

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

**Tese de Doutorado**

**Estabelecimento de cultura primária de células de carcinoma  
prostático e avaliação da resposta ao silenciamento por RNAi do  
receptor de androgênios e seu correpressor NCoR**

**Gisele Branchini**

**Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva**

**Porto Alegre, agosto de 2011**

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

**Tese de Doutorado**

**Estabelecimento de cultura primária de células de carcinoma prostático e avaliação da  
resposta ao silenciamento por RNAi do receptor de androgênios e seu correpressor  
NCoR**

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

**Gisele Branchini**

**Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva**

**Porto Alegre, agosto de 2011**

*“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”.*

*Anna Eleanor Roosevelt*

*Dedico este trabalho às pessoas que amo, que todos os dias me fazem acreditar na  
beleza dos meus sonhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ilma Simoni Brum, pela acolhida desde a iniciação científica até o doutorado, e pelos incontáveis ensinamentos que me fizeram amadurecer e me tornar uma pesquisadora. Obrigada pela confiança, dedicação e carinho recebidos.

Aos professores colaboradores do nosso grupo, Dr<sup>ª</sup>. Helena von Eye Corleta e Dr. Edison Capp, pelo apoio e pelas valorosas dicas nos nossos encontros científicos. À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Flávia Ribeiro pela presença sempre estimulante. Ao Serviço de Urologia do HCPA, em especial os Dr. Milton Berger e Dr. Brasil Silva Neto, pelo auxílio indispensável à realização deste projeto.

Aos docentes do PPG em Ciências Biológicas: Fisiologia, por acompanharem meus passos e contribuírem para minha formação. Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA por sempre estarem sempre à disposição.

Aos colegas do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, especialmente à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Beatriz Kohek, pela compreensão e pelo apoio constantes.

Às minhas grandes amigas, Vivian Treichel Giesel e Lolita Schneider Pizzolato, pelo companheirismo de sempre, pelo apoio incondicional e por dividirem as alegrias e tristezas dessa jornada.

Ao Vanderlei Biolchi pelas inúmeras pequenas ajudas do dia-a-dia do laboratório e do doutorado e pelas dicas de trabalho. À Ana Santin e à Patrícia Martiny, pela valorosa ajuda no

momento mais crítico. Muito obrigada! À Aline Damo pelo grande apoio, desde o início. Obrigada pelo auxílio experimental e afetivo, sempre presente. À Polyana Maier que, mesmo distante, sempre permaneceu torcendo por mim.

A todos os queridos colegas de laboratório, Fernanda, Gustavo, Carol Hillebrand, Carol Luft, Aline Amaral, Diego, Carlos, Amanda, Gabi, Anita, por sempre estarem disponíveis para ajudar e manterem um ambiente de trabalho sempre agradável. A todos estes e aos demais colegas do LaBiMET e do LaGOM, pelo ambiente acolhedor e pelas valorosas discussões científico-filosóficas que permeiam o trabalho por diversas vezes frustrante. Ao Prof. Dr. Alex Sander Araújo pelo exemplo de profissional e pelas valiosíssimas dicas, e também pelas mesmas discussões científico-filosóficas...

E, por fim, àqueles que tornaram este trabalho possível, não na parte experimental, mas na parte pessoal. Aos meus pais, Mauricio e Teresinha, pelo apoio sempre presente, mesmo distante, e por sempre terem acreditado no meu sucesso e nas minhas escolhas. Ao meu irmão Elvis e à minha cunhada Cindy, por proporcionarem momentos para relaxar e jogar conversa fora, e também pelo apoio (e as mesmas discussões científico-filosóficas...). Aos meus sogros Adroaldo e Ivete, e às minhas cunhadas Dani e Juli, pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao meu marido André, pelo apoio e carinho diários, pela confiança, pela cumplicidade. Obrigada pela compreensão destes momentos finais e por sempre acreditar e me fazer acreditar no meu potencial. Ao meu filho Bernardo, por ter proporcionado a melhor experiência da minha vida, certamente com os melhores resultados.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	13
LISTA DE ABREVIATURAS .....	16
LISTA DE FIGURAS.....	21
LISTA DE TABELAS.....	23
INTRODUÇÃO .....	24
Câncer de Próstata .....	24
Câncer prostático e expressão gênica .....	28
Receptor de Androgênios e seus correguladores .....	33
siRNAs.....	37
HIPÓTESES .....	40
OBJETIVOS .....	41
MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
Delineamento do estudo .....	42

