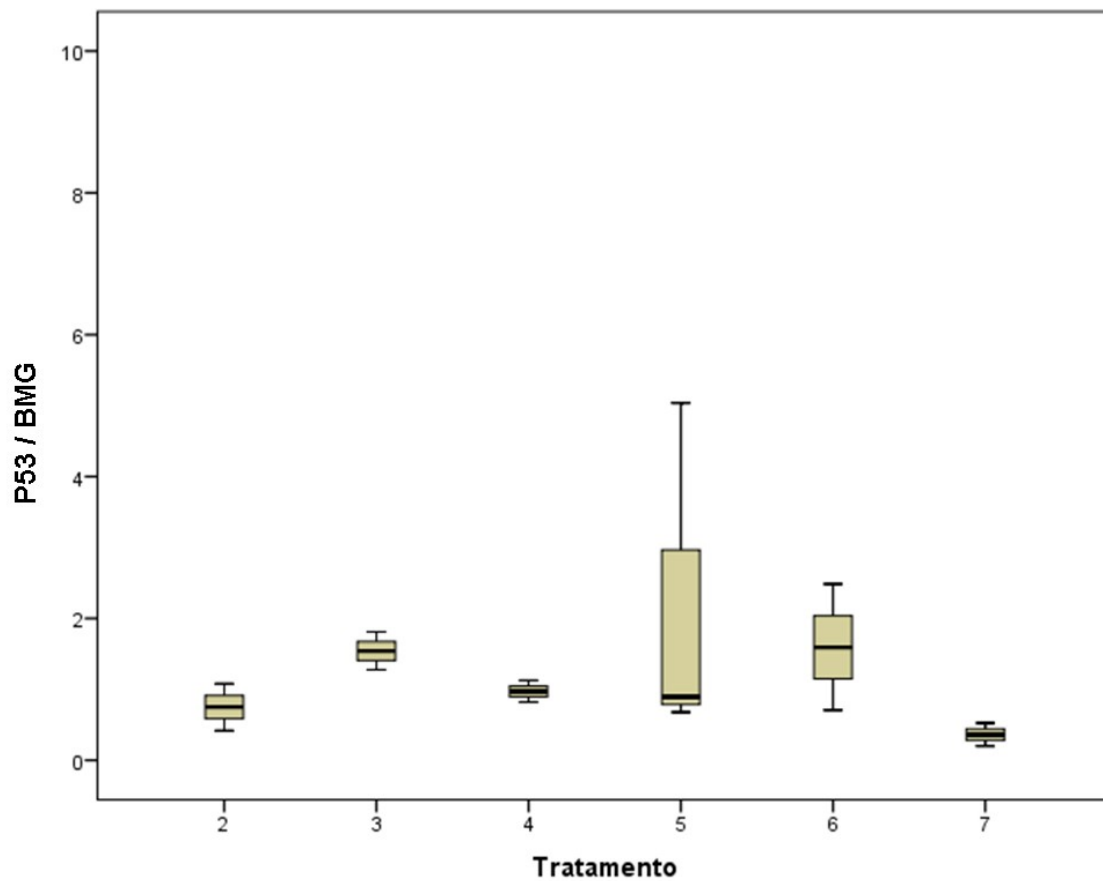


Figura 11. Expressão gênica do p53 em cultura de células epiteliais prostáticas. Expressão do mRNA do p53 entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=3$. Teste de análise de variância de uma via seguido de pos-hoc de Tukey, $P=0,394$.

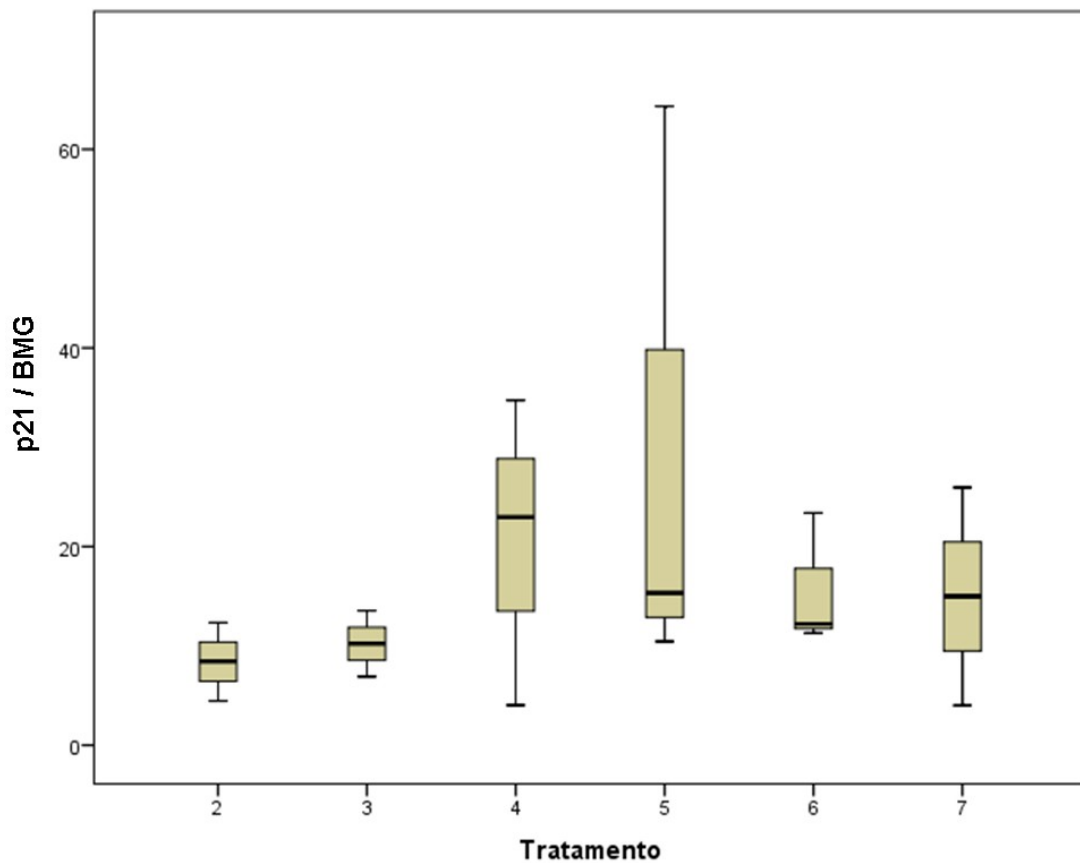


Figura 12. Expressão gênica do p21 em cultura de células epiteliais prostáticas. Expressão do mRNA do p21 entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=3$. Teste de análise de variância de uma via seguido de pos-hoc de Tukey, $P=0,547$.

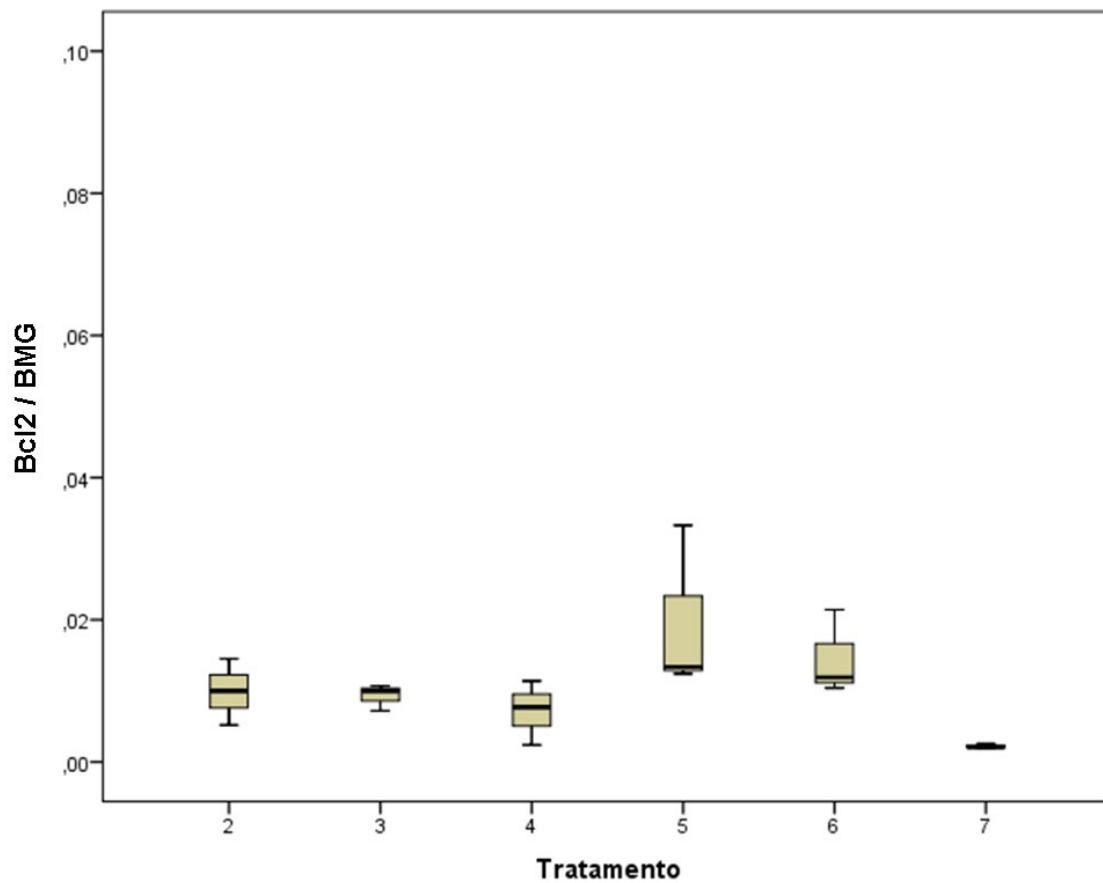


Figura 13. Expressão gênica do Bcl2 em cultura de células epiteliais prostáticas. Expressão do mRNA do Bcl2 entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=3$. Teste de análise de variância de uma via seguido de pos-hoc de Tukey, $P=0,56$.

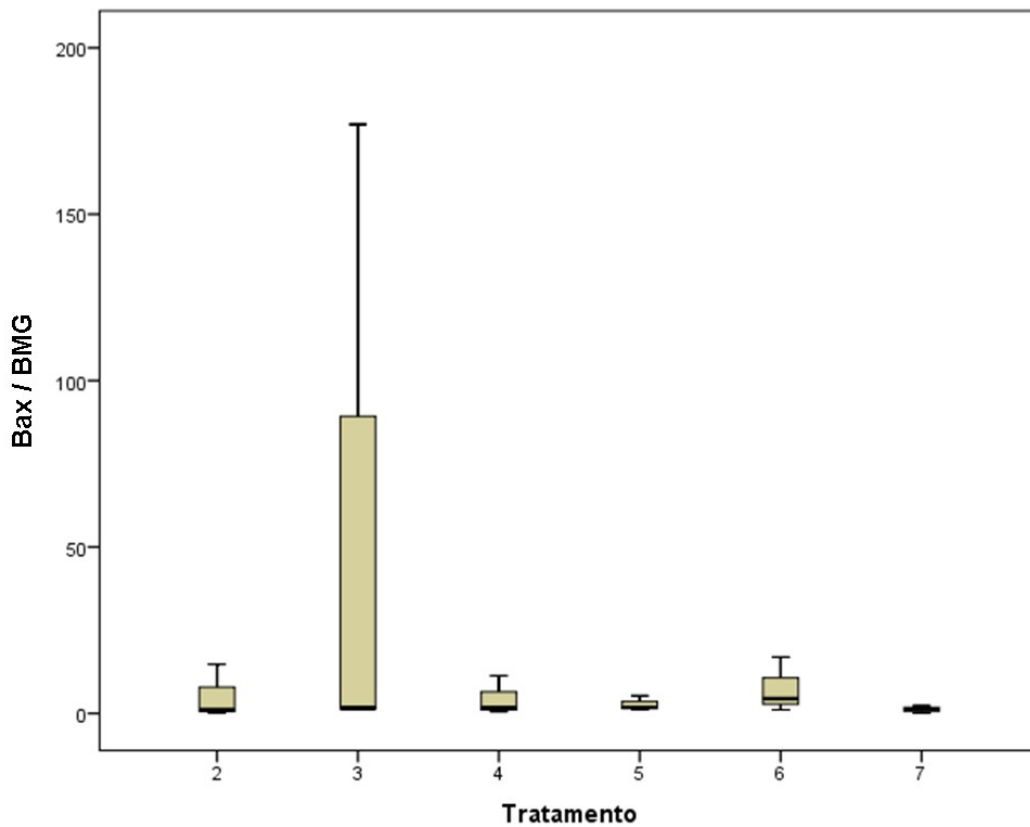


Figura 14. Expressão gênica do Bax em cultura de células epiteliais prostáticas. Expressão do mRNA do Bax entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=3$. Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,794$.

Na cultura de células prostáticas estromais, a expressão do mRNA dos genes em estudo também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com o tratamento hormonal, com valores de $P=0,952$ para MDM2 (Figura 15), $P=0,439$ para p53 (Figura 16), $P=0,808$ para p21 (Figura 17), $P=0,962$ para Bcl2 (Figura 18) e $P=0,843$ para Bax (Figura 19).

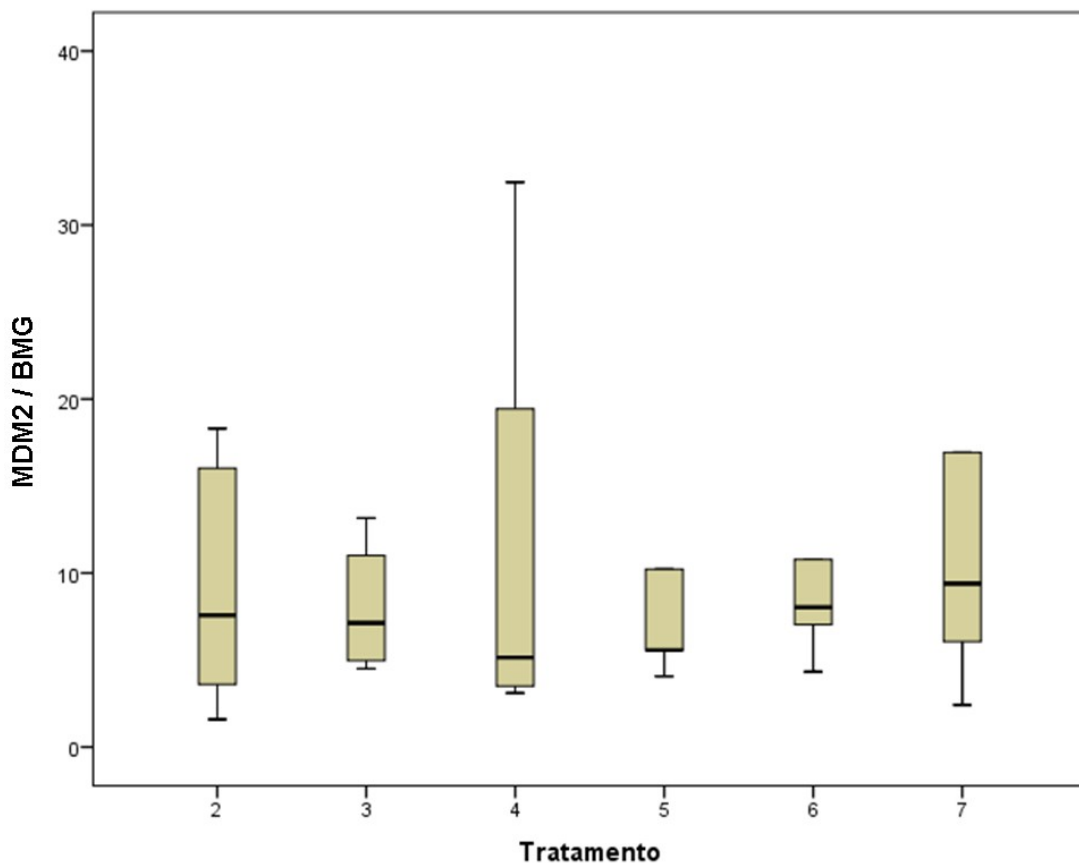


Figura 15. Expressão gênica do MDM2 em cultura de células estromais prostáticas.

Expressão do mRNA do MDM2 entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=5$.

Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,952$.

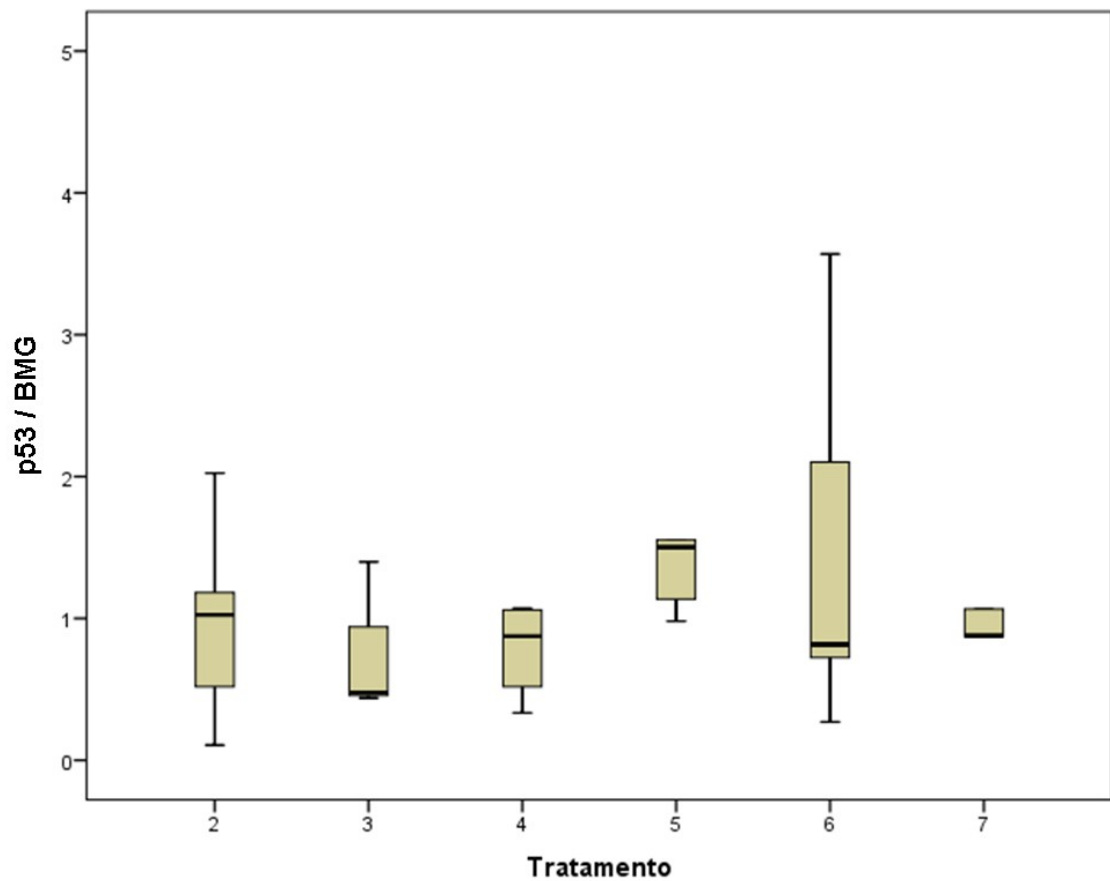


Figura 16. Expressão gênica do p53 em cultura de células estromais prostáticas. Expressão do mRNA do p53 entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=5$. Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,439$.

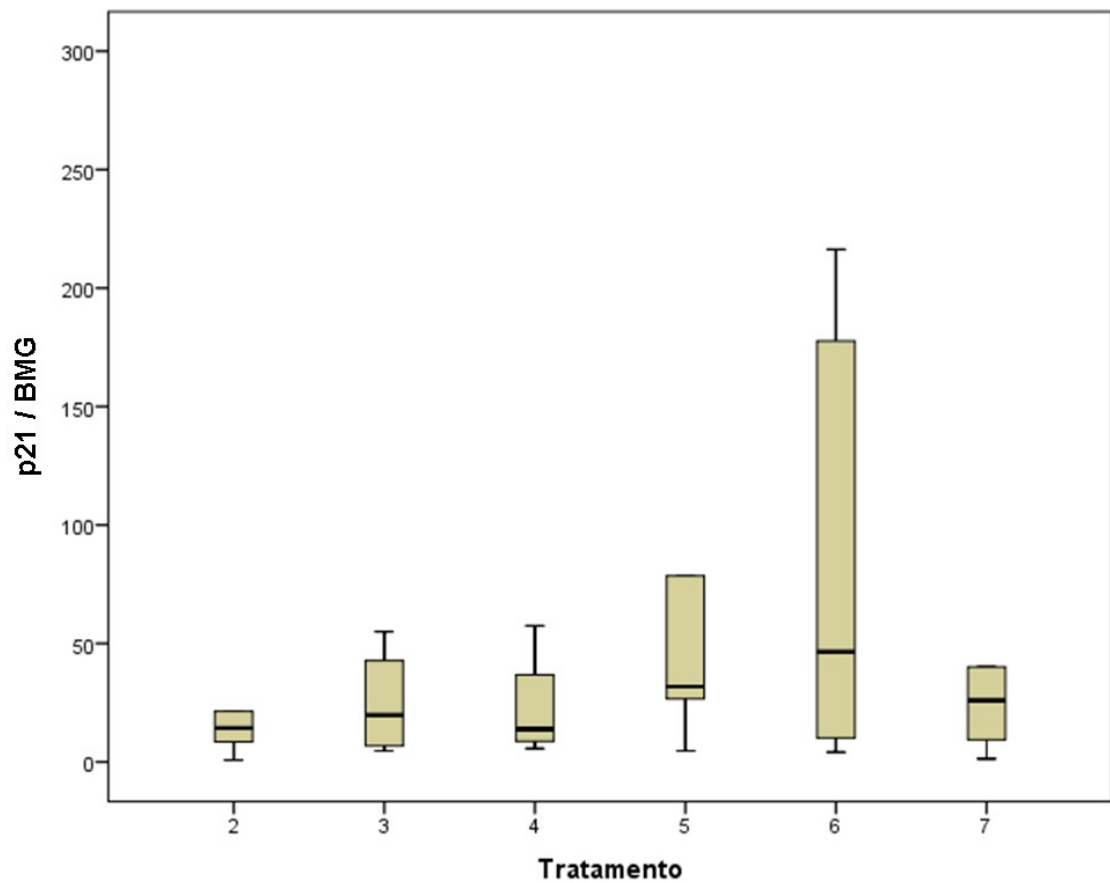


Figura 17. Expressão gênica do p21 em cultura de células estromais prostáticas. Expressão do mRNA do p21 entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=5$. Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,808$.

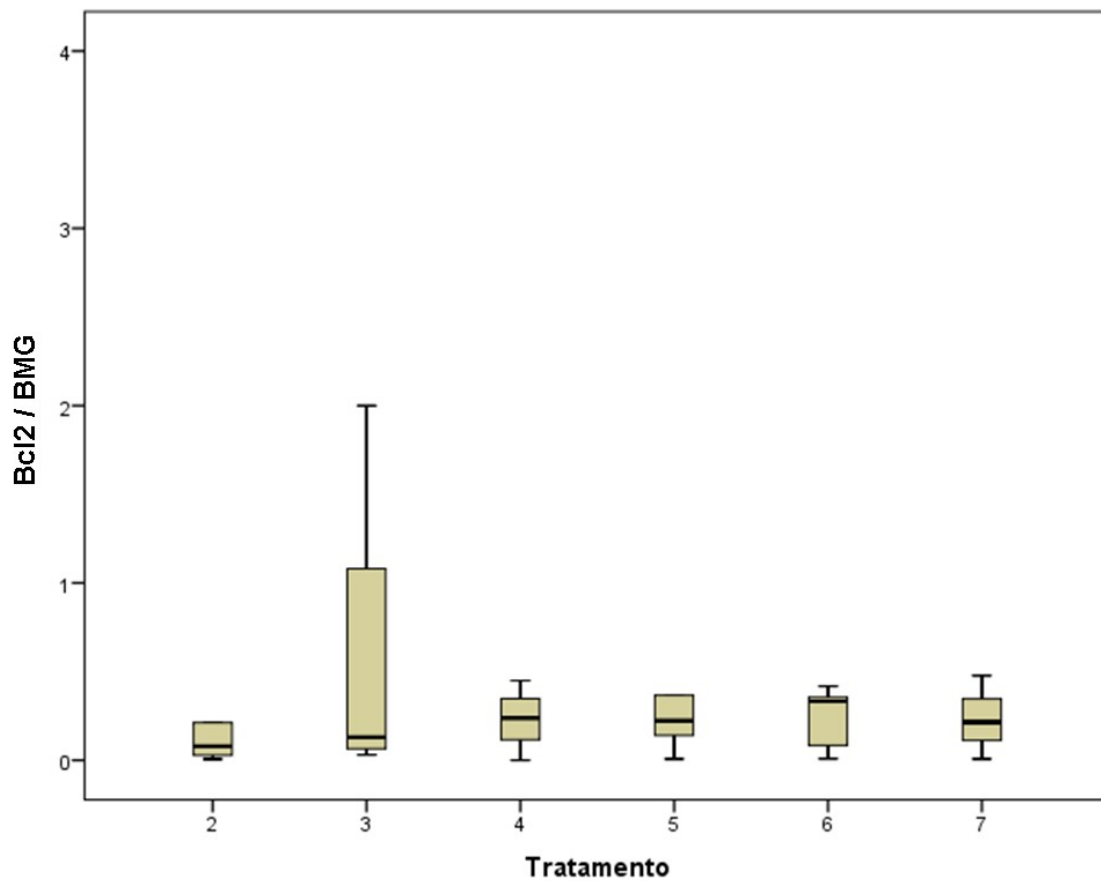


Figura 18. Expressão gênica do Bcl2 em cultura de células estromais prostáticas. Expressão do mRNA do Bcl2 entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=5$. Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,962$.

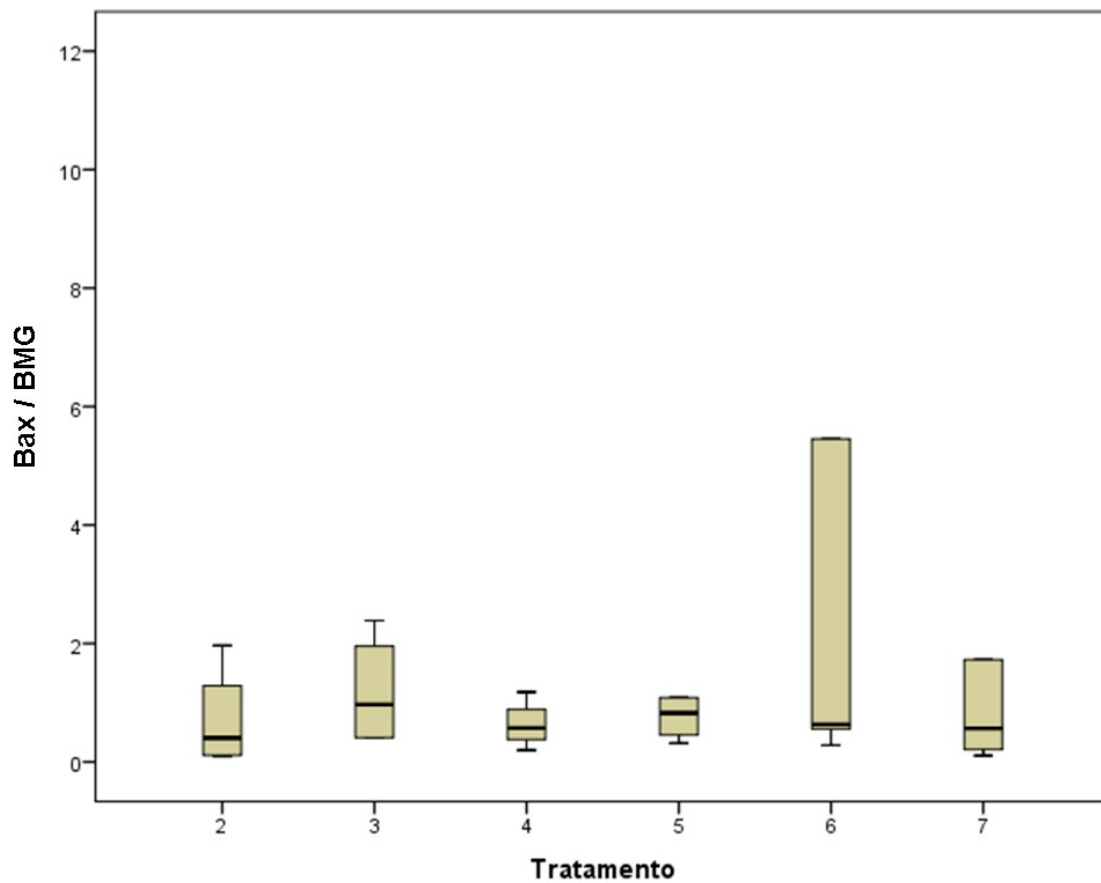


Figura 19 Expressão gênica do Bax em cultura de células estromais prostáticas. Expressão do mRNA do Bax entre os tratamentos (2: Controle, 3: DHT 10^{-8} M, 4: DHT 10^{-13} M, 5: OH-FLU 10^{-6} M, 6: DHT 10^{-13} + OH-FLU 10^{-6} M e 7: DHT 10^{-8} + OH-FLU 10^{-6} M). $n=5$. Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,843$.

CAPÍTULO 2

Expressão gênica de Bcl2, Bax, p53, MDM2 e p21 em tecido proveniente de HPB e CaP e análise da razão de chance de ter CaP

As médias de idade dos pacientes envolvidos no estudo foram $65,52 \pm 7,97$ para o grupo HPB e $63,64 \pm 7,22$ para o grupo CaP, variando de 51 a 82 anos e 46 a 74, respectivamente. Não houve diferença de idade entre os grupos ($P=0,241$).

A análise da expressão tecidual do mRNA do MDM2, p53, p21, Bcl2 e Bax foi quantificada por qRT-PCR e a expressão gênica foi apresentada como mediana (percentil 25% - 75%) de unidades arbitrárias.

Para a análise da expressão gênica do MDM2 foram utilizadas 22 amostras de tecido prostático com HPB e 22 amostras de tecido prostático com CaP. A expressão tecidual de mRNA do MDM2 foi de 1,17 (0,46 – 2,25) no grupo HPB e 4,59 (3,74 – 5,18) no grupo CaP mostrando um aumento estatisticamente significativo em CaP quando comparado com o grupo HPB, $*P=0,001$ (Figura 20).

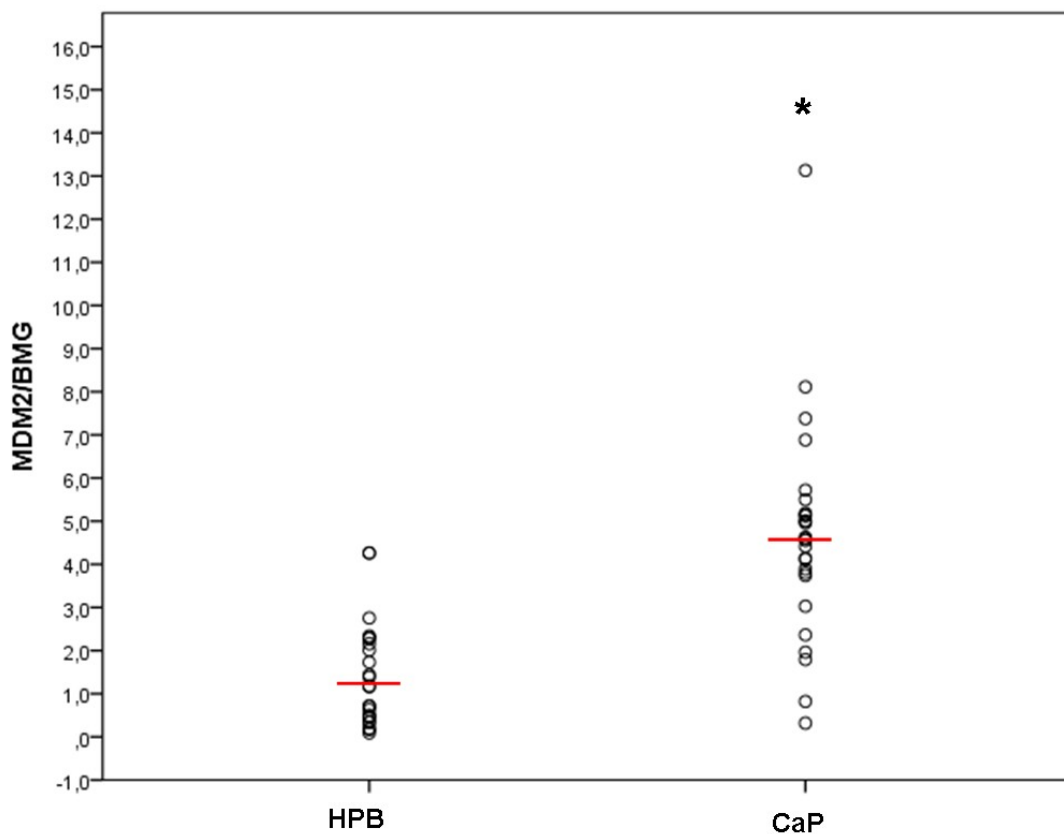


Figura 20. Expressão gênica de MDM2. Expressão gênica do MDM2 no tecido prostático de pacientes com HPB 1,17 (0,46 - 2,25) e CaP 4,59 (3,74 - 5,18) representados como mediana (percentil 25% - 75%), de unidades arbitrárias. $*P=0,001$ comparado com o grupo HPB. $n=22$ para o grupo HPB e $n=22$ para o grupo CaP. Teste de Mann-Whitney.

Vinte e quatro amostras de tecido prostático com HPB e 25 amostras de tecido com CaP foram utilizadas para a análise da expressão gênica do p53. A expressão do mRNA deste gene foi de 1,01 (0,32 – 2,00) no grupo HPB e 5,23 (2,85 – 7,44) no grupo CaP. A expressão gênica de p53 se mostrou aumentada no grupo CaP quando comparado com o grupo HPB com $*P=0,001$ (Figura 21).

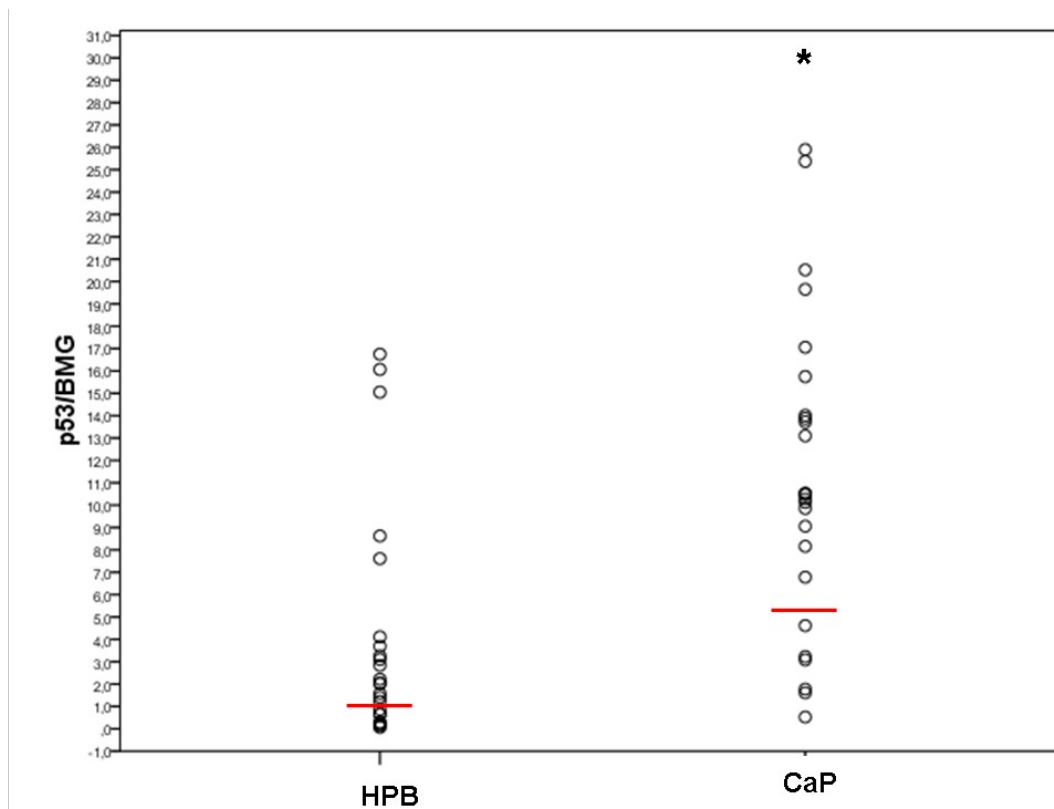


Figura 21. Expressão gênica de p53. Expressão gênica de p53 no tecido prostático de pacientes com HPB 1,01 (0,32 - 2,00) e CaP 5,23 (2,85 - 7,44) representadas como mediana (percentil 25% – 75%), de unidades arbitrárias. $*P=0,001$ comparado com o grupo HPB. $n=24$ para o grupo HPB e $n=25$ para o grupo CaP. Teste de Mann-Whitney.

Para a análise da expressão do mRNA do p21 foram utilizadas 21 amostras de tecido prostático com HPB e 25 amostras de tecido prostático com CaP. A expressão foi de 0,40 (0,07 – 3,67) no grupo HPB e 6,26 (4,60 – 11,63) no grupo CaP estes dados mostram um aumento na expressão do p21 no grupo CaP quando comparado com o grupo HPB. * $P=0,001$ (Figura 22).