Cultura de células LNCaP .....	42
Cultura primária de células .....	42
Obtenção do tecido prostático .....	42
Classificação dos tumores.....	43
Cultura celular de carcinoma prostático .....	44
Confirmação do diagnóstico de câncer prostático .....	45
Transfecção com siRNAs .....	45
Tratamento hormonal.....	47
Avaliação da proliferação celular .....	47
Análise da expressão gênica .....	48
Reação em Cadeia da Polimerase a partir de Transcrição Reversa (RT-PCR) .....	48
Síntese do cDNA .....	49
PCR em Tempo Real .....	49
Análise da expressão proteica.....	55
Extração de Proteínas .....	55
Western Blot .....	56
Dosagem de PSA .....	57
Fluxogramas dos grupos de tratamento .....	58
Cálculo do tamanho amostral .....	59

Análise Estatística.....	59
Considerações éticas .....	59
Locais de Realização do Projeto.....	60
Fontes de Financiamento .....	61
RESULTADOS .....	62
CAPÍTULO 1.....	63
Estabelecimento da cultura primária de carcinoma prostático .....	63
CAPÍTULO 2.....	68
Seleção do gene de referência para estudos de expressão gênica em células de cultura primária de carcinoma prostático .....	68
<i>geNorm</i> .....	70
<i>NormFinder</i> .....	74
Normalização da expressão gênica .....	77
CAPÍTULO 3.....	79
Silenciamento do receptor de androgênios .....	79
Silenciamento do correpresor do receptor de androgênios NCoR1 .....	82
Efeitos sobre a proliferação de células LNCaP .....	85
Efeitos sobre a expressão gênica e secreção de <i>PSA</i> pelas células LNCaP.....	87
DISCUSSÃO .....	90



CONCLUSÕES .....	104
PERSPECTIVAS.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107
ANEXO 1 .....	116
ANEXO 2 .....	118

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de próstata atinge cerca de três quartos da população masculina acima de 65 anos, sendo esta neoplasia o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, e o mais prevalente em homens. O receptor de androgênios (AR) desempenha um papel crítico no desenvolvimento normal da próstata, bem como no câncer prostático. Sua atividade transcricional é regulada através da interação com diversas proteínas. O NCoR1 (corepressor de receptores nucleares) está envolvido na diminuição da atividade do AR sobre a transcrição de genes alvo. **Objetivos:** Desenvolver um modelo de cultura celular de câncer prostático a partir de fragmentos tumorais; identificar o melhor gene normalizador para estudos de expressão gênica em amostras das células em cultivo; avaliar os efeitos do silenciamento do AR e seu corregulador, NCoR1, sobre a proliferação celular e expressão gênica de *PSA*, um gene alvo do AR, em células de cultura primária e em células de uma linhagem de câncer prostático (LNCaP – *Lymph Node Carcinoma of the Prostate*). **Métodos:** Fragmentos de tumores prostáticos coletados após prostatectomia radical ou prostatovesiculectomia foram plaqueados e mantidos em cultivo. As células que proliferaram a partir dos *explants* foram testadas para marcadores de epitélio (citoqueratinas) e de malignidade (racemase). Após 10 dias, as células foram silenciadas para o AR e, posteriormente, lisadas para a extração de RNA total ou de proteínas. Células LNCaP foram mantidas em cultura e silenciadas para o