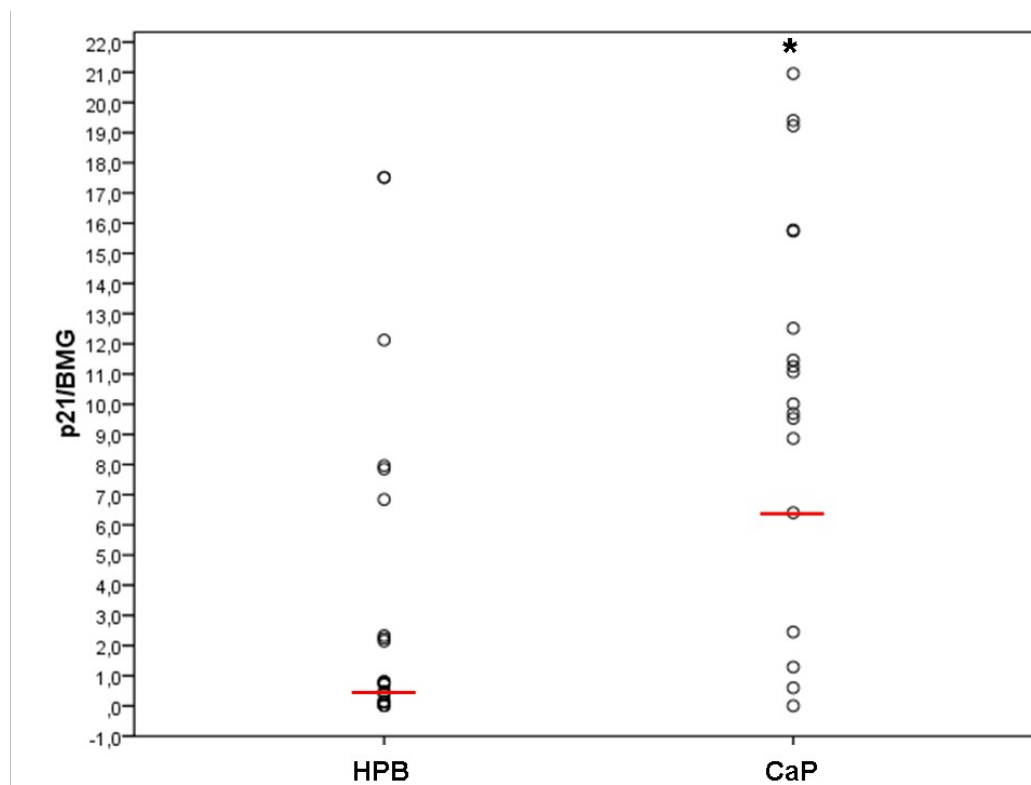


Figura 22. Expressão gênica de p21. Expressão gênica de p21 no tecido prostático de pacientes com HPB 0,40 (0,07 – 3,67) e CaP 6,26 (4,60 – 11,63) representadas como mediana (percentil 25% – 75%), de unidades arbitrárias. * $P=0,001$ comparado com o grupo HPB. . $n=21$ para o grupo HPB e $n=25$ para o grupo CaP. Teste de Mann-Whitney

A expressão tecidual de mRNA do Bcl2 foi de 1,23 (0,33 – 2,92) no grupo HPB e 4,15 (2,62 – 7,43) no grupo CaP, onde 23 amostras eram de tecido prostático com HPB e 27 amostras com CaP. O gene Bcl2 teve um aumento na sua expressão no grupo CaP quando comparado com o grupo HPB. * $P=0,001$ (Figura 23).

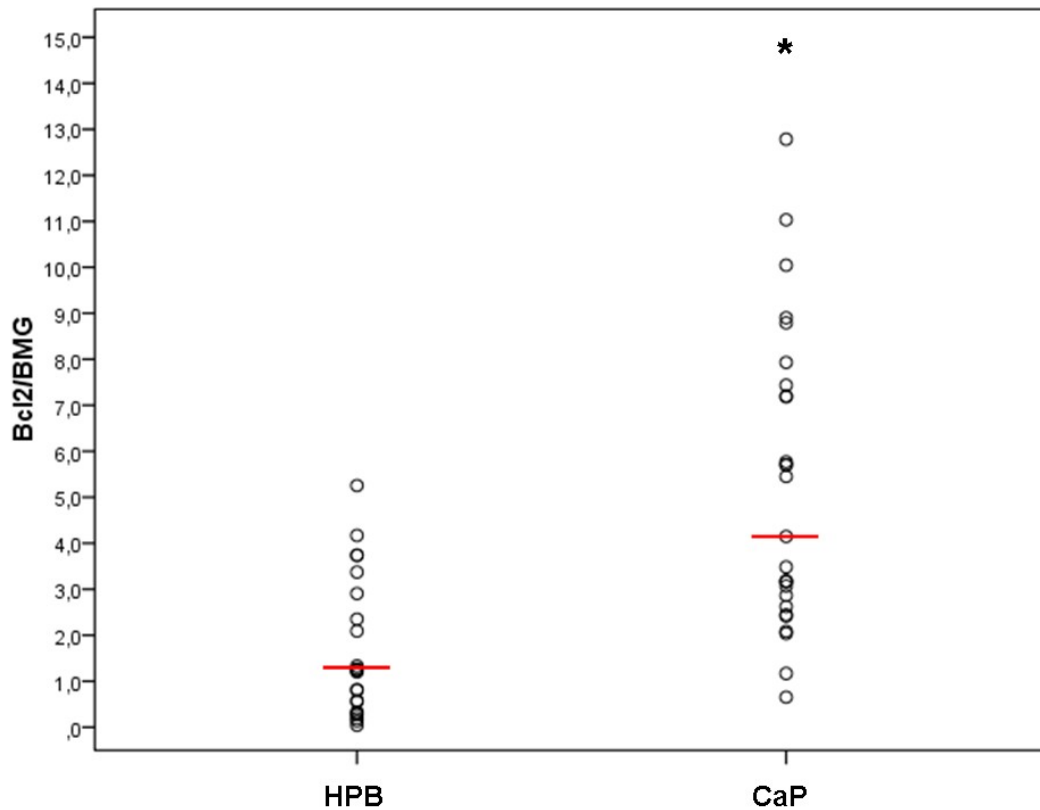


Figura 23. Expressão gênica de Bcl2. Expressão gênica de Bcl2 no tecido prostático de pacientes com HPB 1,23 (0,33 – 2,92) e CaP 4,15 (2,62 – 7,43) representadas como mediana (percentil 25 – 75), de unidades arbitrárias. * $P=0,001$ comparado com o grupo HPB. . $n=23$ para o grupo HPB e $n=27$ para o grupo CaP. Teste de Mann-Whitney

Para a análise da expressão gênica do Bax foram utilizadas 25 amostras com HPB e 25 amostras com CaP. A expressão tecidual de mRNA do Bax foi de 0,90 (0,60 – 1,60) no grupo HPB e 1,15 (0,95 – 1,84) no grupo CaP, não apresentando diferença significativa entre os dois grupos avaliados. $P=0,327$ (Figura 24).

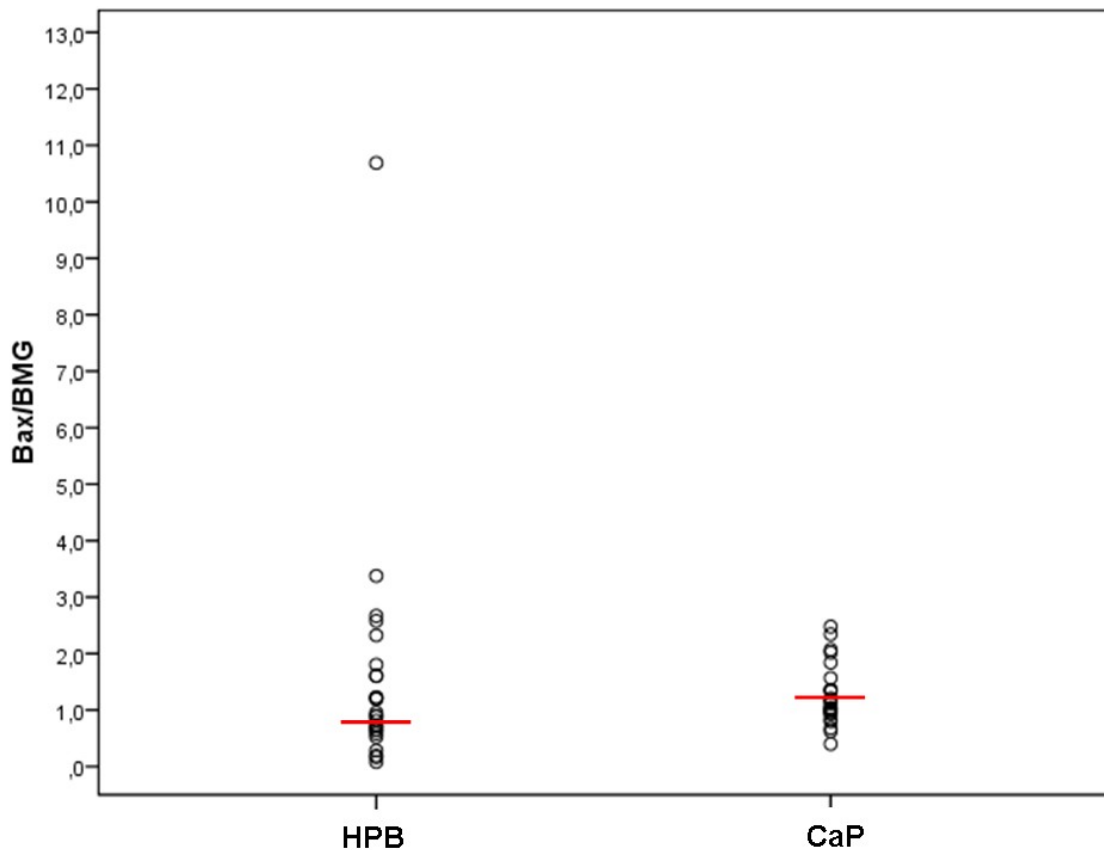


Figura 24. Expressão gênica de Bax. Expressão gênica de Bax no tecido prostático com HPB 0,90 (0,60 – 1,60) e CaP 1,15 (0,95 – 1,84) representados como mediana (percentil 25% – 75%) de unidades arbitrárias. $P=0,327$ comparado com o grupo HPB. $n=25$ para o grupo HPB e $n=25$ para o grupo CaP. Teste de Mann-Whitney

Além da avaliação da expressão gênica também foi feita a correlação entre os genes p53/MDM2 e Bcl2/Bax, onde observamos que nas amostras de HPB a correlação p53/MDM2 foi estatisticamente significativa ($*P=0,001$ e $r^2 =0,676$) e a correlação Bcl2/Bax também foi estatisticamente significativa ($*P=0,001$ e $r^2 =0,799$). Nas amostras de CaP a correlação p53/MDM2 não foi significativa ($P=0,28$ e $r^2 =0,254$), assim como a correlação Bcl2/Bax ($P=0,483$ e $r^2 =0,147$), onde as médias indicam que há maior expressão de Bcl2 do que Bax, média de 5,20 para Bcl2 e 1,25 para Bax.

As doenças da próstata, tanto a HPB quanto o CaP são doenças proliferativas. O estudo de genes associados, direta ou indiretamente, com as vias da regulação da proliferação celular podem apresentar uma grande relevância clínica. Pensando nisso, foi calculado uma curva ROC para os genes em estudo, com o objetivo de encontrar o valor com melhor resposta para sensibilidade e especificidade entre o grupo CaP e HPB e utilizar estes resultados para analisar a razão de chance de o indivíduo ter CaP pela análise de uma biópsia negativa de próstata. Para a escolha do valor de corte a partir da curva ROC, foram realizados os cálculos do produto e da soma da especificidade e sensibilidade para cada ponto da curva e o cálculo de Yuden (soma da sensibilidade mais especificidade, menos 1). O ponto que tivesse, pelo menos, os dois valores maiores, seria escolhido para representar o valor de corte. O cálculo da razão de chance de ter CaP se dá pela multiplicação dos verdadeiros positivos para CaP pelos verdadeiros negativos para HPB, dividido pelos falsos negativos para CaP multiplicado pelos falsos positivos para HPB (Figura 25). Em virtude da escolha do melhor ponto de corte pela curva ROC (MDM2 – 2,89; p53 – 2,18; p21 – 4,20; Bcl2 – 2,38 e Bax – 0,954), se observou um aumento na razão de chance do indivíduo ter CaP em todas as amostras analisadas. Os indivíduos que apresentarem a expressão do MDM2 maior que 2,89 a razão de chance de ter CaP é de 69 vezes. O aumento na razão de chance de ter

doença também foi observado para os outros genes como mostrado na tabela 2. Isso se deve pelo aumento dos pacientes verdadeiros positivos para CaP e ou verdadeiros negativos para HPB, ou diminuição dos pacientes falso negativos para CaP ou falsos positivos para HPB.

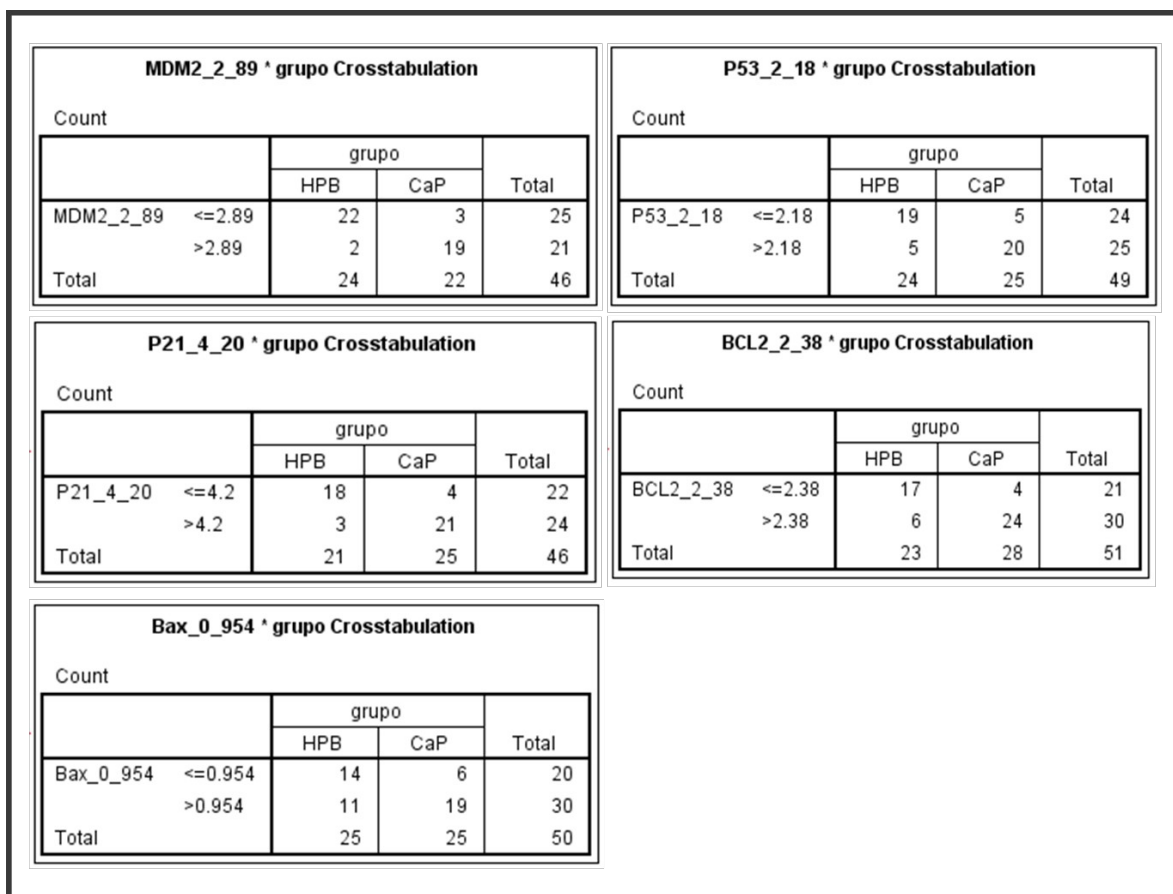


Figura 25. Distribuição de frequência dos valores de expressão gênica. Valores dos verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos negativos e falsos positivos para HPB e CaP baseado nos valores obtidos pela curva ROC. Valores utilizados para calcular a razão de chance de o indivíduo ter câncer.

Tabela 2. Análise da razão de chance. Análise da razão de chance para ter CaP através do tecido CaP em relação ao grupo HPB.

#	N	CaP OR	CI (95%)	P*
MDM2 ≤ 2,89	25	69,67	10,51 – 461,87	<0,001
MDM2 > 2,89	21			
p53 ≤ 2,18	24	15,20	3,79 – 61,0	<0,001
p53 > 2,18	25			
p21 ≤ 4,20	22	31,50	6,21 – 159,8	<0,001
p21 > 4,20	24			
Bcl2 ≤ 2,38	21	17,00	4,15 – 69,60	<0,001
Bcl2 > 2,38	30			
Bax ≤ 0,954	20	4,03	1,2 – 13,52	<0,021
Bax > 0,954	30			

Valores obtidos pela curva ROC. * Valores considerados significativos quando $P < 0,05$.

Pensando na possibilidade de utilizar esses genes como marcadores para auxiliar no rastreamento do câncer de próstata, calculou-se a sensibilidade (proporção de verdadeiros positivos entre todos os doentes), especificidade (proporção de verdadeiros negativos entre todos os sadios), o valor preditivo positivo (VPP) (proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo), valor preditivo negativo (VPN) (proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo) (Medronho 2002). Para posterior análise em paralelo, estas análises também foram calculadas para o nível sérico de PSA. O valor de PSA e o ponto de corte foram obtidos a partir da tese de doutorado realizado por um membro do nosso grupo de pesquisa,

Vanderlei

Biolchi,

(<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26882/000762193.pdf?sequence=1>)

Quando comparado o grupo CaP e HPB, os resultados para a sensibilidade foram PSA 89,4 %, MDM2 86,4%, p53 80%, p21 84%, Bcl2 85,7% e Bax 76%. Os resultados para especificidade foram: PSA 60%, MDM2 91,7%, p53 79,2%, p21 85,7%, Bcl2 73,9% e Bax 56,6 %. Valor preditivo positivo (VPP): PSA 85,5%, MDM2 90,5%, p53 80%, p21 87,5%, Bcl2 80% e Bax 63,3%. Valor preditivo negativo (VPN): PSA 68,2%, MDM2 88%, p53 79,2%, p21 81,8%, Bcl2 80,1% e Bax 70% (Tabela 3).

Quando cada marcador é analisado separadamente, utilizando a técnica de escolha do melhor ponto pela curva ROC, o MDM2 se mostrou um ótimo marcador quando comparado com o PSA, além disso, o p53, p21 e Bcl2 também são melhores marcadores do que o PSA.

Tabela 3. Parâmetros de diagnóstico. Parâmetros de diagnóstico para MDM2, p53, p21, Bcl2 e Bax de tecido com CaP e HBP através de qRT-PCR comparado com a dosagem de PSA sérico.

RNA ^m ^a	Sensibilidade %	Especificidade %	VPP ^b	VPN ^b
PSA (4,25) ^c	89,4	60,0	85,5	68,2
MDM2 (2,89) ^c	86,4	91,7	90,5	88
p53 (2,18) ^c	80,0	79,2	80,0	79,2
p21 (4,20) ^c	84,0	85,7	87,5	81,8
Bcl2 (2,38) ^c	85,7	73,9	80,0	80,1
Bax (0,954) ^c	76,0	56,6	63,3	70,0

^a RNA^m – Valores da expressão gênica. ^b VPP (valor preditivo positivo) e VPN (valor preditivo negativo). ^c Valores calculados a partir da curva ROC.

Verificando a combinação em paralelo dos genes com o PSA entre o grupo CaP e grupo HPB, a sensibilidade apresentada foi: MDM2 98,6%; p53 97,9%; p21 98,3%; Bcl2 98,5% e Bax 97,5% e a especificidade apresentada foi: MDM2 54,9%; p53 47,5%; p21 51,4%; Bcl2 44,3% e Bax 33,6%. Na análise em série, a sensibilidade apresentada para MDM2, p53, p21 Bcl2 e Bax foi de 77,2%; 71,5%; 75,1%; 76,6% e 67,9% e a especificidade foi de 96,8%; 91,7%; 94,3%; 89,6% e 82,4% respectivamente (Tabela 4). Estes resultados mostraram que uma análise em série do PSA com o MDM2, p53, p21, Bcl2 e Bax se mostrou melhor do que a análise dos marcadores separadamente.

Tabela 4. Análise em paralelo e em série. Análise em paralelo e em série da sensibilidade e especificidade para MDM2, p53, p21, Bcl2 e Bax de tecido com CaP e HPB através de qRT-PCR e dosagem sérica de PSA.

RNAm ^a	Parâmetro de diagnóstico %		Análise em Paralelo		Análise em Série	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
PSA (4,25) ^b	89,4	60,0				
MDM2 (2,89) ^b	86,4	91,7	98,6	54,9	77,2	96,8
p53 (2,18) ^b	80,0	79,2	97,9	47,5	71,5	91,7
p21 (4,20) ^b	84,0	85,7	98,3	51,4	75,1	94,3
Bcl2 (2,38) ^b	85,7	73,9	98,5	44,3	76,6	89,6
Bax (0,954) ^b	76,0	56,0	97,5	33,6	67,9	82,4

^a RNAm valores da expressão gênica obtidos a partir da qRT-PCR. ^b Valores calculados a partir da curva ROC.

DISCUSSÃO

A caracterização da cultura primária, bem como o acompanhamento diário do fenótipo das células em cultura primária é de fundamental importância para avaliarmos com segurança um determinado tipo de resposta fisiológica adequada. Essa afirmativa caracteriza a principal vantagem de se trabalhar com cultura primária, na qual as células mantêm características mais próximas do fenótipo normal embora *in vitro*, quando comparados a modelos de cultura com linhagens celulares. A resposta ao estímulo androgênico pode variar de acordo com o tipo de célula estudada. O modelo de cultura primária de células provenientes de tecido com HPB empregado neste estudo foi caracterizado como funcional (Silva, Morsch et al. 2001; Lee and Peehl 2004) permitindo a análise de células prostáticas e eliminando outros fatores que poderiam interferir na resposta ao tratamento androgênico, como por exemplo, várias passagens para obter linhagens de células imortalizadas. Contudo, não conseguimos observar diferença estatisticamente significativa entre as células e os tratamentos, é bem provável que o *n* reduzido deve ser um fator a ser considerado nos experimentos de cultura deste estudo.

Diidrotestosterona (DHT) é a forma ativa do andrógeno na próstata que se liga ao receptor de androgênio. A redução da testosterona em DHT pela 5 α -reductase é uma etapa crítica no controle dos eventos mediados por androgênios na próstata. A expressão e atividade da enzima 5 α -reductase *in vitro* têm sido estudada, principalmente, em

cultura primária de células provenientes de HPB (Berthaut, Portois et al. 1996; Delos, Carsol et al. 1998).

No presente trabalho, avaliou-se a proliferação de células epiteliais e estromais prostáticas humanas, em cultura primária, provenientes de amostras de tecido com HPB e tratadas com diferentes concentrações de DHT. Os resultados avaliados no terceiro dia de tratamento demonstraram que a menor concentração de androgênio usada (DHT 10^{-13} M) provocou um aumento de 33% na proliferação das células epiteliais e um aumento apenas de 5% na proliferação das células estromais quando comparadas ao grupo controle. Um aumento de 33% pode ser importante biologicamente apesar de não ser estatisticamente significativo. Isso indica que as células expostas à baixa concentração do androgênio teriam um maior potencial proliferativo. Os resultados do nosso estudo, com a maior concentração de DHT (DHT 10^{-8} M), mostraram um aumento de 24% na proliferação das células epiteliais e um aumento de 4% na proliferação das células estromais quando comparadas ao grupo controle. Apesar dos nossos resultados não serem significativos estatisticamente, foi observado que as baixas concentrações de DHT estimularam a proliferação e altas doses mantêm a proliferação mais próxima ao controle nas células estudadas. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, realizados em cultura de células prostáticas, que demonstraram a inibição e estimulação da proliferação celular por altas e baixas doses de androgênio, respectivamente. (Joly-Pharaboz, Soave et al. 1995; Lee, Sutkowski et al. 1995; Silva, Morsch et al. 2001; Brum, Morsch et al. 2003).

Nós observamos que a administração de OH-FLU 10^{-6} M sozinha também parece ter efeito proliferativo, esse resultado sugere que a proliferação celular pode ocorrer pela ativação de outras vias diferentes das ativadas pelo receptor de androgênios. Outro dado que corrobora com os nossos achados é de um estudo em cultura de células

estromais provenientes de HPB de homens que foram incubadas com DHT (1 μ mol/L) e TGF- β (0,01; 0,1; 1; 10 ng/mL) por 48h, onde as células estromais tratadas somente com DHT apresentaram uma fraca proliferação celular, mas a combinação de DHT e TGF- β aumentou significativamente a proliferação das células estromais ($P < 0.01$), sugerindo que estes hormônios desempenham um papel na regulação da proliferação das células estromais, o que pode ser importante para a formação da HPB (Niu, Xu et al. 2001). Um estudo em linhagem celular de câncer de próstata, LNCaP, tratadas com DHT em baixa concentração (DHT 10⁻¹⁰M) mostrou um aumento na proliferação celular após 4 dias de cultura (Lee, Sutkowski et al. 1995). O metabolismo dos hormônios esteróides na glândula prostática é muito complexo, mas as culturas primárias estão ajudando a compreender as vias destes hormônios.

Neste estudo, nós não observamos diferença estatisticamente significativa entre a expressão gênica de MDM2, p53, p21, Bcl2 e Bax e os diferentes tratamentos com DHT. Talvez esse resultado se deva ao fato de que o número amostral é reduzido ou por estes genes não responderem ao estímulo androgênico nas condições que criamos neste modelo de cultura primária.

Em cultura primária de células epiteliais prostáticas normais foi observado que a ativação de p53 por agentes que possam danificar o DNA é atenuada (Girinsky, Koumenis et al. 1995; Bromfield, Meng et al. 2003). Esta atenuação tem sido atribuída a uma necessidade das células progenitoras ou células semelhantes às células-tronco em reprimir a atividade da p53 de modo que esta não sinalize para a apoptose (Dumble, Knight et al. 2001).

A contribuição das culturas primárias para o conhecimento da biologia da próstata normal e com câncer é de grande relevância, mas ainda existem desafios que permanecem na decisão de utilizar as culturas primárias como modelos *in vitro*. Isso

inclui o isolamento da célula em cultura e o desenvolvimento de métodos que induzem estas células a manter sua capacidade de resposta ao androgênio.

O perfil genético de linhagens celulares de câncer de próstata em comparação com tecidos de câncer de próstata tem sido demonstrado por vários pesquisadores. É encontrado apenas um pequeno número de genes com a expressão concordante em linhagem celular de câncer de próstata e tecidos com CaP (Welsh, Sapinoso et al. 2001). Bull e colaboradores demonstraram que em linhagens celulares a expressão aumentada de genes é menor do que os tecidos com câncer, em comparação com tecidos normais (Bull, Ellison et al. 2001).

O modelo de cultura primária de células prostáticas busca conhecer os mecanismos de resposta destas células a diferentes tratamentos que pode auxiliar no entendimento da fisiopatologia das doenças prostáticas, uma vez que reflete melhor a variabilidade de resposta inerente à variabilidade dos indivíduos, assim como a análise da expressão gênica, das células em cultura e de amostras de tecido prostático, estão proporcionando novos conhecimentos sobre as características das doenças proliferativas da próstata.

A técnica de PCR em tempo real nos permite avaliar quantitativamente os níveis de mRNA 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 nós demonstramos um aumento significativo na expressão dos genes MDM2, p53, p21 e Bcl2 quando comparado com o grupo HPB, mas não houve diferença significativa na expressão de Bax quando comparado com o grupo controle.

Nossos resultados indicaram um aumento na expressão de p53 em CaP. Já foi descrito que em muitos tumores p53 se encontra aumentado para tentar suprimir o

tumor, mas mutações neste gene podem estar associadas com uma neoplasia prostática tardia (Downing, Russell et al. 2003). O aumento da expressão de p53 pode prevenir o processo de transformação, enquanto que a inativação de p53 induz as células a perderem sua diferenciação (Eliyahu, Michalovitz et al. 1989; Finlay, Hinds et al. 1989). Estudo com amostras de adenocarcinoma colorretal, avaliadas por imunohistoquímica, demonstrou um aumento no acúmulo nuclear de p53, sugerindo que os adenocarcinomas de colorretal, na presença deste acúmulo de p53, são mais propensos a serem agressivos (Shanmugam, Katkooi et al. 2008). Recentemente foi avaliada a expressão protéica de p53 em amostras de pacientes submetidos à prostatectomia radical, e os resultados mostraram uma correlação direta da expressão da proteína com o potencial maligno do tumor, sugerindo que p53 poderia ser usado como um biomarcador na determinação da malignidade do câncer de próstata (Saidi, Georgiev et al. 2011). A capacidade das células para induzir p53 em resposta a eventos oncogênicos tem um papel importante na prevenção da malignidade. Nossos resultados sugerem que o aumento na expressão de p53 em CaP pode estar associada com a tentativa de reverter o processo de transformação neoplásica.

MDM2 é ativada por p53 (Barak, Juven et al. 1993), e inibe p53, esse evento é controlado por uma alça de feedback autorregulatória (Wu, Bayle et al. 1993; Bond, Hu et al. 2005; Kruse and Gu 2009). Níveis baixos de p53 e MDM2 dentro da célula indicam um bom funcionamento desta regulação (Soussi and Beroud 2001). Leite e colaboradores avaliaram a expressão de MDM2 e p53 por imunohistoquímica em amostras de pacientes submetidos à prostatectomia radical. Seus resultados sugerem que a expressão aumentada de MDM2 está relacionada com o desenvolvimento do câncer de próstata e que um fenótipo p53-positivo/MDM2-positivo pode indicar um tumor de próstata agressivo (Leite, Franco et al. 2001). Qualquer alteração na expressão de

MDM2 desregularia e expressão de p53 e conseqüentemente desempenharia um papel importante no desenvolvimento do câncer. A inibição de MDM2 é uma maneira de restaurar a função de p53, incluindo a indução de Bax e p21, resultando no bloqueio do ciclo celular e/ou induzindo a apoptose.

As propriedades tumorais de MDM2 podem ser independentes de p53. Aproximadamente metade dos cânceres de próstata apresentem a expressão de MDM2 aumentada com ou sem a expressão de p53, sugerindo que MDM2 possa estar envolvido diretamente no desenvolvimento do CaP (Taj, Tawil et al. 2001). Análises com imunohistoquímica para a expressão protéica de MDM2 em amostras de tecido prostático humano mostrou uma expressão aumentada de MDM2 localizada principalmente no núcleo das células dos tumores prostáticos sugerindo que este aumento na expressão de MDM2 pode desempenhar um papel importante no CaP (Ji, Wang et al. 2011). Em células DU145 a inibição do MDM2 resultou no aumento de p21, tanto gênico quanto protéico, e nas células PC3 foi observado um aumento significativo na expressão da proteína de p21 e Bax (Zhang, Li et al. 2003).

Nossos resultados mostraram uma correlação significativa de MDM2/p53 nas amostras de HPB sugerindo que estes genes estão em equilíbrio, mas o contrário foi observado nas amostras de CaP, a correlação MDM2/p53 foi perdida sugerindo que há um desequilíbrio entre estes genes no câncer de próstata. Este resultado está de acordo com os achados em adenomas e adenocarcinomas colorretal, na qual não foi encontrada correlação entre MDM2/p53 (Abdel-Fattah, Yoffe et al. 2000).

Neste estudo foi encontrada uma correlação significativa de Bcl2/Bax no grupo HPB indicando que este heterodímero se mantém estável na hiperplasia prostática benigna. Segundo dados da literatura, a formação de heterodímeros Bcl2/Bax podem atuar como proliferativos, com isso, podemos sugerindo a participação deste dímero no

desenvolvimento da HPB (Reed 2002; Catz and Johnson 2003) Também avaliamos as amostras de CaP e observamos que o mesmo heterodímero perde sua correlação, mostrando que há mais Bcl2, que é anti-apoptótico, do que Bax que é pró-apoptótico, sugerindo a ação de Bcl2 no desenvolvimento do CaP.

A proteína Bax é um membro da família Bcl2 e atua promovendo a apoptose. A degradação de Bax implica em bloquear um dos mecanismos que induzem as células para a apoptose. Estudos avaliando células PC3 e LNCaP, demonstraram um aumento de Bax após inibição de MDM2, sugerindo que a degradação de Bax pelo MDM2 pode ser um mecanismo de regulação importante em câncer de próstata avançado (Zhang, Li et al. 2003). Li e Dou avaliaram amostras de tecido de adenocarcinoma de próstata e observaram níveis aumentados de degradação de Bax assim como baixos níveis da proteína Bax um aumento no escore de Gleason do câncer de próstata, estes resultados sugerem que a degradação de Bax é um mecanismo de sobrevivência das células tumorais (Li and Dou 2000). Estes resultados podem ajudar a explicar os nossos achados em que houve um aumento na expressão de MDM2 em CaP quando comparado com HPB e não houve diferença significativa na expressão de Bax entre os grupos em estudo, sugerindo a degradação de Bax por MDM2 em CaP. Células de câncer de próstata que apresentam o receptor de androgênio bloqueado mostraram um aumento na regulação da Bax e, conseqüentemente, aumento na apoptose mediada pelo Bax, reduzindo o crescimento do tumor (Lin, Kokontis et al. 2006). A baixa expressão de Bax também foi associada com câncer de ovário (Tai, Lee et al. 1998), adenocarcinoma de mama metastático (Krajewski, Blomqvist et al. 1995) e leucemia linfoblástica (Xie, De Angelis et al. 1999).

As ações antagônicas do p21, anti-câncer e pro-câncer, talvez possam explicar os resultados obtidos no presente trabalho, em que foi observado um aumento do mRNA

do *p21* no grupo CaP quando comparado ao grupo HPB. Provavelmente, o aumento transcricional do *p21*, induzido por p53, foi uma resposta anti-proliferativa clássica deste regulador do ciclo celular, como gene alvo seqüencial da ação de p53. Além disso, outros fatores pós-transcricionais, ainda desconhecidos, podem ter atuado para impedir a ação antiapoptótica da proteína p21, o que poderia levar a transformação dessas células, que ainda mantém a sua diferenciação, a um estágio de carcinoma. Esta idéia é reforçada por um estudo, no qual foram analisadas a expressão das proteínas p53, p21 e p16 em adenocarcinoma endometrial e controles, onde aos maiores índices de proliferação e de expressão de p53 e p21 ocorreram nos tumores malignos mais indiferenciados ou estágios mais avançados (Buchynska and Nesina 2006).

A expressão anormal de p21 foi observada em CaP (Rigaud, Tiguert et al. 2004). Pesquisadores com dados *in vitro*, sugerem que p21 modula a apoptose induzida pelo p53, bem como a sobrevivência celular no CaP após a exposição a agentes prejudiciais ao DNA e privação fator de crescimento (Martinez 2000). Estudos da expressão do mRNA e da proteína p53 e p21, em amostras de fibroadenoma, avaliadas por RT-PCR, mostraram um aumento na expressão gênica de p53 e p21 quando comparadas com o tecido normal de mama, sugerindo o envolvimento destes genes no desenvolvimento do tumor benigno de mama (Schneider, Branchini et al. 2009). A maioria dos gliomas, com diferentes graus de malignidade, apresenta o tipo selvagem de p53 e sua forma mutante e expressam altos níveis de p21 (Jung, Bruner et al. 1995). Como um membro da família CDK1, p21 pode atuar como uma proteína supressora de tumor; portanto, a perda da sua função pode estar correlacionada com os distúrbios proliferativos. Há evidências de que a expressão aumentada de p21 está correlacionada com o desenvolvimento de tumores de próstata (Sarkar, Li et al. 1999; Amatya, Takeshima et al. 2001; Fizazi, Martinez et al. 2002). Royuela e colaboradores observaram um

aumento na expressão de p21 nas amostras de tecido da próstata com lesões proliferativas (Royuela, Arenas et al. 2001).

Estudos avaliados por imunohistoquímica para verificar a relação entre a expressão de p21 e Bcl2, em amostras de câncer de próstata, mostraram uma correlação positiva entre as expressões de Bcl2 e p21, sugerindo que a expressão de p21 pode ser modulada por Bcl2 em CaP (Kolar, Murray et al. 2000).

A expressão aumentada de Bcl2 em mais de 30% dos casos de CaP, está correlacionada com um estágio avançado e um mau prognóstico de câncer de próstata (Raffo, Perlman et al. 1995; Moul 1999; McCarty 2004). Este aumento na expressão de Bcl2 também foi observado em câncer de próstata primário sendo associada a uma grande chance de recorrência da doença após a prostatectomia radical (Yoshino, Shiina et al. 2006). A expressão aumentada de Bcl2 também foi associada com um alto grau de escore de Gleason em pacientes com CaP avançado submetidos a terapia de privação de andrógeno, por outro lado Bax que não mostrou associação com o escore de Gleason (Anvari, Seilianian Toussi et al. 2012).

A expressão de genes pro-apoptóticos, como o Bax, é aumentada por p53. A dimerização entre as proteínas da família Bcl2, por transcrição seletiva de Bax, poderá levar a célula a apoptose, mas outros fatores pós transcricionais, ainda desconhecidos, pode ter atuado para prevenir a ação pro-apoptótica de Bax, que pode levar a transformação destas células a um estágio de carcinoma (Ko and Prives 1996).

Vários pesquisadores vêm se dedicando aos estudos de expressão gênica de genes que possam estar envolvidos na formação do câncer de próstata. Apesar do aumento crescente das pesquisas acerca dos mecanismos de desenvolvimento e progressão do CaP ainda não existe um perfil de expressão de marcadores bem estabelecido para esta doença.

Na literatura se encontram estudos associando a expressão gênica com o risco de desenvolver câncer. Por exemplo, um estudo de Hirata e colaboradores, em 2007, mostraram uma associação significativa entre o polimorfismo funcional em MDM2 e aumento no risco de desenvolver câncer renal (Hirata, Hinoda et al. 2007). Estudos correlacionaram a expressão de p53 com o risco de desenvolver tumor estromal gastrointestinal e foi observada uma correlação entre o aumento da expressão de p53 com um aumento no risco de desenvolver o tumor estromal gastrointestinal (Zong, Chen et al. 2012). Outro estudo mostrou uma associação significativa entre as variantes polimórficas de p53 no codon 72 e de p21 no codon 31 com o risco de desenvolver câncer cervical (Jiang, Liu et al. 2010). Yu e colaboradores, em 2010, investigaram o polimorfismo Bax G(-248)A e o risco de câncer de pulmão na população chinesa e seus resultados sugerem uma associação de Bax com o risco de câncer de pulmão (Yu, Guo et al. 2010). Os resultados dos estudos citados corroboram com os nossos resultados indicando esses genes como possíveis marcadores de tumor.

Partindo da idéia de utilizar os genes avaliados neste estudo como possíveis marcadores tumorais e diante dos resultados encontrados, as expressões dos genes MDM2 e p21 apresentaram boa sensibilidade e ótima especificidade quando comparado ao PSA, os genes p53 e Bcl2 apresentaram boa sensibilidade e especificidade. Bax mostrou uma boa sensibilidade, mas uma baixa especificidade quando comparado ao PSA.

Não existem substâncias que apresentem sensibilidade e especificidade de 100%, por isso a necessidade em se fazer testes combinados com o objetivo de encontrar os melhores valores para a sensibilidade e especificidade. Para melhorar diagnóstico poderão ser pedidos testes múltiplos, como o teste em paralelo, são testes solicitados ao mesmo tempo, onde se considera o resultado positivo se um dos dois

testes for positivo para a doença, para se considerar um resultado negativo os dois testes resultarem negativos. O teste em série, onde os testes são aplicados sequencialmente e o segundo teste somente será aplicado se o primeiro resultar positivo (Medronho 2002).

Neste estudo foram realizadas análises em série e em paralelo. A análise em paralelo apresentou melhor sensibilidade do que especificidade. Caso este resultado fosse levado em consideração em uma análise clínica, haveria grande chance de ser um valor falso positivo. Entretanto, a análise em série se mostrou mais específica do que sensível. O resultado de uma análise em série com o PSA melhora o resultado, diminuindo as chances de ocorrerem falsos positivos.