AR e o NCoR1, sendo avaliada também a proliferação celular nesta última condição. O cDNA obtido a partir das culturas primárias de CaP foi usado para a amplificação do mRNA de oito genes candidatos a normalizadores, além dos mRNAs do AR e PSA. O cDNA das células LNCaP foi usado para amplificação do mRNA do PSA, e o sobrenadante das células coletado para a dosagem do PSA secretado. **Resultados:** Apenas 47,7% do total de culturas primárias apresentaram adesão dos fragmentos e proliferação de células. Não foi observada associação entre a adesão dos fragmentos e o escore de Gleason dos tumores. As células cultivadas apresentaram positividade para os marcadores de células epiteliais e de malignidade de células prostáticas, indicando que as células em cultivo se tratavam de células tumorais prostáticas. Para análise da expressão gênica nestas células, o gene que mostrou os melhores parâmetros de estabilidade de expressão foi o gene *SDHA*, e a melhor combinação de dois genes sugerida neste estudo foi *SDHA* e *ALAS1*. O silenciamento do receptor de androgênios foi observado 48 horas após a transfecção com siRNAs, sendo observada uma diminuição nos níveis do mRNA já em 24 horas após a transfecção. Observou-se uma diminuição da expressão gênica do PSA em 24 horas, em resposta à diminuição dos níveis do AR, tanto em cultura primária de CaP quanto na linhagem LNCaP. Em células LNCaP, a transfecção com siRNAs específicos para o NCoR1 não depletou completamente os níveis proteicos, porém estes diminuíram em 24, 48 e 72 horas após a transfecção. Foi verificado um aumento da expressão gênica de PSA 48 horas após o silenciamento do NCoR1, em células tratadas com diidrotestosterona. Não foi observado aumento da secreção de PSA no sobrenadante das células em cultivo 48 horas após o silenciamento. A proliferação das células LNCaP foi diminuída nos grupos transfectados com siRNAs específicos para o NCoR1 e siRNAs inespecíficos, em relação com grupo controle. **Conclusões:** O modelo de cultura

celular a partir de fragmentos tumorais prostáticos é viável, e proporciona uma boa amostragem de células para análises moleculares de câncer de próstata sob diferentes condições experimentais. No entanto, a taxa de sucesso dos cultivos é moderada. Neste modelo, em que foram testados diversos genes em relação à sua estabilidade de expressão, o gene *SDHA* apresentou uma boa estabilidade, ao contrário de outros genes frequentemente utilizados como genes de referência sem nenhuma análise prévia de sua expressão, como *beta-actina*, *GAPDH* e *beta-2-microglobulina*. Assim, o *SDHA*, ou ainda a combinação *SDHA* e *ALAS1*, é indicado para as estratégias de normalização neste tipo de amostra. O silenciamento do AR em células tumorais prostáticas diminuiu a expressão gênica de *PSA*, como esperado. O silenciamento de seu correpressor, NCoR1, aumentou os níveis de mRNA do *PSA*, indicando que sua ausência resulta em um aumento da atividade transcricional do AR. A menor taxa de proliferação nos grupos transfectados pode estar mais relacionada ao estresse da transfecção do que à ausência de NCoR1 nas células. Mais análises poderão confirmar os efeitos da ausência deste correpressor sobre a resposta das células tumorais prostáticas, o que abrirá caminho para um melhor entendimento da fisiopatologia dos tumores prostáticos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Prostate cancer (PCa) occurs in seventy-five percent of men over 65 years old, and it is the sixth most common type of cancer in the world and the most prevalent in men. Androgen receptor (AR) plays a critical role in normal prostate gland development and also in prostate cancer. Its transcriptional activity is regulated by protein interaction and NCoR1 (nuclear receptor co-repressor) decreases the AR activity on target genes transcription. **Objectives:** To develop a prostate cancer cell culture model from tumor fragments; to identify the best housekeeping gene for gene expression studies in that cultured cells; to evaluate the effects of AR and NCoR1 silencing on cell proliferation and PSA gene expression, a AR target gene, in cells of primary culture of PCa and in a prostate cancer cell line, LNCaP. **Methods:** PCa fragments obtained from radical prostatectomy or prostatovesiculectomy were plated and maintained in culture. Proliferating cells were tested for markers of epithelium (cytokeratin) and malignancy (racemase). After ten days, cells were transfected with AR siRNAs and then lysed for total RNA or protein extraction. LNCaP cells were silenced for AR and NCoR1, and proliferation rate was also measured in the last condition. cDNA obtained from primary culture was used to amplify eight candidate to housekeeping genes mRNA, and also *AR* and *PSA* mRNA. cDNA from LNCaP cells was used to amplify *PSA* mRNA, and the cells supernatant was collected to dose secreted PSA.