Ainda não se conhece a origem das doenças da próstata, mas sabemos que HPB e CaP são doenças proliferativas. A partir dos nossos resultados podemos sugerir que os genes deste estudo podem estar associados com a proliferação celular em ambas as doenças, mas com níveis de expressão diferentes. Assim, nossos resultados podem contribuir para o conhecimento dos mecanismos de controle do ciclo celular e da proliferação celular no desenvolvimento das doenças da próstata. Com o conhecimento das vias moleculares envolvidas no desenvolvimento tumoral, existe a possibilidade de se desenvolver novos métodos para a prevenção das doenças prostáticas.

A razão de chance (*odds ratio*) é definido como a razão entre a chance de um evento ocorrer em um grupo e a chance de ocorrer em outro grupo. Neste estudo foi calculado o risco de desenvolver câncer de próstata pelas frequências da expressão dos genes MDM2, p53, p21, Bcl2 e Bax nos grupos CaP e HPB. Em virtude da escolha do melhor ponto de corte calculado a partir da curva ROC houve um aumento significativo em todas as amostras de tecido com câncer quando comparadas ao grupo HPB o que podem qualificar estes genes como possíveis marcadores para a formação do câncer. Este resultado é muito importante e pode ter uma grande relevância clínica.

Considerando o enorme progresso nestes últimos anos sobre a origem e manutenção do câncer de próstata, ainda é preciso continuar os avanços nas áreas de pesquisa que facilitem estratégias eficazes para a prevenção, diagnósticos e tratamento para CaP. Entre os desafios para estudos futuros estão o de integrar os estudos epidemiológicos com investigações moleculares e análises clínicas, descobrir novos marcadores tumorais facilitando o diagnóstico e diminuindo as intervenções cirúrgicas.

CONCLUSÕES

Apesar do *n* reduzido de cultura de células, nossos dados sugerem um aumento na proliferação celular de células prostáticas epiteliais e estromais em cultura de células primárias observado no terceiro dia de cultura quando tratadas com diidritestosterona, sugerindo que os androgênios participam da proliferação das células de hiperplasia prostática benigna.

Após as células prostáticas epiteliais e estromais serem tratadas com diferentes concentrações de DHT não houve alteração na expressão dos genes MDM2, p53, p21, Bcl2 e Bax, sugerindo que os androgênios não participam na regulação da expressão destes genes. Talvez não foi possível observar uma diferença na expressão destes genes pelo fato do número de amostras de cultura serem reduzidos.

Dentre os genes estudados foi possível observar um aumento significativo na expressão dos genes MDM2, p53, p21 e Bcl2 no grupo CaP quando comparado ao grupo HPB, sugerindo um papel importante destes genes no desenvolvimento deste tumor. Já a expressão do gene Bax não mostrou diferença entre os grupos avaliados, a partir deste resultado podemos sugerir que este gene pode estar sofrendo degradação mediada por MDM2.

A partir da escolha do melhor ponto de corte da curva ROC, os genes MDM2, p53, p21, Bcl2 e Bax apresentaram um aumento na razão de chance do indivíduo ter

CaP, indicando estes genes como possíveis marcadores de CaP, principalmente o MDM2 que apresentou uma razão de chance de 69 vezes.

Para confirmar o diagnóstico, a análise em série se mostrou melhor do que a análise em paralelo, pois a especificidade foi muito boa, em torno de 90%. Uma análise em série com o PSA melhora o resultado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaltomaa, S., P. Lipponen, et al. (1999). "Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer." *Prostate* **39**(1): 8-15.
- Abdel-Fattah, G., B. Yoffe, et al. (2000). "MDM2/p53 protein expression in the development of colorectal adenocarcinoma." *J Gastrointest Surg* **4**(1): 109-114.
- Agus, D. B., C. Cordon-Cardo, et al. (1999). "Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence." *J Natl Cancer Inst* **91**(21): 1869-1876.
- Amatya, V. J., Y. Takeshima, et al. (2001). "Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas." *Hum Pathol* **32**(9): 970-975.
- Anvari, K., M. Seilanian Toussi, et al. (2012). "Expression of bcl-2 and bax in advanced or metastatic prostate carcinoma." *Urol J* **9**(1): 381-388.
- 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): 1258-1262.
- 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.
- Balk, S. P. and K. E. Knudsen (2008). "AR, the cell cycle, and prostate cancer." *Nucl Recept Signal* **6**: e001.
- Barak, Y., T. Juven, et al. (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." *EMBO J* **12**(2): 461-468.
- Basu, A. and S. Haldar (1998). "The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death." *Mol Hum Reprod* **4**(12): 1099-1109.
- Beham, A. W., M. Sarkiss, et al. (1998). "Molecular correlates of bcl-2-enhanced growth following androgen-ablation in prostate carcinoma cells in vivo." *Int J Mol Med* **1**(6): 953-959.
- Berry, P. A., N. J. Maitland, et al. (2008). "Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells." *Mol Cell Endocrinol* **288**(1-2): 30-37.
- Berthaut, I., M. C. Portois, et al. (1996). "Human prostatic cells in culture: different testosterone metabolic profile in epithelial cells and fibroblasts from normal or hyperplastic prostates." *J Steroid Biochem Mol Biol* **58**(2): 235-242.

- 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): 910-916.
- 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): 319-326.
- Bond, G. L., W. Hu, et al. (2005). "MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting." Curr Cancer Drug Targets **5**(1): 3-8.
- Bookstein, R., D. MacGrogan, et al. (1993). "p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers." Cancer Res **53**(14): 3369-3373.
- Bromfield, G. P., A. Meng, et al. (2003). "Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill." Prostate Cancer Prostatic Dis **6**(1): 73-85.
- 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): 209-214.
- Buchynska, L. G. and I. P. Nesina (2006). "Expression of the cell cycle regulators p53, p21(WAF1/CIP1) and p16(INK4a) in human endometrial adenocarcinoma." Exp Oncol **28**(2): 152-155.
- Bull, J. H., G. Ellison, et al. (2001). "Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray." Br J Cancer **84**(11): 1512-1519.
- Bushman, W. (2009). "Etiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia." Urol Clin North Am **36**(4): 403-415, v.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-193.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.
- Buttayan, R., A. Shabsigh, et al. (1999). "Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids." Trends Endocrinol Metab **10**(2): 47-54.
- Carson, C., 3rd and R. Rittmaster (2003). "The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia." Urology **61**(4 Suppl 1): 2-7.
- Catz, S. D. and J. L. Johnson (2003). "BCL-2 in prostate cancer: a minireview." Apoptosis **8**(1): 29-37.
- Ceccarelli, C., D. Santini, et al. (2001). "Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators." Int J Cancer **95**(2): 128-134.
- Chene, P. (2003). "Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(2): 102-109.
- Cheng, L., R. V. Lloyd, et al. (2000). "The cell cycle inhibitors p21WAF1 and p27KIP1 are associated with survival in patients treated by salvage prostatectomy after radiation therapy." Clin Cancer Res **6**(5): 1896-1899.
- Cronauer, M. V., W. A. Schulz, et al. (2004). "Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines." Oncogene **23**(20): 3541-3549.
- Cunha, G. R. (2008). "Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future." Differentiation **76**(6): 578-586.

- Daneshgari, F. and E. D. Crawford (1993). "Endocrine therapy of advanced carcinoma of the prostate." *Cancer* **71**(3 Suppl): 1089-1097.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* **116**(2): 205-219.
- De Marzo, A. M., W. G. Nelson, et al. (1998). "Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells." *J Urol* **160**(6 Pt 2): 2381-2392.
- Degraff, D. J., A. A. Aguiar, et al. (2010). "Androgen mediated translational and postranslational regulation of IGFBP-2 in androgen-sensitive LNCaP human prostate cancer cells." *Am J Transl Res* **2**(2): 200-208.
- Delos, S., J. L. Carsol, et al. (1998). "5alpha-reductase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in epithelial cells from hyperplastic and malignant human prostate." *Int J Cancer* **75**(6): 840-846.
- Downing, S. R., P. J. Russell, et al. (2003). "Alterations of p53 are common in early stage prostate cancer." *Can J Urol* **10**(4): 1924-1933.
- Dumble, M. L., B. Knight, et al. (2001). "Hepatoblast-like cells populate the adult p53 knockout mouse liver: evidence for a hyperproliferative maturation-arrested stem cell compartment." *Cell Growth Differ* **12**(5): 223-231.
- Dutt, S. S. and A. C. Gao (2009). "Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression." *Future Oncol* **5**(9): 1403-1413.
- Eastham, J. A., A. M. Stapleton, et al. (1995). "Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer." *Clin Cancer Res* **1**(10): 1111-1118.
- el-Deiry, W. S., J. W. Harper, et al. (1994). "WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis." *Cancer Res* **54**(5): 1169-1174.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* **75**(4): 817-825.
- Eliyahu, D., D. Michalovitz, et al. (1989). "Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8763-8767.
- Fang, S., J. P. Jensen, et al. (2000). "Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53." *J Biol Chem* **275**(12): 8945-8951.
- Fernandez, A., T. Udagawa, et al. (2001). "Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2." *J Natl Cancer Inst* **93**(3): 208-213.
- Finlay, C. A., P. W. Hinds, et al. (1989). "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation." *Cell* **57**(7): 1083-1093.
- Fizazi, K., L. A. Martinez, et al. (2002). "The association of p21(WAF-1/CIP1) with progression to androgen-independent prostate cancer." *Clin Cancer Res* **8**(3): 775-781.
- Fizazi K., M. L. A., Sikes C.R. (2000). "The association of p21(WAF-1/CIP1) with progression to androgen-independent prostate cancer." *Clin Cancer Res* **8**: 775-781.
- Gao, X., A. T. Porter, et al. (1997). "Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. Therapeutic implications." *Adv Exp Med Biol* **407**: 41-53.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." *Mol Cancer Ther* **1**(8): 639-649.
- Girinsky, T., C. Koumenis, et al. (1995). "Attenuated response of p53 and p21 in primary cultures of human prostatic epithelial cells exposed to DNA-damaging agents." *Cancer Res* **55**(17): 3726-3731.

- Gobinet, J., N. Poujol, et al. (2002). "Molecular action of androgens." Mol Cell Endocrinol **198**(1-2): 15-24.
- Gompel, A., D. Levy, et al. (2001). "Apoptosis and aging: breast cells and apoptosis." Maturitas **38**(1): 39-44.
- Hahm, H. A. and N. E. Davidson (1998). "Apoptosis in the mammary gland and breast cancer." Endocrine-Related Cancer **5**: 199.
- Harris, S. L. and A. J. Levine (2005). "The p53 pathway: positive and negative feedback loops." Oncogene **24**(17): 2899-2908.
- 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 (2004). "Androgen receptor in prostate cancer." Endocr Rev **25**(2): 276-308.
- Hemminki, K. and K. Czene (2002). "Age specific and attributable risks of familial prostate carcinoma from the family-cancer database." Cancer **95**(6): 1346-1353.
- Higuchi, R., C. Fockler, et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-1030.
- Hirata, H., Y. Hinoda, et al. (2007). "MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **13**(14): 4123-4129.
- Honda, R. and H. Yasuda (2000). "Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase." Oncogene **19**(11): 1473-1476.
- Hsing, A. W., L. Tsao, et al. (2000). "International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality." Int J Cancer **85**(1): 60-67.
- Huggett, J., K. Dheda, et al. (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-284.
- Imperato-McGinley, J., L. Guerrero, et al. (1974). "Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism." Science **186**(4170): 1213-1215.
- INCA, I. N. d. C. (2012). "Estimativa 2012. Incidência de câncer no Brasil." Retrieved 26 de janeiro.
- Isaacs, J. T. (1994). "Etiology of benign prostatic hyperplasia." Eur Urol **25** **Suppl 1**: 6-9.
- Isaacs, J. T. (1999). "The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop?" Urol Clin North Am **26**(2): 263-273.
- Ittmann, M., R. Wiczorek, et al. (1994). "Alterations in the p53 and MDM-2 genes are infrequent in clinically localized, stage B prostate adenocarcinomas." Am J Pathol **145**(2): 287-293.
- Jacobsen, S. J., C. J. Girman, et al. (2001). "Natural history of benign prostatic hyperplasia." Urology **58**(6 Suppl 1): 5-16; discussion 16.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Ji, K., B. Wang, et al. (2011). "Synergistic suppression of prostatic cancer cells by coexpression of both murine double minute 2 small interfering RNA and wild-type p53 gene in vitro and in vivo." J Pharmacol Exp Ther **338**(1): 173-183.

- Jiang, P., J. Liu, et al. (2010). "Role of p53 and p21 polymorphisms in the risk of cervical cancer among Chinese women." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **42**(9): 671-676.
- 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): 237-249.
- 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.
- Jung, J. M., J. M. Bruner, et al. (1995). "Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors." Oncogene **11**(10): 2021-2028.
- 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): 1429-1431.
- Ko, L. J. and C. Prives (1996). "p53: puzzle and paradigm." Genes Dev **10**(9): 1054-1072.
- Kolar, Z., P. G. Murray, et al. (2000). "Relation of Bcl-2 expression to androgen receptor, p21WAF1/CIP1, and cyclin D1 status in prostate cancer." Mol Pathol **53**(1): 15-18.
- Komarova, E. A. and A. V. Gudkov (2000). "Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy." Biochemistry (Mosc) **65**(1): 41-48.
- Krajewska, M., S. Krajewski, et al. (1996). "Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers." Am J Pathol **148**(5): 1567-1576.
- Krajewski, S., C. Blomqvist, et al. (1995). "Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma." Cancer Res **55**(19): 4471-4478.
- Kruse, J. P. and W. Gu (2009). "Modes of p53 regulation." Cell **137**(4): 609-622.
- Kubbutat, M. H., S. N. Jones, et al. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." Nature **387**(6630): 299-303.
- Lamont, K. R. and D. J. Tindall (2010). "Androgen regulation of gene expression." Adv Cancer Res **107**: 137-162.
- Lee, C., J. M. Kozlowski, et al. (1995). "Etiology of benign prostatic hyperplasia." Urol Clin North Am **22**(2): 237-246.
- 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.
- Lee, K. L. and D. M. Peehl (2004). "Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia." J Urol **172**(5 Pt 1): 1784-1791.
- Lee, M. H., I. Reynisdottir, et al. (1995). "Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution." Genes Dev **9**(6): 639-649.
- Leite, K. R., M. F. Franco, et al. (2001). "Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma." Mod Pathol **14**(5): 428-436.

- Li, B. and Q. P. Dou (2000). "Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 3850-3855.
- Li, X., M. Marani, et al. (2001). "Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer." Cancer Res **61**(1): 186-191.
- Lin, Y., J. Kokontis, et al. (2006). "Androgen and its receptor promote Bax-mediated apoptosis." Mol Cell Biol **26**(5): 1908-1916.
- 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): 287-296.
- Loewer, A., E. Batchelor, et al. (2010). "Basal dynamics of p53 reveal transcriptionally attenuated pulses in cycling cells." Cell **142**(1): 89-100.
- 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): 6630-6640.
- 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): 376-384.
- 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): 935-944.
- Martinez, L. A., Sikes, C.R., Tsieh, J.T., Navone, N.M. (2000). "Role of p21 Waf1/CIP1 in prostate cancer drug resistance." Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **41**: 251.
- Matsushima, H., T. Sasaki, et al. (1998). "Immunohistochemical study of p21WAF1 and p53 proteins in prostatic cancer and their prognostic significance." Hum Pathol **29**(8): 778-783.
- McCarty, M. F. (2004). "Targeting multiple signaling pathways as a strategy for managing prostate cancer: multifocal signal modulation therapy." Integr Cancer Ther **3**(4): 349-380.
- McDonnell, T. J., P. Troncoso, et al. (1992). "Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer." Cancer Res **52**(24): 6940-6944.
- McNeal, J. (1990). "Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology." Urol Clin North Am **17**(3): 477-486.
- Medronho, G. L. W. R. R. L. K. V. B. D. M. d. C. R. d. A. (2002). Epidemiologia Testes diagnósticos. Atheneu. Rio de Janeiro. **1**: 259-270.
- Milner, J. (1997). "Structures and functions of the tumor suppressor p53." Pathol Biol (Paris) **45**(10): 797-803.
- Momand, J. and G. P. Zambetti (1997). "Mdm-2: "big brother" of p53." J Cell Biochem **64**(3): 343-352.
- Momand, J., G. P. Zambetti, et al. (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." Cell **69**(7): 1237-1245.
- 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): 954-958, 960, 962.
- Morsi, H. M., M. P. Leers, et al. (2000). "Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: An

- approach using multiparameter flow cytometry." Gynecol Oncol **77**(1): 11-17.
- 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.
- Moul, J. W. (1999). "Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy." Eur Urol **35**(5-6): 399-407.
- 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): 405-413.
- 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): 2228-2233.
- Neuhouser, M. L., A. R. Kristal, et al. (2004). "Steroid hormones and hormone-related genetic and lifestyle characteristics as risk factors for benign prostatic hyperplasia: review of epidemiologic literature." Urology **64**(2): 201-211.
- Niu, Y., T. M. Chang, et al. (2010). "Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails." Oncogene **29**(25): 3593-3604.
- Niu, Y., Y. Xu, et al. (2001). "Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells." BJU Int **87**(4): 386-393.
- O'Leary MP, W. J., Roehrborn CG, Miner M (2008). "Correlation of the International Prostate Symptom Score bother question with the Benign Prostatic Hyperplasia Impact Index in a clinical practice setting." BJU Int **101**(12): 1531-1535.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-619.
- Omar, E. A., H. Behlouli, et al. (2001). "Relationship of p21(WAF-1) protein expression with prognosis in advanced prostate cancer treated by androgen ablation." Prostate **49**(3): 191-199.
- Oren, M. (1999). "Regulation of the p53 tumor suppressor protein." J Biol Chem **274**(51): 36031-36034.
- Osman, I., M. Drobnyak, et al. (1999). "Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact on tumor progression." Clin Cancer Res **5**(8): 2082-2088.
- Ostrakhovitch, E. A. and M. G. Cherian (2004). "Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc." Arch Biochem Biophys **423**(2): 351-361.
- Paterson, R. F., M. E. Gleave, et al. (1999). "Immunohistochemical Analysis of Radical Prostatectomy Specimens After 8 Months of Neoadjuvant Hormonal Therapy." Mol Urol **3**(3): 277-286.
- 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): 678-683.
- Platz, E. A., E. Smit, et al. (2002). "Prevalence of and racial/ethnic variation in lower urinary tract symptoms and noncancer prostate surgery in U.S. men." Urology **59**(6): 877-883.

- Raffo, A. J., H. Perlman, et al. (1995). "Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo." Cancer Res **55**(19): 4438-4445.
- Raz, S., M. Zeigler, et al. (1973). "Pharmacological receptors in the prostate." Br J Urol **45**(6): 663-667.
- Reed, J. C. (2002). "Apoptosis-based therapies." Nat Rev Drug Discov **1**(2): 111-121.
- Rigaud, J., R. Tiguert, et al. (2004). "Expression of p21 cell cycle protein is an independent predictor of response to salvage radiotherapy after radical prostatectomy." Prostate **58**(3): 269-276.
- 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): 257-266.
- Roehrborn, C. G. (2005). "Benign prostatic hyperplasia: an overview." Rev Urol **7 Suppl 9**: S3-S14.
- Roehrborn, C. G. (2011). "Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH)." Med Clin North Am **95**(1): 87-100.
- Roth, J., M. Dobbstein, et al. (1998). "Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein." EMBO J **17**(2): 554-564.
- Royuela, M., M. I. Arenas, et al. (2001). "Immunoexpressions of p21, Rb, mcl-1 and bad gene products in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostates." Eur Cytokine Netw **12**(4): 654-663.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-386.
- Saidi, S., V. Georgiev, et al. (2011). "Evaluation of the value of p53 protein expression in the extra-capsular extension of prostate cancer." Prilozi **32**(2): 213-220.
- Sarkar, F. H., Y. Li, et al. (1999). "Relationship of p21(WAF1) expression with disease-free survival and biochemical recurrence in prostate adenocarcinomas (PCa)." Prostate **40**(4): 256-260.
- Schalken, J. A. and G. van Leenders (2003). "Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology." Urology **62**(5 Suppl 1): 11-20.
- Schneider, L., G. Branchini, et al. (2009). "Gene and protein expression of p53 and p21 in fibroadenomas and adjacent normal mammary tissue." Endocrine **35**(1): 118-122.
- Selvankumaran M, Lin HK, et al. (1994). "Immediate early upregulation of bax expression by p53 but not TGFb1: A paradigm for distinct apoptotic pathways." Oncogene **9**: 1791.
- Shanmugam, C., V. R. Katkooi, et al. (2008). "p53 Nuclear accumulation and Bcl-2 expression in contiguous adenomatous components of colorectal adenocarcinomas predict aggressive tumor behavior." J Histochem Cytochem **56**(3): 305-312.
- Shenk, J. L., C. J. Fisher, et al. (2001). "p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction." J Biol Chem **276**(42): 38472-38479.
- 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): 153-169.

- Silva Neto, B., W. J. Koff, et al. (2008). "Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population." Cancer Invest **26**(1): 74-80.
- 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.
- Somasundaram, K., H. Zhang, et al. (1997). "Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1." Nature **389**(6647): 187-190.
- Sonnenschein, C., N. Olea, et al. (1989). "Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens." Cancer Res **49**(13): 3474-3481.
- Soussi, T. and C. Beroud (2001). "Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome." Nat Rev Cancer **1**(3): 233-240.
- Stewart, Z. A. and J. A. Pietenpol (2001). "p53 Signaling and cell cycle checkpoints." Chem Res Toxicol **14**(3): 243-263.
- Tai, Y. T., S. Lee, et al. (1998). "BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer." J Clin Oncol **16**(8): 2583-2590.
- Taj, M. M., R. J. Tawil, et al. (2001). "Mxi1, a Myc antagonist, suppresses proliferation of DU145 human prostate cells." Prostate **47**(3): 194-204.
- Tao, W. and A. J. Levine (1999). "Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3077-3080.
- 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): 116-121.
- Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-310.
- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Waltregny, D., I. Leav, et al. (2001). "Androgen-driven prostate epithelial cell proliferation and differentiation in vivo involve the regulation of p27." Mol Endocrinol **15**(5): 765-782.
- Wang, X., L. Yin, et al. (2007). "Targeted treatment of prostate cancer." J Cell Biochem **102**(3): 571-579.
- Welsh, J. B., L. M. Sapinoso, et al. (2001). "Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer." Cancer Res **61**(16): 5974-5978.
- Wolf, A. M., R. C. Wender, et al. (2010). "American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010." CA Cancer J Clin **60**(2): 70-98.
- Wright, A. S., R. C. Douglas, et al. (1999). "Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase." Endocrinology **140**(10): 4509-4515.
- Wu, X., J. H. Bayle, et al. (1993). "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." Genes Dev **7**(7A): 1126-1132.
- Xie, X., P. De Angelis, et al. (1999). "Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas." Oral Oncol **35**(5): 502-509.

- Yoshino, T., H. Shiina, et al. (2006). "Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy." *Clin Cancer Res* **12**(20 Pt 1): 6116-6124.
- Yu, D. K., Y. L. Guo, et al. (2010). "[Functional Bax polymorphism associated with lung cancer susceptibility]." *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **32**(5): 324-327.
- Zellweger, T., C. Ninck, et al. (2003). "Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer." *Prostate* **55**(1): 20-29.
- Zhang, Z., M. Li, et al. (2003). "Antisense therapy targeting MDM2 oncogene in prostate cancer: Effects on proliferation, apoptosis, multiple gene expression, and chemotherapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11636-11641.
- Zong, L., P. Chen, et al. (2012). "Correlation between P53 expression and malignant risk of gastrointestinal stromal tumors: evidence from 9 studies." *Eur J Surg Oncol* **38**(3): 189-195.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título: Análise da modulação androgênica da proliferação celular e expressão de genes alvo em hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar a formação de tumores. Como o Sr. tem o diagnóstico de _____(hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendado cirurgia, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que após retirada da peça cirúrgica dois pequenos fragmentos da mesma (10mm x 5mm) sejam encaminhados para estudo genético. O restante do nódulo da próstata será destinado ao exame histológico normal. Portanto

não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia.

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

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

Os pesquisadores responsáveis por este projeto são Prof^a. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (51 33083559) e MsC. Lolita Schneider Pizzolato (51 91800991). Caso o senhor tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada e, das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data: _____

Paciente ou responsável: _____

Pesquisador: _____

ANEXO 2

Artigo submetido ao periódico *Pathology & Onology Research* como um dos pré-requisitos para defesa da tese de doutorado para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Lolita Schneider Pizzolato^{1,2}, Gisele Branchini ^{1,2}, Ana Caroline Hillebrand ^{1,2}, Ana Paula Santin ^{1,2}, Patricia Borba Martiny^{1,2}, Vanderlei Biolchi ^{1,2}, Brasil Silva Neto³, Milton Berger³, Ilma Simoni Brum ^{1,2}§

Differential expression of cell cycle regulatory genes involved in the development prostate cancer

1- Laboratory of Molecular, Endocrine and Tumor Biology, Department of Physiology – UFRGS, Porto

Alegre, RS, Brazil;

2- Laboratory of Molecular Gynecology and Obstetrics, Research Center – HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil;

3- Department of Urology – HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

§Corresponding author

E-mail address: Ilma@ufrgs.br

Tel: + 55 51 33083671

FAX: + 55 51 33083656

Abstract

The two forms clinically most important and most prevalent of abnormal growth prostate gland are benign prostate hyperplasia and prostate cancer. Prostate cancer is the second type of cancer most frequent between men Brazilians. The benign prostate hyperplasia is the most common proliferative abnormality of the prostate gland and is age-related. These diseases are the result of changes in cell cycle that is maintained by two processes: proliferation and apoptosis. The apoptosis is regulated by expression and activity of gene products, among them are genes p53, MDM2, p21, Bcl2 and Bax. The aim of the present study was to compare the gene expression of Bcl2, Bax, p53, MDM2 and p21 between PCa and BPH tissue of human and evaluate the risk to develop PCa. We evaluated 25 prostate tissue samples with prostate cancer and 25 samples with benign prostatic hyperplasia. The mRNA expression was evaluated by qRT-PCR for each target gene after normalization. All genes showed an increased expression when compared to benign prostatic hyperplasia group, except Bax gene that showed similar expression in both groups. Based on these results we suggest that changes in expression of these genes may play an important role in the development, progression and maintenance of prostate cancer. There was a significant increase in the chances to develop PCa in MDM2, p53, p21, Bcl2 and Bax, indicating these genes as markers possible for the formation of prostate cancer.

Keywords: Prostate, benign prostatic hyperplasia, cancer, gene expression.

Introduction

Changes in prostate tissue appear with advancing age, together with other diseases of the prostate. The two forms clinically most important and most prevalent of abnormal growth of the prostate gland are benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa) (Daneshgari and Crawford 1993). Prostate cancer is a major cause of morbidity and mortality among men, being the most common cancer and the second in deaths in the United States (Jemal, Siegel et al. 2008). Prostate cancer is the second type of cancer most frequent among Brazilian men's, only behind non-melanoma skin cancer (INCA 2012). In the year 2009 were confirmed 12.274 deaths caused by PCa and is planned an estimate of 60.180 new cases for the year 2012. In the state of Rio Grande do Sul, the estimate provided is 4.270 new cases (INCA 2012).

Among the proliferative abnormalities of the prostate gland the BPH is the most common and is associated with age and is very frequent in the period of senescence (Silva Neto, Koff et al. 2008). There is no concrete data on the estimation of BPH, because diagnostics criteria are not uniform (Neuhouser, Kristal et al. 2004). Benign prostatic hyperplasia is characterized, histologically, by the increase in the growth of epithelial glandular and stromal tissue around the urethra, with a nodular growth located in the transition zone or periurethral (McNeal 1990; Carson and Rittmaster 2003), resulting in a non-malignant proliferative process (Bushman 2009).

The cell cycle regulation is maintained by two processes: proliferation and apoptosis. Apoptosis is one of the main mechanism of programmed cell death in response to cancer therapies (Danial and Korsmeyer 2004). Programmed cell death is regulated by expression and activity of gene products (Buttayan, Shabsigh et al. 1999) among them are genes p53, p21 and of the family Bcl2.

The family Bcl2 is composed by proteins of opposite functions, interacting with each other to maintain a balance between cell survival and apoptosis, among them are Bcl2 and Bax. Bcl2 is antiapoptotic and is involved in several pathways of prostate carcinogenesis, suggesting its involvement in the inhibition of apoptosis and/or in stimulation of tumor angiogenesis (Fernandez, Udagawa et al. 2001). Bax is a proapoptotic protein (Oltvai, Milliman et al. 1993; Li, Marani et al. 2001) and its expression is found mainly in secretory epithelial cells of prostate gland therefore more vulnerable to apoptosis caused by androgen deprivation (Krajewska, Krajewski et al. 1996). Dimerization between molecules antiapoptotic and proapoptotic determines if the result will be proliferation or apoptosis. Homodimers Bax/Bax act as promoters of apoptosis and heterodimers Bcl2/Bax act as proliferatives

(Reed 2002; Catz and Johnson 2003), thus the balance between these proteins will determine whether the cell proliferates or dies.

Gene p53 is considered a tumor suppressor gene, its function is to arrest the cell cycle in G1 phase in the presence of a cellular stress to promote DNA repair or trigger apoptosis (Stewart and Pietenpol 2001). Mutations in the p53 gene were associated with an advanced prostate cancer (Bookstein, MacGrogan et al. 1993; Eastham, Stapleton et al. 1995; Osman, Drobnjak et al. 1999). In normal cells not stressed the p53 remains inactive and in very low concentrations as a result of an interaction with MDM2 protein (Tao and Levine 1999).

MDM2 is an oncoprotein and is transcriptionally activated by p53 (Barak, Juven et al. 1993). In normal cellular conditions, p53 is constantly degraded by MDM2 (Kubbutat, Jones et al. 1997) this event is controlled by a feedback loop self-regulatory (Kruse and Gu 2009). The increased expression of MDM2 protein appears to have negative consequences for the cell, because it reduces its ability to activate the p53 pathway in conditions of cellular stress. Several researchers have observed an increase in the expression of MDM2 in human prostate cancer (Ittmann, Wiczorek et al. 1994; Gao, Porter et al. 1997; Osman, Drobnjak et al. 1999; Leite, Franco et al. 2001). The overexpression of MDM2 in these tumors can be an important factor for the survival of tumor, because it reduces the activation of p53. Since the discovery of p53 as a specific sequence of transcription factor, it has been identified a lot of genes and regulated pathways by this protein. The interruption of cell growth mediated by p53 results from the transactivation of p21 to p53-dependent (el-Deiry, Tokino et al. 1993).

The p21 acts as a regulator of cell cycle progression in G1, promoting an interruption of DNA synthesis and leading to a cell cycle arrest. This protein may play a regulatory role in the S phase of cellular duplication and in the DNA repair (Gompel, Levy et al. 2001). The p21 gene has binding sites for p53 (Lee, Reynisdottir et al. 1995) indicating that in prostate cells, the p21 expression may be increased by the direct action of p53 (Macleod, Sherry et al. 1995). The expression of p21 occurs in PCa and has been associated with clinical outcome of this neoplasia (Matsushima, Sasaki et al. 1998; Aaltomaa, Lipponen et al. 1999; Cheng, Lloyd et al. 2000; Fizazi K. 2000; Omar, Behloul et al. 2001) suggesting that p21 may be an important regulator of the cell cycle involved in the carcinogenesis and progression of PCa.

The aim of the present study was to compare the gene expression of Bcl2, Bax, p53, MDM2 and p21 between PCa and BPH tissue of human and evaluate relative risk of developing prostate cancer.

Patients and Methods

The tissue sample from PCa and BPH were collected on the day of surgical procedure (radical prostatectomy or prostatovesiculectomy for PCa sample and prostatectomy for BPH). Patients were recruited from the Department of Urology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Prostate cancer and BPH diagnosis were confirmed by anatomic pathology test. The patients selected were not treated with hormone therapy or chemotherapy, and did not have other concomitant neoplasia. All the patients provided written consent to participate in the study. The present study was approved by the Research Ethics Committee of the HCPA.

Total RNA extraction

Total RNA was extracted using the reagent Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) followed the manufacturer's protocol. Total RNA was quantified by the NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) at 260 and 280 nm wavelengths.

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA with Oligo (DT)₁₂₋₁₈ primer, using the SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol.

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction was performed using Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). cDNA samples were amplified on StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a total volume of 12.5 µL (6.25 µL of SuperMix, 1 µL of 50 µmol l⁻¹ Rox Dye, 0.1 µL of each primer [10 µmol l⁻¹ forward and 10 µmol l⁻¹ reverse]) 1 µL of 100X diluted sample, and 4.05 µL of water. Quantification of amplified samples was performed based on amplification of a standard curve (serial dilution of 4 ng/µL standard cDNA).

The primers MDM2, p53, p21 and Bax were designed with PrimeTime qPCR Assay Entry (IDT, Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA), and the primers Bcl2 and BMG were designed with Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000) and synthesized by IDT (Fig 1).

Statistical analysis

The gene expression data of all genes analyzed in samples of prostate tissue are not present normal distribution and was evaluated by Mann-Whitney test. The chi-square test was performed to calculate relative risk (OD – odds ratio).

The gene expression was considered significant when $P < 0.05$. All the analyzes were performed using the data processor SPSS 20 (Statistical Package for the Social Sciences).

Results

The average age of the patients were 65.52 ± 7.97 to the group BPH e 63.64 ± 7.22 to the group PCa, varying from 51 to 82 years and 46 to 74, respectively. There was no statistical difference in age between groups ($P=0.241$).

We evaluated 25 prostate tissue samples with prostate cancer and 25 samples with benign prostatic hyperplasia. The mRNA expression was evaluated by qRT-PCR for each target gene after normalization. The gene expression of MDM2, p53, p21, Bcl2 and Bax was given as median (percentile 25% - 75%) units arbitárias.

Tissue expression of mRNA of MDM2 was 1.17 (0.46 – 2.25) in the group BPH and 4.59 (3.74 – 5.18) in the group PCa. The gene expression of MDM2 was higher in patients with PCa ($*P=0.001$) compared to group BPH (Fig2).

The mRNA expression of p53 gene was 1.01 (0.32 – 2.00) in the group BPH and 5.23 (2.85 – 7.44) in the group PCa. p53 gene expression was higher in patients with PCa ($*P=0.001$) when compared with the group BPH (Fig3).

Tissue expression of mRNA of p21 was 0.40 (0.07 – 3.67) in the group BPH and 6.26 (4.60 – 11.63) in the group PCa. The gene expression of p21 was higher in patients with PCa ($*P=0.001$) compared to group BPH (Fig4).

Tissue expression of mRNA of Bcl2 was 1.23 (0.33 – 2.92) in the group BPH and 4.15 (2.62 – 7.43) in the group PCa. Bcl2 gene expression was higher in patients with PCa ($*P=0.001$) when compared to group BPH (Fig5).

The mRNA expression of Bax was 0.90 (0.60 – 1.60) in the group BPH and 1.15 (0.94 – 1.84) in the group with PCa. The gene expression of Bax ($P=0.327$) showed no statistically significant differences between PCa and BPH groups (Fig6).

Thinking about a possible clinical utilization of the expression of these genes as markers of PCa was calculated a ROC curve in order to find the value with best response to sensitivity and specificity between the groups PCa and BPH, with the purpose of use these results to analyze the chance of developing PCa by analysis of a negative prostate biopsy.

The values calculated to the cut point from the ROC curve for MDM2 was 2.89, for p53 was 2.18, for p21 was 4.20, for Bcl2 was 2.38 and for Bax was 0.954. Based on these values, the individuals that present mensurations higher than the cut point have increased chance of developing PCa. Our results showed that individuals that present the MDM2 expression higher than 2.89 have the chance of developing PCa increased in 69 fold. For the gene expression of p53, p21, Bcl2 and Bax, when presenting an expression higher than the cut point the chances of developing PCa increases to 15, 31, 17 and 4 fold respectively, as shown in fig7.

Discussion

The incidence of PCa is high and increases with age. The incidence and prevalence of this disease are the result of several factors. Some factors are considered a risk for develop the PCa, for example, family history, age, race and genetic factors (Huggins and Hodges 2002). In this study we demonstrate a statistically significant increase in gene expression MDM2, p53, p21 and Bcl2 in the group PCa when compared with the group BPH, but there was no statistical difference in the expression of Bax between groups.

In many tumor p53 are increased to attempt to suppress the tumor, but mutations in this gene may be associated with prostate cancer late (Downing, Russell et al. 2003). Increased expression of p53 can prevent the transformation, while inactivation of p53 makes the cells lose their differentiation (Eliyahu, Michalovitz et al. 1989; Finlay, Hinds et al. 1989). Study with samples of colorectal adenocarcinoma, evaluated by immunohistochemistry, showed an increase in nuclear accumulation of p53, suggesting that in the presence of accumulation of p53, colorectal adenocarcinomas are more likely to be aggressive (Shanmugam, Katkoori et al. 2008). Protein expression of p53 was evaluated in samples of patients undergoing radical prostatectomy, and the results showed a direct correlation of the protein

expression with the malignant tumor, suggesting that p53 could be used as a biomarker in determining the malignancy of PCa (Saidi, Georgiev et al. 2011). According to findings in the literature, our results suggest that genomic alterations may be associated with neoplastic transformation.

MDM2 is activated by p53 (Barak, Juven et al. 1993), that inhibits p53 and this event is controlled by a feedback loop self-regulatory (Wu, Bayle et al. 1993; Bond, Hu et al. 2005; Kruse and Gu 2009). Low levels of MDM2 and p53 into the cell indicate good functioning of this regulation (Soussi and Beroud 2001), but in the present study was demonstrated an increase in gene expression of MDM2 and p53, indicating a malfunctioning cell that can generate a series of negative consequences to the cell, such as uncontrolled cell proliferation and inhibition of apoptosis. Leite and colleagues evaluated the expression of MDM2 and p53 by immunohistochemistry in samples of patients undergoing radical prostatectomy and observed increased expression of MDM2 suggesting that MDM2 may play a role in prostate cancer, and this same research group has demonstrated that p53-positivo/MDM2-positivo phenotype may indicate an aggressive prostate tumor (Leite, Franco et al. 2001). Any change in the expression of MDM2 deregulates the expression of p53 which consequently may play an important role in cancer development.

The p53 acts on several other genes including p21. The abnormal expression of p21 has been observed in PCa (Rigaud, Tiguert et al. 2004). Researchers with *in vitro* data, suggest that p21 modulates apoptosis induced by p53, as well as the cell survival in prostate cancer after exposure to DNA damaging agents and growth factor deprivation (Martinez 2000). Study of the expression of mRNA and protein p53 and p21, in samples fibroadenomas, analyzed by RT-PCR, showed an increase in gene expression of p53 and p21 when compared with normal breast tissue (Schneider, Branchini et al. 2009). The majority of gliomas with different levels of malignancy that present both wild-type and mutant p53 express high levels of p21 (Jung, Bruner et al. 1995). As a member of the family CDK1, p21 can act as a tumor suppressor protein, therefore, the loss of its function may be correlated with proliferative disorders. Authors show that there is evidence that the increased expression of p21 is correlated with a bad development in prostate tumors (Sarkar, Li et al. 1999; Amatya, Takeshima et al. 2001; Fizazi, Martinez et al. 2002). Royuela and colleagues observe an increase in expression of p21 in samples of prostatic tissue with proliferative lesions (Royuela, Arenas et al. 2001). A study by immunohistochemistry to verify the relationship between the expression of p21 and Bcl2 in samples of prostate cancer the result

showed a positive relationship between the expression of Bcl2 and p21 suggesting that p21 expression can be modulated by Bcl2 in PCa (Kolar, Murray et al. 2000).