**Results:** Only 47.7% of the total number of primary cultures had fragment adhesion and cell proliferation. There was no association between explants adhesion and tumor Gleason's score. Cells were positive for epithelium and malignancy markers, confirming the growth of prostate cancer cells. For gene expression analysis in these cells, the gene showing the best parameters of stability of expression was *SDHA*, and the best combination of two genes was *SDHA* and *ALAS1*. AR silencing was observed in 48 hours after siRNA transfection, with a decrease of mRNA levels in 24 hours after transfection. There was a decrease of *PSA* gene expression in 24 hours, either in primary culture or in LNCaP cells. In LNCaP cells, transfection with NCoR1 siRNA did not depleted entirely the protein levels. However, the levels of NCoR1 decreased in 24, 48, and 72 hours after transfection in relation to control group. There was an increase of *PSA* gene expression in 48 hours after NCoR1 siRNA transfection in cells treated with dihydrotestosterone. There was no increase in *PSA* secretion in cells supernatant in response to NCoR1 silencing. LNCaP cell proliferation was decreased in both transfected groups, the specific siRNA to NCoR1 and the unspecific control, in relation to control group.

**Conclusions:** the culture cell model from explants of prostate cancer is practicable, and provides a good cell sampling to molecular analysis of prostate cancer under different experimental conditions. Nevertheless, the successful rate of cultures is moderate. In this model, several genes were tested for expression stability, and *SDHA* had presented the best values, unlike others classical housekeeping genes, as *beta-actin*, *GAPDH* and *beta-2-microglobulin*. Thus, *SDHA*, or the combination of *SDHA* and *ALAS1*, is indicated to normalization strategies in these samples. The silencing of AR in prostate cancer cells had decreased *PSA* gene expression, as expected. The silencing of its co-repressor, NCoR1, had increased the *PSA* mRNA levels, indicating that the absence of this coregulator results in an

increase of AR transcriptional activity. The smaller proliferation of transfected groups in relation to control group could be related to the transfection stress, more than to the absence of NCoR1. More analysis can confirm the effects of NCoR1 silencing on tumor cells proliferation rate, and contribute to a better understanding of prostate tumors pathophysiology.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	Beta-actina
ALAS1	Aminolevulinato delta-sintase 1
AMACR	Enzima $\alpha$ -metilacil-coenzima $\alpha$ -racemase
ANOVA	Análise de variância de uma via
AR	Receptor de androgênios
ARA24	<i>Androgen receptor associated protein 24</i>
ARA55	<i>Androgen receptor coactivator 55 kDa protein</i>
ARA70	<i>70 kDa androgen receptor coactivator</i>
ARIP3	<i>Androgen receptor-interacting protein 3</i>
ART27	<i>Androgen receptor trapped clone 27 protein</i>
B2M	Beta-2-microglobulina
BMG	Beta-2-microglobulina
CaP	Câncer de próstata
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC25	<i>Cell division cycle 25 homolog</i>
cDNA	DNA complementar
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRIF1	<i>CR6-interacting factor 1</i>
C <sub>T</sub>	Ciclo limiar



CV	Coeficiente de variação
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHT	Diidrotestosterona
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirino nucleotídeos
dsRNA	RNA dupla fita
DTT	Ditiotreitol
ECL	Quimioluminescência realçada
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
F12K	<i>F-12 Nutrient Mixture Kaighn's Modification</i>
FHL2	<i>Four and a half LIM domains 2</i>
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FN	Fator de normalização
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GUSB	$\beta$ -glicuronidase
HBO1	<i>K(lysine) acetyltransferase 7</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HMWCK	Citoqueratina de alto peso molecular
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HPRT1	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase 1

IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Quilo-Dalton
LaBiMET	Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral
LaGOM	Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LNCaP	<i>Lymph Node Carcinoma of the Prostate</i>
log	Logaritmo
M	Molar
min	Minuto
MFC	<i>Maximum Fold Change</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium
NaF	Fluoreto de sódio
NCoR	Correpressor de receptores nucleares
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NTD	Domínio amino-terminal
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio

PIAS1	<i>Protein inhibitor of activated STAT, 1</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PROF	Programa de Fomento à Pós-Graduação
PSA	Antígeno prostático específico
qRT-PCR quantitativa	Reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
ROX	Corante de referência passiva
rRNA	RNA ribossomal
RU486	Esteróide sintético antagonista do receptor de progesterona
SBF	Soro bovino fetal
SDHA	Complexo succinato desidrogenase, subunidade A
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil sulfato de sódio
SHP	<i>Small Heterodimer Partner</i>
siAR	siRNA específico para o receptor de androgênios
siCN	siRNA inespecífico
siNCoR1	siRNA específico para o NCoR1
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SMRT	<i>Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone</i>
SRC1	<i>Nuclear receptor coactivator 1</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SREBP-1c	<i>Sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>

*receptor*

SYBR	Corante Sybr Green I
TATA Box	Sequência de DNA do promotor de genes de eucariotos
TBP	Proteína de ligação ao TATA Box
TBS	Solução salina de Tris
TE	Tampão Tris-HCl-EDTA
Tm	Temperatura de dissociação
TP	Tecido prostático
TR4	<i>Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2</i>
TTBS	Solução salina de Tris e Tween
U	Unidade
UBC	Ubiquitina C
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
18S	Subunidade ribossomal
199	Meio de cultivo 199
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µg	Micrograma

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos de resistência à ablação androgênica em células tumorais prostáticas ..... página 28
- Figura 2.** Esquema de coletas do sobrenadante das células LNCaP em cultivo para dosagem de PSA ..... página 57
- Figura 3.** Fluxograma dos grupos de tratamento experimental das culturas primárias de câncer de próstata e de células LNCaP ..... página 58
- Figura 4.** Células de cultura primária de fragmentos de tumor de próstata .... página 64
- Figura 5.** Proporção de culturas aderidas, aderidas parcialmente, não aderidas e contaminadas entre o total de culturas de tecido prostático com escore de Gleason 6 e 7 ..... página 66
- Figura 6.** Imunocitoquímica das células tumorais prostáticas em cultura primária ..... página 67
- Figura 7.** Valores de estabilidade da média de expressão dos genes em estudo pela análise com o *software geNorm* para todas as amostras, indicando a combinação dos dois genes de referência mais estáveis ..... página 72
- Figura 8.** Valores de estabilidade da média de expressão dos genes em estudo pela análise com o *software geNorm* para as amostras divididas em grupos ..... página 73

<b>Figura 9.</b> Análise da variação pareada feita com base no fator de normalização gerado pelos dados dos genes mais estáveis à medida que um gene adicional é inserido .....	página 74
<b>Figura 10.</b> Estabilidade dos genes normalizadores quando avaliadas as variações de expressão intragrupo e intergrupo .....	página 76
<b>Figura 11.</b> Expressão gênica do <i>AR</i> em cultura primária de células de carcinoma prostático com normalização por oito diferentes genes referência e por fator de normalização obtido a partir da expressão de dois genes (três diferentes combinações) .....	página 78
<b>Figura 12.</b> Silenciamento da proteína do <i>AR</i> verificado por WB em cultura primária de carcinoma prostático .....	página 79
<b>Figura 13.</b> Expressão gênica do <i>AR</i> em cultura primária de células de CaP transfectadas com siRNA para o <i>AR</i> .....	página 80
<b>Figura 14.</b> Expressão gênica de <i>PSA</i> em células LNCaP (A) e de cultura primária transfectadas com siRNA para o <i>AR</i> (B) .....	página 81
<b>Figura 15.</b> Transfecção de células LNCaP com siRNAs para o NCoR1 .....	página 83
<b>Figura 16.</b> Silenciamento da proteína NCoR1 verificado por WB .....	página 84
<b>Figura 17.</b> Avaliação da proliferação celular em células LNCaP transfectadas com siRNA para o NCoR1 e submetidas a tratamento com diferentes doses de androgênios .....	página 86
<b>Figura 18.</b> Expressão gênica de <i>PSA</i> em células LNCaP transfectadas com siRNA para o NCoR1 tratadas com diidrotestosterona $10^{-13}$ M .....	página 87
<b>Figura 19.</b> Dosagem de <i>PSA</i> no sobrenadante das células LNCaP em cultivo silenciadas para o NCoR1 .....	página 89

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Identificação e sequências dos siRNAs para o mRNA do *NCoRI*  
..... página 46
- Tabela 2.** Informações sobre os genes candidatos a normalizadores para expressão gênica em cultura primária de células de carcinoma prostático ..... página 53
- Tabela 3.** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do mRNA dos genes candidatos a normalizadores e tamanho do fragmento amplificado ..... página 54
- Tabela 4.** Classificação segundo o Escore de Gleason das culturas realizadas  
..... página 65
- Tabela 5.** Medidas de dispersão dos valores de  $C_T$  dos genes analisados ..... página 69
- Tabela 6.** Valores de estabilidade dos genes de referência analisados quando comparados sem a subdivisão nos grupos controle e tratado (Total) e com a divisão (Grupos)  
..... página 75

# INTRODUÇÃO

## *Câncer de Próstata*

A próstata é um órgão exócrino do sistema reprodutor masculino regulado por androgênios, sendo uma das principais fontes dos constituintes não-celulares do sêmen (Chatterjee 2003). Os androgênios desempenham um papel essencial na morfogênese e na fisiologia da próstata normal (Chatterjee 2003). A glândula prostática apresenta duas fases distintas na vida do homem, ambas dependentes dos androgênios: a primeira (fase de crescimento) inicia no nascimento e continua até o indivíduo atingir a vida adulta, onde a próstata irá atingir seu tamanho normal. A segunda, chamada de fase de manutenção, existe uma renovação contínua das células, com taxas de proliferação e apoptose muito semelhantes, de maneira que não ocorre aumento de crescimento nem involução da glândula (Kyprianou *et al.* 1996). Porém, a formação tumoral tem sido intimamente associada à ação de hormônios esteroides, principalmente os androgênios (Latil *et al.* 2001; Gronberg 2003; Yang *et al.* 2005). As duas formas clinicamente mais importantes do crescimento anormal da próstata são a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) (Daneshgari & Crawford 1993).

Noventa por cento dos homens desenvolvem HPB ou CaP entre a quarta e a nona década de vida (Chatterjee 2003), mas o câncer de próstata é diagnosticado em muito poucos



homens com menos de 50 anos (menos de 1% dos pacientes) (Gronberg 2003). Entre todos os tipos de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que em torno de 85% dos pacientes são diagnosticados após os 65 anos (Gronberg 2003; INCA 2010). O risco de desenvolver CaP é de 1 em cada 6 homens e o risco de morte pela doença é de 1 em 30 (Nelson *et al.* 2003). Em valores absolutos, é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. No Brasil, nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, o CaP é o mais incidente entre os homens, superando inclusive o câncer de pele não-melanoma. O câncer de próstata também ocupa a primeira posição em incidência no estado do Rio Grande do Sul, apesar de na região Sul esta neoplasia ser a segunda mais comum entre a população masculina. Em 2008, o número de mortes causadas pela doença chegou a 11.955. O número de casos novos de câncer de próstata estimado para o Brasil no ano de 2010 foi de 52.350, valor este que vem crescendo a cada ano. Estes valores correspondem a um risco estimado de 54 casos novos a cada 100.000 homens (INCA 2010).