Increased expression of Bcl2, more than 30% of cases of PCa, is correlated with an advanced stage and poor prognosis of cancer (Raffo, Perlman et al. 1995; Moul 1999; McCarty 2004). This increased expression of Bcl2 was also observed in primary prostate cancer and a high chance of disease recurrence after radical prostatectomy (Yoshino, Shiina et al. 2006). Studies have shown that the increased expression of Bcl2 is associated with a high degree of Gleason score in patients with advanced PCa undergoing androgen deprivation therapy, in contrast to Bax that showed no association with Gleason score (Anvari, Seilanian Toussi et al. 2012).

Li and Dou evaluated tissue samples of human prostate adenocarcinoma showed increased levels of Bax degradation correlated well with decreased levels of Bax protein and increased Gleason scores of prostate cancer, these results suggest that the degradation of Bax is a mechanism of survival of tumor cells (Li and Dou 2000). The mechanism of degradation of Bax may explain why we found no significant difference on the gene expression Bax. Prostate cancer cells presenting the androgen receptor blocked show an increase in the regulation of Bax and consequently increases apoptosis (Lin, Kokontis et al. 2006). When p53 is activated in response to some stress or DNA damage cell, a complex regulatory network is triggered. The expression of proapoptotic genes, as Bax, is increased by p53 (Ko and Prives 1996). The dimerization between the Bcl2 family proteins by selective transcription of Bax should be lead the cell to apoptosis, but other post-transcriptional factors, yet unknown, may have acted to prevent the proapoptotic action of Bax, which could lead to the transformation of these cells to a stage carcinoma.

In this study we calculated the chance of developing prostate cancer by the frequencies of the genes expression. By virtue of choice of the best cut point calculated from the ROC curve there was significant increase in all samples. This was confirmed by the increased risk of developing PCa in all genes analyzed, varying from 4 to 69 folds that may qualify these genes as possible markers for the formation of prostate cancer. This result is very important because it can have a great clinical relevance.

There are in the literature studies associating the expression of genes with the risk of developing cancer. For example, in a study of Hirata and colleagues, in 2007, showed a significant association between functional polymorphisms in MDM2 and increased risk of developing renal cancer (Hirata, Hinoda et al. 2007). Studies have evaluated the expression of p53 with the risk to develop gastrointestinal stromal tumors and was observed a correlation between the increased expression of p53 with increased

risk of develop gastrointestinal stromal tumors (Zong, Chen et al. 2012). Another study suggested a significant association between the polymorphic variants of p53 at codon 72 and p21 at codon 31 and the risk of cervical cancer (Jiang, Liu et al. 2010). Yu and colleagues, in 2010, investigated the Bax G(-248)A polymorphism and the lung cancer risk in Chinese population and their results suggested an association of Bax with lung cancer risk (Yu, Guo et al. 2010). The findings of the studies cited corroborate with our results indicating these genes as possible tumor markers.

Still do not know the origin of prostate diseases, but we know that both BPH and PCa are proliferative diseases. By our results we can suggest that the same genes may be associated with the proliferation of both, but with different levels of expression. Thus, our results contribute to the knowledge of the mechanisms of cell cycle control and cell proliferation in the development of prostatic diseases, of how proliferation is regulated and how it is deregulated in PCa. With the knowledge of the molecular pathways involved in tumor development, there is the possibility to develop new methods for the prevention of prostatic diseases.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 474847/2008-0), the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE, grant number 07-534) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Aaltomaa, S., P. Lipponen, et al. (1999). "Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer." *Prostate* **39**(1): 8-15.
- Agus, D. B., C. Cordon-Cardo, et al. (1999). "Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence." *J Natl Cancer Inst* **91**(21): 1869-1876.

- Amatya, V. J., Y. Takeshima, et al. (2001). "Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas." Hum Pathol **32**(9): 970-975.
- Anvari, K., M. Seilanian Toussi, et al. (2012). "Expression of bcl-2 and bax in advanced or metastatic prostate carcinoma." Urol J **9**(1): 381-388.
- 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): 1258-1262.
- 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.
- Balk, S. P. and K. E. Knudsen (2008). "AR, the cell cycle, and prostate cancer." Nucl Recept Signal **6**: e001.
- Barak, Y., T. Juven, et al. (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." EMBO J **12**(2): 461-468.
- Basu, A. and S. Haldar (1998). "The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death." Mol Hum Reprod **4**(12): 1099-1109.
- Beham, A. W., M. Sarkiss, et al. (1998). "Molecular correlates of bcl-2-enhanced growth following androgen-ablation in prostate carcinoma cells in vivo." Int J Mol Med **1**(6): 953-959.
- Berry, P. A., N. J. Maitland, et al. (2008). "Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells." Mol Cell Endocrinol **288**(1-2): 30-37.
- Berthaut, I., M. C. Portois, et al. (1996). "Human prostatic cells in culture: different testosterone metabolic profile in epithelial cells and fibroblasts from normal or hyperplastic prostates." J Steroid Biochem Mol Biol **58**(2): 235-242.
- 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): 910-916.
- 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): 319-326.
- Bond, G. L., W. Hu, et al. (2005). "MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting." Curr Cancer Drug Targets **5**(1): 3-8.
- Bookstein, R., D. MacGrogan, et al. (1993). "p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers." Cancer Res **53**(14): 3369-3373.
- Bromfield, G. P., A. Meng, et al. (2003). "Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill." Prostate Cancer Prostatic Dis **6**(1): 73-85.
- 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): 209-214.
- Buchynska, L. G. and I. P. Nesina (2006). "Expression of the cell cycle regulators p53, p21(WAF1/CIP1) and p16(INK4a) in human endometrial adenocarcinoma." Exp Oncol **28**(2): 152-155.

- Bull, J. H., G. Ellison, et al. (2001). "Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray." *Br J Cancer* **84**(11): 1512-1519.
- Bushman, W. (2009). "Etiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia." *Urol Clin North Am* **36**(4): 403-415, v.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* **25**(2): 169-193.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J Mol Endocrinol* **29**(1): 23-39.
- Buttayan, R., A. Shabsigh, et al. (1999). "Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids." *Trends Endocrinol Metab* **10**(2): 47-54.
- Carson, C., 3rd and R. Rittmaster (2003). "The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia." *Urology* **61**(4 Suppl 1): 2-7.
- Catz, S. D. and J. L. Johnson (2003). "BCL-2 in prostate cancer: a minireview." *Apoptosis* **8**(1): 29-37.
- Ceccarelli, C., D. Santini, et al. (2001). "Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators." *Int J Cancer* **95**(2): 128-134.
- Chene, P. (2003). "Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **3**(2): 102-109.
- Cheng, L., R. V. Lloyd, et al. (2000). "The cell cycle inhibitors p21WAF1 and p27KIP1 are associated with survival in patients treated by salvage prostatectomy after radiation therapy." *Clin Cancer Res* **6**(5): 1896-1899.
- Cronauer, M. V., W. A. Schulz, et al. (2004). "Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines." *Oncogene* **23**(20): 3541-3549.
- Cunha, G. R. (2008). "Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future." *Differentiation* **76**(6): 578-586.
- Daneshgari, F. and E. D. Crawford (1993). "Endocrine therapy of advanced carcinoma of the prostate." *Cancer* **71**(3 Suppl): 1089-1097.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* **116**(2): 205-219.
- De Marzo, A. M., W. G. Nelson, et al. (1998). "Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells." *J Urol* **160**(6 Pt 2): 2381-2392.
- Degraff, D. J., A. A. Aguiar, et al. (2010). "Androgen mediated translational and postranslational regulation of IGFBP-2 in androgen-sensitive LNCaP human prostate cancer cells." *Am J Transl Res* **2**(2): 200-208.
- Delos, S., J. L. Carsol, et al. (1998). "5alpha-reductase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in epithelial cells from hyperplastic and malignant human prostate." *Int J Cancer* **75**(6): 840-846.
- Downing, S. R., P. J. Russell, et al. (2003). "Alterations of p53 are common in early stage prostate cancer." *Can J Urol* **10**(4): 1924-1933.
- Dumble, M. L., B. Knight, et al. (2001). "Hepatoblast-like cells populate the adult p53 knockout mouse liver: evidence for a hyperproliferative maturation-arrested stem cell compartment." *Cell Growth Differ* **12**(5): 223-231.

- Dutt, S. S. and A. C. Gao (2009). "Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression." Future Oncol **5**(9): 1403-1413.
- Eastham, J. A., A. M. Stapleton, et al. (1995). "Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer." Clin Cancer Res **1**(10): 1111-1118.
- el-Deiry, W. S., J. W. Harper, et al. (1994). "WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis." Cancer Res **54**(5): 1169-1174.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-825.
- Eliyahu, D., D. Michalovitz, et al. (1989). "Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8763-8767.
- Fang, S., J. P. Jensen, et al. (2000). "Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53." J Biol Chem **275**(12): 8945-8951.
- Fernandez, A., T. Udagawa, et al. (2001). "Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2." J Natl Cancer Inst **93**(3): 208-213.
- Finlay, C. A., P. W. Hinds, et al. (1989). "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation." Cell **57**(7): 1083-1093.
- Fizazi, K., L. A. Martinez, et al. (2002). "The association of p21(WAF-1/CIP1) with progression to androgen-independent prostate cancer." Clin Cancer Res **8**(3): 775-781.
- Fizazi K., M. L. A., Sikes C.R. (2000). "The association of p21(WAF-1/CIP1) with progression to androgen-independent prostate cancer." Clin Cancer Res **8**: 775-781.
- Gao, X., A. T. Porter, et al. (1997). "Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. Therapeutic implications." Adv Exp Med Biol **407**: 41-53.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." Mol Cancer Ther **1**(8): 639-649.
- Girinsky, T., C. Koumenis, et al. (1995). "Attenuated response of p53 and p21 in primary cultures of human prostatic epithelial cells exposed to DNA-damaging agents." Cancer Res **55**(17): 3726-3731.
- Gobinet, J., N. Poujol, et al. (2002). "Molecular action of androgens." Mol Cell Endocrinol **198**(1-2): 15-24.
- Gompel, A., D. Levy, et al. (2001). "Apoptosis and aging: breast cells and apoptosis." Maturitas **38**(1): 39-44.
- Hahm, H. A. and N. E. Davidson (1998). "Apoptosis in the mammary gland and breast cancer." Endocrine-Related Cancer **5**: 199.
- Harris, S. L. and A. J. Levine (2005). "The p53 pathway: positive and negative feedback loops." Oncogene **24**(17): 2899-2908.
- 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 (2004). "Androgen receptor in prostate cancer." Endocr Rev **25**(2): 276-308.
- Hemminki, K. and K. Czene (2002). "Age specific and attributable risks of familial prostate carcinoma from the family-cancer database." Cancer **95**(6): 1346-1353.
- Higuchi, R., C. Fockler, et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-1030.

- Hirata, H., Y. Hinoda, et al. (2007). "MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **13**(14): 4123-4129.
- Honda, R. and H. Yasuda (2000). "Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase." Oncogene **19**(11): 1473-1476.
- Hsing, A. W., L. Tsao, et al. (2000). "International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality." Int J Cancer **85**(1): 60-67.
- Huggett, J., K. Dheda, et al. (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-284.
- Huggins, C. and C. V. Hodges (2002). "Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941." J Urol **168**(1): 9-12.
- Imperato-McGinley, J., L. Guerrero, et al. (1974). "Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism." Science **186**(4170): 1213-1215.
- INCA, I. N. d. C. (2012). "Estimativa 2012. Incidência de câncer no Brasil." Retrieved 26 de janeiro.
- Isaacs, J. T. (1994). "Etiology of benign prostatic hyperplasia." Eur Urol **25 Suppl 1**: 6-9.
- Isaacs, J. T. (1999). "The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop?" Urol Clin North Am **26**(2): 263-273.
- Ittmann, M., R. Wiczorek, et al. (1994). "Alterations in the p53 and MDM-2 genes are infrequent in clinically localized, stage B prostate adenocarcinomas." Am J Pathol **145**(2): 287-293.
- Jacobsen, S. J., C. J. Girman, et al. (2001). "Natural history of benign prostatic hyperplasia." Urology **58**(6 Suppl 1): 5-16; discussion 16.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Ji, K., B. Wang, et al. (2011). "Synergistic suppression of prostatic cancer cells by coexpression of both murine double minute 2 small interfering RNA and wild-type p53 gene in vitro and in vivo." J Pharmacol Exp Ther **338**(1): 173-183.
- Jiang, P., J. Liu, et al. (2010). "Role of p53 and p21 polymorphisms in the risk of cervical cancer among Chinese women." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **42**(9): 671-676.
- 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): 237-249.
- 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.
- Jung, J. M., J. M. Bruner, et al. (1995). "Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors." Oncogene **11**(10): 2021-2028.
- 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): 1429-1431.

- Ko, L. J. and C. Prives (1996). "p53: puzzle and paradigm." Genes Dev **10**(9): 1054-1072.
- Kolar, Z., P. G. Murray, et al. (2000). "Relation of Bcl-2 expression to androgen receptor, p21WAF1/CIP1, and cyclin D1 status in prostate cancer." Mol Pathol **53**(1): 15-18.
- Komarova, E. A. and A. V. Gudkov (2000). "Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy." Biochemistry (Mosc) **65**(1): 41-48.
- Krajewska, M., S. Krajewski, et al. (1996). "Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers." Am J Pathol **148**(5): 1567-1576.
- Krajewski, S., C. Blomqvist, et al. (1995). "Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma." Cancer Res **55**(19): 4471-4478.
- Kruse, J. P. and W. Gu (2009). "Modes of p53 regulation." Cell **137**(4): 609-622.
- Kubbutat, M. H., S. N. Jones, et al. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." Nature **387**(6630): 299-303.
- Lamont, K. R. and D. J. Tindall (2010). "Androgen regulation of gene expression." Adv Cancer Res **107**: 137-162.
- Lee, C., J. M. Kozlowski, et al. (1995). "Etiology of benign prostatic hyperplasia." Urol Clin North Am **22**(2): 237-246.
- 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.
- Lee, K. L. and D. M. Peehl (2004). "Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia." J Urol **172**(5 Pt 1): 1784-1791.
- Lee, M. H., I. Reynisdottir, et al. (1995). "Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution." Genes Dev **9**(6): 639-649.
- Leite, K. R., M. F. Franco, et al. (2001). "Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma." Mod Pathol **14**(5): 428-436.
- Li, B. and Q. P. Dou (2000). "Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 3850-3855.
- Li, X., M. Marani, et al. (2001). "Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer." Cancer Res **61**(1): 186-191.
- Lin, Y., J. Kokontis, et al. (2006). "Androgen and its receptor promote Bax-mediated apoptosis." Mol Cell Biol **26**(5): 1908-1916.
- 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): 287-296.
- Loewer, A., E. Batchelor, et al. (2010). "Basal dynamics of p53 reveal transcriptionally attenuated pulses in cycling cells." Cell **142**(1): 89-100.
- 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): 6630-6640.

- 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): 376-384.
- 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): 935-944.
- Martinez, L. A., Sikes, C.R., Tsieh, J.T., Navone, N.M. (2000). "Role of p21 Waf1/CIP1 in prostate cancer drug resistance." Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **41**: 251.
- Matsushima, H., T. Sasaki, et al. (1998). "Immunohistochemical study of p21WAF1 and p53 proteins in prostatic cancer and their prognostic significance." Hum Pathol **29**(8): 778-783.
- McCarty, M. F. (2004). "Targeting multiple signaling pathways as a strategy for managing prostate cancer: multifocal signal modulation therapy." Integr Cancer Ther **3**(4): 349-380.
- McDonnell, T. J., P. Troncoso, et al. (1992). "Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer." Cancer Res **52**(24): 6940-6944.
- McNeal, J. (1990). "Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology." Urol Clin North Am **17**(3): 477-486.
- Medronho, G. L. W. R. R. L. K. V. B. D. M. d. C. R. d. A. (2002). Epidemiologia Testes diagnósticos. Atheneu. Rio de Janeiro. **1**: 259-270.
- Milner, J. (1997). "Structures and functions of the tumor suppressor p53." Pathol Biol (Paris) **45**(10): 797-803.
- Momand, J. and G. P. Zambetti (1997). "Mdm-2: "big brother" of p53." J Cell Biochem **64**(3): 343-352.
- Momand, J., G. P. Zambetti, et al. (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." Cell **69**(7): 1237-1245.
- 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): 954-958, 960, 962.
- Morsi, H. M., M. P. Leers, et al. (2000). "Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: An approach using multiparameter flow cytometry." Gynecol Oncol **77**(1): 11-17.
- 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.
- Moul, J. W. (1999). "Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy." Eur Urol **35**(5-6): 399-407.
- 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): 405-413.
- 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): 2228-2233.
- Neuhouser, M. L., A. R. Kristal, et al. (2004). "Steroid hormones and hormone-related genetic and lifestyle characteristics as risk factors for benign

- prostatic hyperplasia: review of epidemiologic literature." Urology **64**(2): 201-211.
- Niu, Y., T. M. Chang, et al. (2010). "Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails." Oncogene **29**(25): 3593-3604.
- Niu, Y., Y. Xu, et al. (2001). "Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells." BJU Int **87**(4): 386-393.
- O'Leary MP, W. J., Roehrborn CG, Miner M (2008). "Correlation of the International Prostate Symptom Score bother question with the Benign Prostatic Hyperplasia Impact Index in a clinical practice setting." BJU Int **101**(12): 1531-1535.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-619.
- Omar, E. A., H. Behloul, et al. (2001). "Relationship of p21(WAF-1) protein expression with prognosis in advanced prostate cancer treated by androgen ablation." Prostate **49**(3): 191-199.
- Oren, M. (1999). "Regulation of the p53 tumor suppressor protein." J Biol Chem **274**(51): 36031-36034.
- Osman, I., M. Drobnjak, et al. (1999). "Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact on tumor progression." Clin Cancer Res **5**(8): 2082-2088.
- Ostrakhovitch, E. A. and M. G. Cherian (2004). "Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc." Arch Biochem Biophys **423**(2): 351-361.
- Paterson, R. F., M. E. Gleave, et al. (1999). "Immunohistochemical Analysis of Radical Prostatectomy Specimens After 8 Months of Neoadjuvant Hormonal Therapy." Mol Urol **3**(3): 277-286.
- 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): 678-683.
- Platz, E. A., E. Smit, et al. (2002). "Prevalence of and racial/ethnic variation in lower urinary tract symptoms and noncancer prostate surgery in U.S. men." Urology **59**(6): 877-883.
- Raffo, A. J., H. Perlman, et al. (1995). "Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo." Cancer Res **55**(19): 4438-4445.
- Raz, S., M. Zeigler, et al. (1973). "Pharmacological receptors in the prostate." Br J Urol **45**(6): 663-667.
- Reed, J. C. (2002). "Apoptosis-based therapies." Nat Rev Drug Discov **1**(2): 111-121.
- Rigaud, J., R. Tiguert, et al. (2004). "Expression of p21 cell cycle protein is an independent predictor of response to salvage radiotherapy after radical prostatectomy." Prostate **58**(3): 269-276.
- 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): 257-266.
- Roehrborn, C. G. (2005). "Benign prostatic hyperplasia: an overview." Rev Urol **7 Suppl 9**: S3-S14.