A próstata apresenta uma organização complexa de diferentes tipos celulares, sendo composta de compartimentos epiteliais e estromais, separadas por uma membrana basal. O compartimento epitelial é composto por dois tipos de células, as basais e as glandulares ou secretoras, sendo as últimas o principal tipo celular deste compartimento. A principal função destas células, também denominadas de células luminiais é secretar o fluido prostático contendo antígeno prostático específico (PSA), fosfatase ácida prostática específica (PAP) e prostaglandinas no lúmen da glândula. Estas células expressam o receptor de androgênios (AR) e, como consequência, sua viabilidade e capacidade secretora são dependentes de

androgênios (Schalken 2005). Evidências sugerem que a origem do câncer prostático se dá a partir das células epiteliais, principalmente a partir das células luminais, uma vez que o diagnóstico anatomopatológico é baseado na ausência de células basais (Goldstein *et al.* 2010). As mudanças genéticas e moleculares associadas ao câncer prostático parecem estar correlacionadas com mudanças microscópicas na estrutura celular e na histologia da glândula. A tumorigênese inicial da próstata parece estar associada com uma displasia que inicia com atrofia inflamatória proliferativa que pode progredir para neoplasia prostática intraepitelial, a qual progride para carcinoma. Estas lesões podem ser iniciadas por inflamação em decorrência de exposição a diferentes agentes infecciosos e/ou carcinogênicos. Conforme as lesões pré-malignas progredem para câncer primário, para câncer metastático e depois para câncer refratário ao estímulo hormonal e ao tratamento hormonal, os danos genéticos continuam a se acumular dentro das células cancerosas (Pienta *et al.* 2008).

A via de sinalização dos androgênios e seu receptor é crítica na biologia da glândula prostática. Em resposta a certos distúrbios patológicos, androgênios e/ou fatores de crescimento podem promover a hiperestimulação das células epiteliais prostáticas de maneira que o balanço entre proliferação celular e apoptose é quebrado (Chatterjee 2003). Condições que desencadeiam uma transativação anormal do receptor de androgênios (AR), como mutações, amplificação da via de sinalização androgênica ou ativação de vias de sinalização independentes de androgênios podem levar ou ser um resultado do desenvolvimento de doenças prostáticas ou carcinomas prostáticos refratários à terapia hormonal (Yang *et al.* 2005) (figura 1). A proliferação dependente de androgênios de células tumorais prostáticas, tanto benignas (de hiperplasia prostática benigna) quanto malignas (de linhagem celular

LNCaP) é bifásica: androgênios em doses menores que níveis nanomolares ( $10^{-9}$  M) estimulam o crescimento celular, e o crescimento para com a retirada do estímulo androgênico; doses maiores que níveis nanomolares exercem um efeito antiproliferativo (Brum *et al.* 2003; Chatterjee 2003).

A dependência hormonal de CaP foi primeiramente reconhecida por Huggins e Hodges em 1941, os quais observaram que a remoção dos androgênios (via castração ou administração de estrogênios) conduziu a uma regressão do câncer de próstata disseminado (Huggins & Hodges 1941; Suzuki *et al.* 2007). Este conhecimento tornou-se a base para a terapia de privação androgênica em tumores prostáticos confinados ao órgão. Porém, o efeito sobre a apoptose das células tumorais é curto e considerado não-curativo, uma vez que na maioria dos pacientes os tumores tornam-se independentes dos androgênios e retomam o crescimento e invasão (figura 1), e, nestes casos, ainda não existe uma terapia efetiva (Xu *et al.* 2006; D'Antonio *et al.* 2008). Assim, uma vez que a via de sinalização do AR persiste nas células tumorais resistente à terapia de ablação hormonal, a ablação da função do AR parece ser uma alternativa promissora para o tratamento de células de tumores metastáticos refratários para a inibição do crescimento e estimulação da apoptose (Chatterjee 2003).