- Roehrborn, C. G. (2011). "Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH)." *Med Clin North Am* **95**(1): 87-100.
- Roth, J., M. Dobbelstein, et al. (1998). "Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein." *EMBO J* **17**(2): 554-564.
- Royuela, M., M. I. Arenas, et al. (2001). "Immunoexpressions of p21, Rb, mcl-1 and bad gene products in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostates." *Eur Cytokine Netw* **12**(4): 654-663.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods Mol Biol* **132**: 365-386.
- Saidi, S., V. Georgiev, et al. (2011). "Evaluation of the value of p53 protein expression in the extra-capsular extension of prostate cancer." *Prilozi* **32**(2): 213-220.
- Sarkar, F. H., Y. Li, et al. (1999). "Relationship of p21(WAF1) expression with disease-free survival and biochemical recurrence in prostate adenocarcinomas (PCa)." *Prostate* **40**(4): 256-260.
- Schalken, J. A. and G. van Leenders (2003). "Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology." *Urology* **62**(5 Suppl 1): 11-20.
- Schneider, L., G. Branchini, et al. (2009). "Gene and protein expression of p53 and p21 in fibroadenomas and adjacent normal mammary tissue." *Endocrine* **35**(1): 118-122.
- Selvankumaran M, Lin HK, et al. (1994). "Immediate early upregulation of bax expression by p53 but not TGFb1: A paradigm for distinct apoptotic pathways." *Oncogene* **9**: 1791.
- Shanmugam, C., V. R. Katkooi, et al. (2008). "p53 Nuclear accumulation and Bcl-2 expression in contiguous adenomatous components of colorectal adenocarcinomas predict aggressive tumor behavior." *J Histochem Cytochem* **56**(3): 305-312.
- Shenk, J. L., C. J. Fisher, et al. (2001). "p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction." *J Biol Chem* **276**(42): 38472-38479.
- 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): 153-169.
- Silva Neto, B., W. J. Koff, et al. (2008). "Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population." *Cancer Invest* **26**(1): 74-80.
- 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.
- Somasundaram, K., H. Zhang, et al. (1997). "Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1." *Nature* **389**(6647): 187-190.
- Sonnenschein, C., N. Olea, et al. (1989). "Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens." *Cancer Res* **49**(13): 3474-3481.
- Soussi, T. and C. Beroud (2001). "Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome." *Nat Rev Cancer* **1**(3): 233-240.

- Stewart, Z. A. and J. A. Pietsenpol (2001). "p53 Signaling and cell cycle checkpoints." Chem Res Toxicol **14**(3): 243-263.
- Tai, Y. T., S. Lee, et al. (1998). "BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer." J Clin Oncol **16**(8): 2583-2590.
- Taj, M. M., R. J. Tawil, et al. (2001). "Mxi1, a Myc antagonist, suppresses proliferation of DU145 human prostate cells." Prostate **47**(3): 194-204.
- Tao, W. and A. J. Levine (1999). "Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3077-3080.
- 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): 116-121.
- Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-310.
- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Waltregny, D., I. Leav, et al. (2001). "Androgen-driven prostate epithelial cell proliferation and differentiation in vivo involve the regulation of p27." Mol Endocrinol **15**(5): 765-782.
- Wang, X., L. Yin, et al. (2007). "Targeted treatment of prostate cancer." J Cell Biochem **102**(3): 571-579.
- Welsh, J. B., L. M. Sapinoso, et al. (2001). "Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer." Cancer Res **61**(16): 5974-5978.
- Wolf, A. M., R. C. Wender, et al. (2010). "American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010." CA Cancer J Clin **60**(2): 70-98.
- Wright, A. S., R. C. Douglas, et al. (1999). "Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase." Endocrinology **140**(10): 4509-4515.
- Wu, X., J. H. Bayle, et al. (1993). "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." Genes Dev **7**(7A): 1126-1132.
- Xie, X., P. De Angelis, et al. (1999). "Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas." Oral Oncol **35**(5): 502-509.
- Yoshino, T., H. Shiina, et al. (2006). "Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy." Clin Cancer Res **12**(20 Pt 1): 6116-6124.
- Yu, D. K., Y. L. Guo, et al. (2010). "[Functional Bax polymorphism associated with lung cancer susceptibility]." Zhonghua Zhong Liu Za Zhi **32**(5): 324-327.
- Zellweger, T., C. Ninck, et al. (2003). "Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer." Prostate **55**(1): 20-29.
- Zhang, Z., M. Li, et al. (2003). "Antisense therapy targeting MDM2 oncogene in prostate cancer: Effects on proliferation, apoptosis, multiple gene expression, and chemotherapy." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11636-11641.

Zong, L., P. Chen, et al. (2012). "Correlation between P53 expression and malignant risk of gastrointestinal stromal tumors: evidence from 9 studies." Eur J Surg Oncol **38**(3): 189-195.

Figure legends

Fig1. Primers. Sequences of primers used for amplification of mRNA and size of the amplified (bp – base pair) fragment of targeted genes and gene normalizer.

Fig2. MDM2 gene expression. Gene expression of MDM2 in prostate tissue of patients with BPH 1.17 (0.46 – 2.25) and PCa 4.59 (3.74 – 5.18) represented as median (percentile 25 – 75), arbitrary units. * $P=0.001$, compared to group BPH.

Fig3. p53 gene expression. Gene expression of p53 in prostate tissue of patients with BPH 1.01 (0.32 – 2.00) and PCa 5.23 (2.85 – 7.44) represented as median (percentile 25 – 75), arbitrary units. * $P=0.001$, compared to group BPH.

Fig4. p21 gene expression. Gene expression of p21 in prostate tissue of patients with BPH 0.40 (0.07 – 3.67) and PCa 6.26 (4.60 – 11.63) represented as median (percentile 25 – 75), arbitrary units. * $P=0.001$, compared to group BPH.

Fig5. Bcl2 gene expression. Gene expression of Bcl2 in prostate tissue of patients with BPH 1.23 (0.33 – 2.92) and PCa 4.15 (2.62 – 7.43) represented as median (percentile 25 – 75), arbitrary units. * $P=0.001$, compared to group BPH.

Fig6. Bax gene expression. Gene expression of Bax in prostate tissue of patients with BPH 0.90 (0.60 – 1.60) and PCa 1.15 (0.94 – 1.84) represented as median (percentile 25 – 75), arbitrary units. $P=0.327$), compared to group BPH.

Fig7. Relative risk. Analysis of the relative risk for PCa through tissue with PCa as compared to group BPH. #Values obtained from the ROC curve. *Values considered significant when $P<0.05$. OR – Odds ratio. CI – confidence interval.

Figure 1

Primer	Type	Sequence (5' - 3')	Fragment (bp)
Bax	Forward	GAC ATG TTT TCT GAC GGC AAC	137
	Reverse	AAG TCC AAT GTC CAG CCC	
Bcl2	Forward	GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA	304
	Reverse	AGGCACCCAGGGTGATGCAA	
BMG	Forward	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	165
	Reverse	ACAAGTCTGAATGCTCCACT	
MDM2	Forward	GAT CCT GAA ATT TCC TTA GCT GAC	144
	Reverse	GAT TTC CCC TTT ATC TTT CCC TTT ATC	
p21	Forward	TGTCACTGTCTTGACCCCTTG	517
	Reverse	GGCGTTTGGAGTGGTAGAA	
p53	Forward	GTACCACCATCCACTACA ACTAC	141
	Reverse	CACAAACACGCACCTCAAAG	

Figure 2

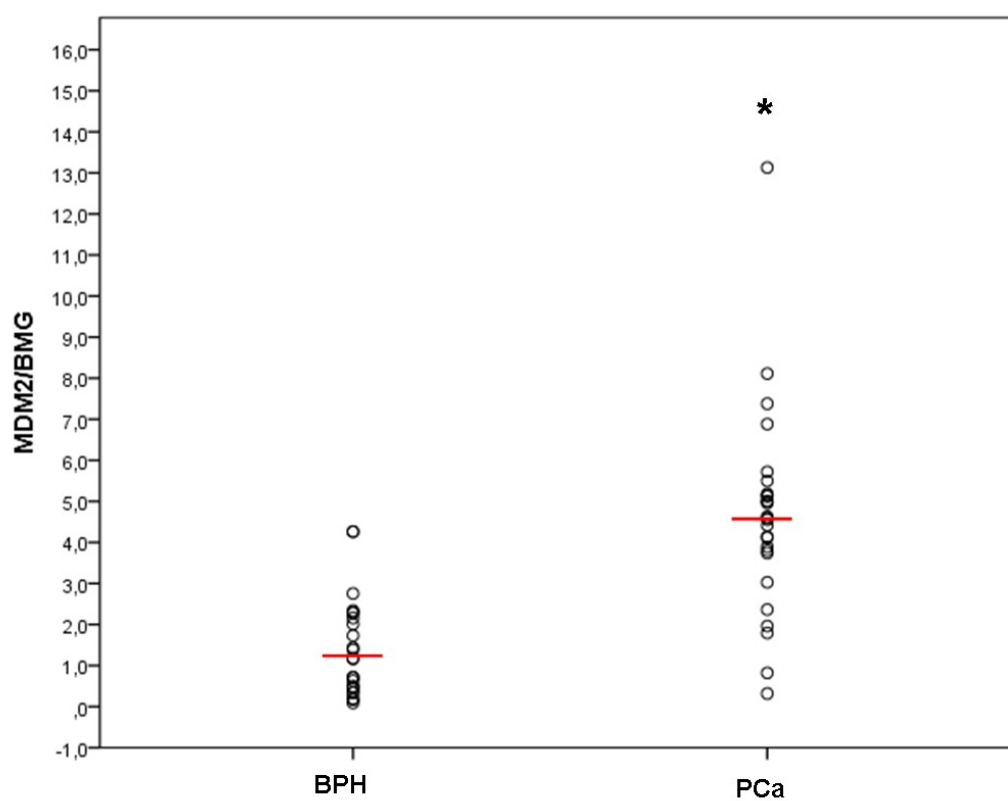


Figure 3

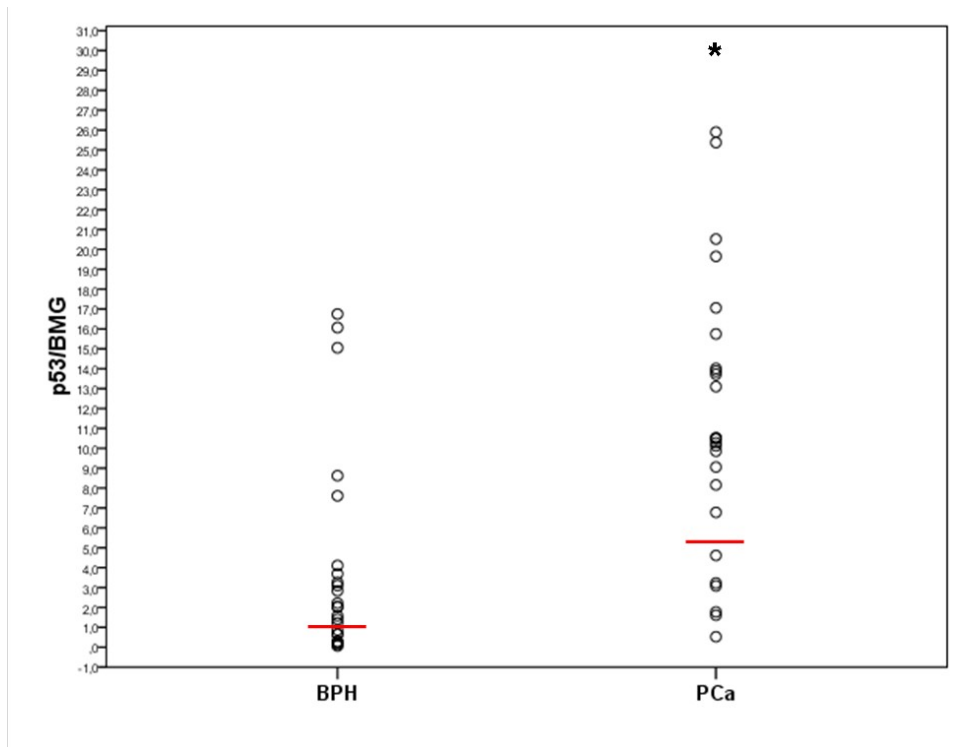


Figure 4

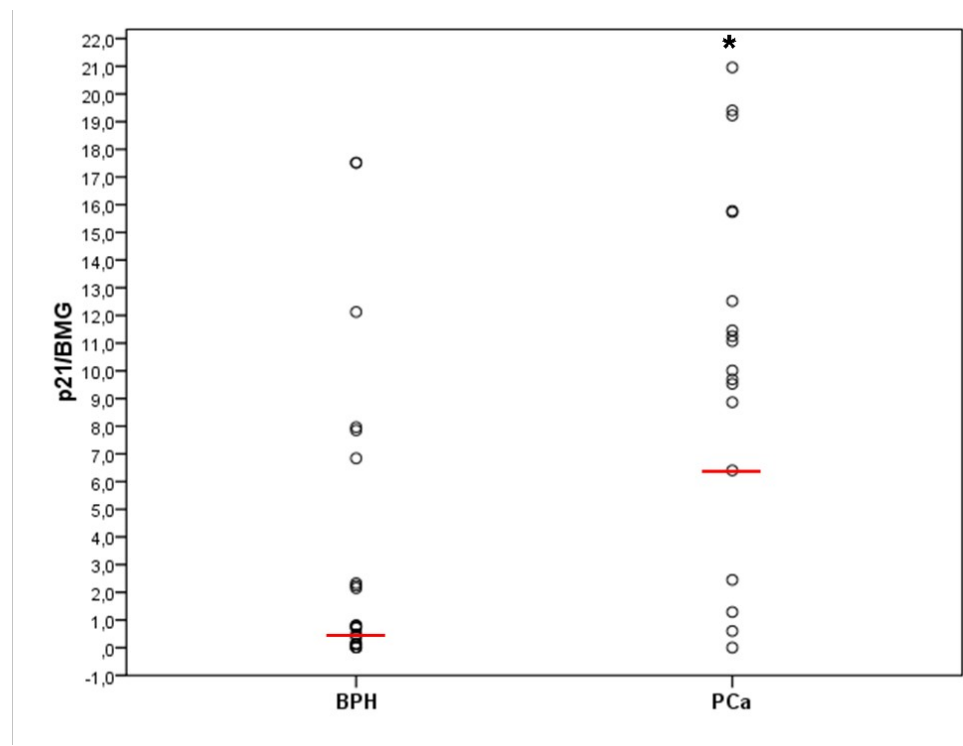


Figure 5

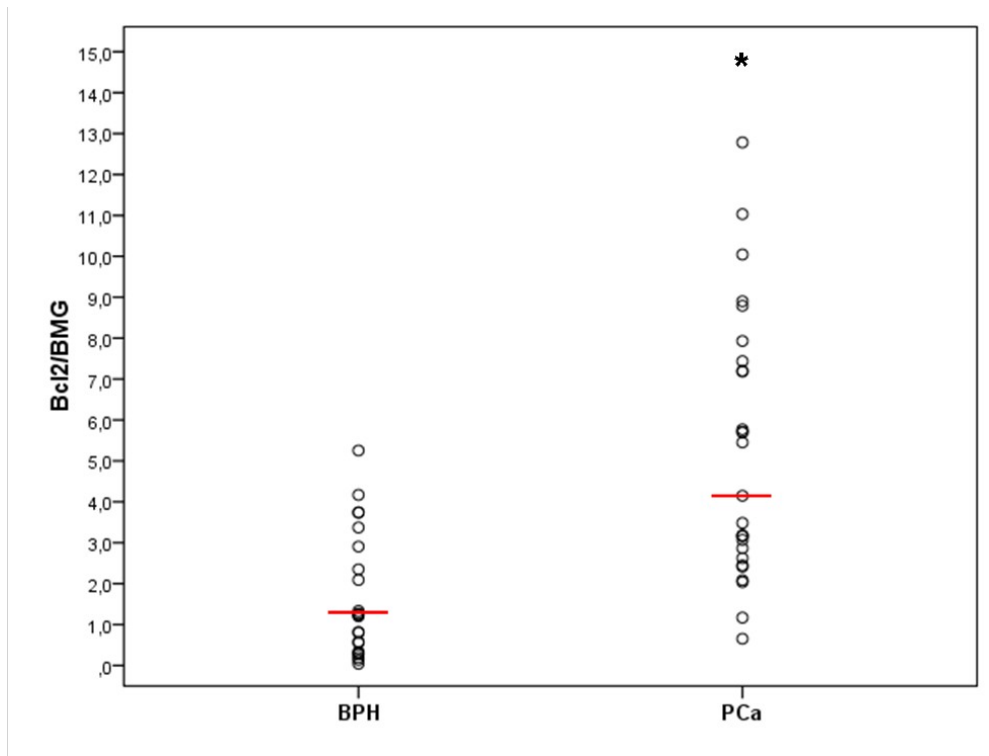


Figure 6

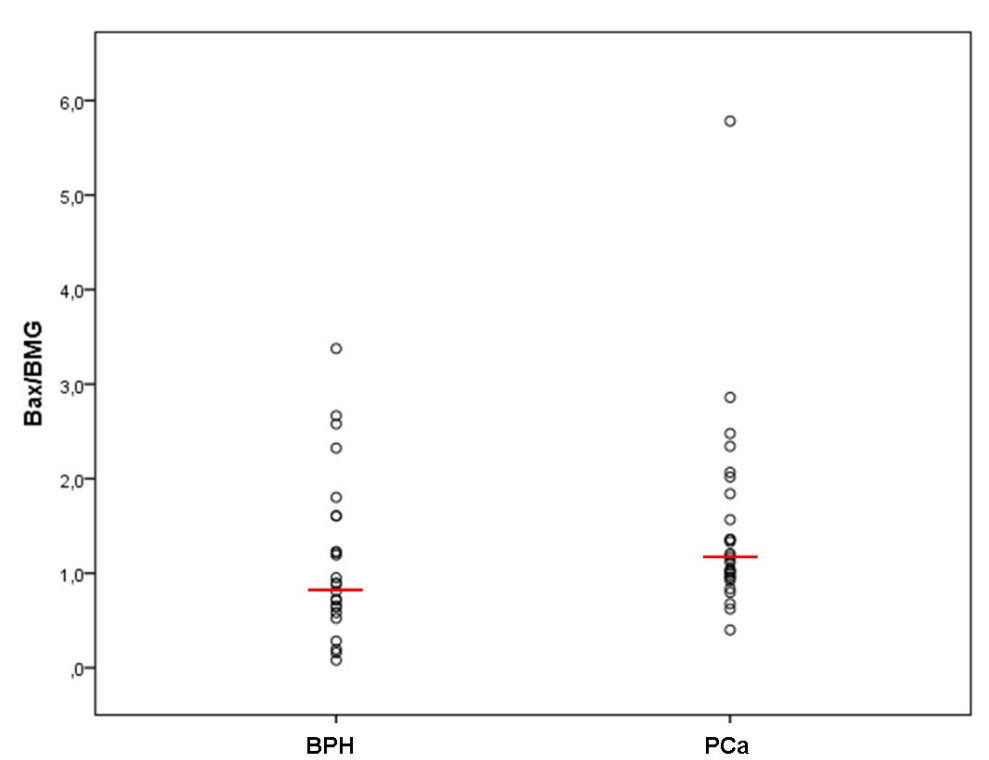


Figure 7

#	N	PCa OR	CI (95%)	<i>P</i> *
MDM2 ≤ 2.89	25	69.67	10.51 – 461.87	<0.001
MDM2 > 2.89	21			
p53 ≤ 2.18	24	15.20	3.79 – 61.0	<0.001
p53 > 2.18	25			
p21 ≤ 4.20	22	31.50	6.21 – 159.8	<0.001
p21 > 4.20	24			
Bcl2 ≤ 2.38	21	17.00	4.15 – 69.60	<0.001
Bcl2 > 2.38	30			
Bax ≤ 0.954	20	4.03	1.2 – 13.52	<0.021
Bax > 0.954	30			