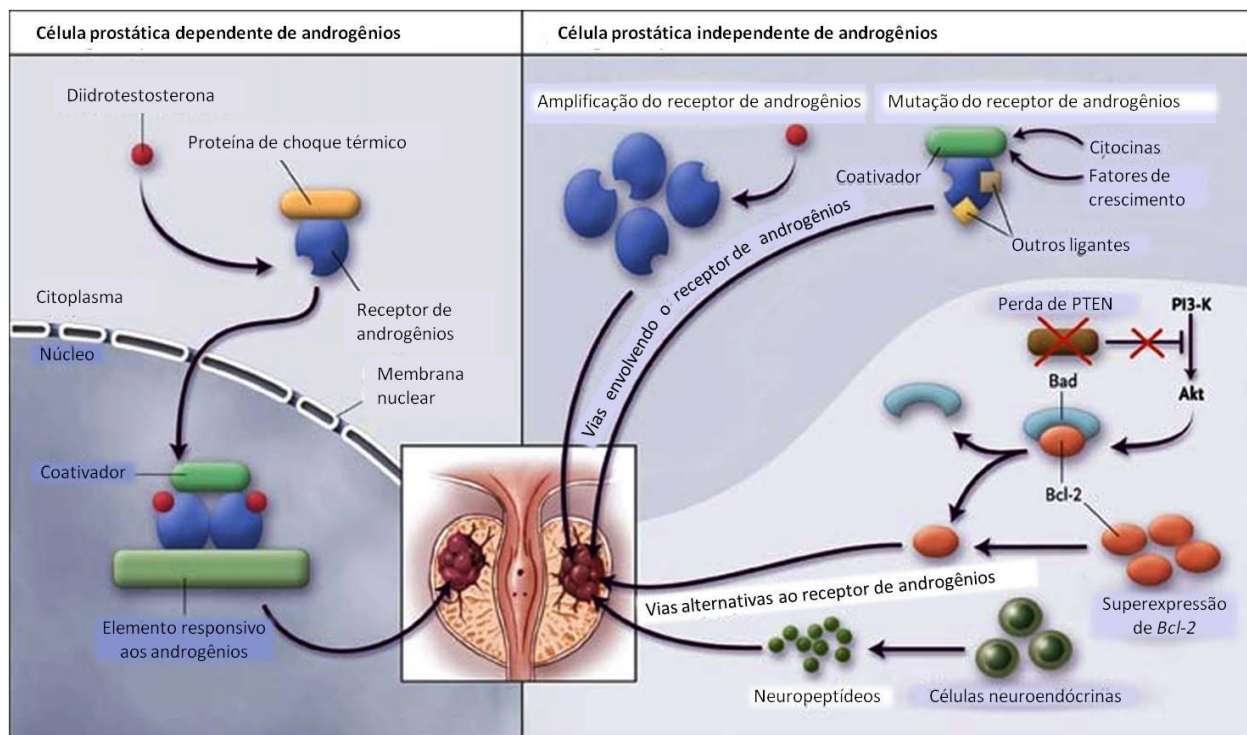


Figura 1. Mecanismos de resistência à ablação androgênica em células tumorais prostáticas. Na progressão de tumores dependentes de androgênios para independentes, podem estar ativadas vias alternativas ao receptor de androgênios ou vias envolvendo o AR, como uma amplificação do gene, mutações, uma ativação aberrante dos coativadores ou do próprio receptor de androgênios. (Schulman *et al.* 2010)

### ***Câncer prostático e expressão gênica***

Apesar de o conhecimento sobre o contexto hormonal, nutricional e ambiental do desenvolvimento do câncer de próstata ter avançado muito graças a estudos que vêm sendo desenvolvidos na área, muito permanece por ser entendido acerca da patogênese dessa doença. O câncer prostático é uma doença biologicamente heterogênea com considerável variação na agressividade clínica, sendo que o seu comportamento pode ser considerado um

resultado direto ou indireto de alterações anormais na expressão gênica de células prostáticas epiteliais (Luo *et al.* 2002). Mudanças no perfil de expressão gênica podem determinar mudanças importantes no funcionamento celular, que podem estar ligadas ao desenvolvimento e manutenção da doença e à morte celular. Diversos estudos têm buscado identificar o perfil de expressão gênica do câncer de próstata, identificando alterações que possam estar relacionadas com o desenvolvimento e progressão da doença (Singh *et al.* 2002; Nelson 2004; Kristiansen *et al.* 2005; Mink *et al.* 2010).

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR) é uma técnica já bem estabelecida, de simples realização, sendo largamente utilizada em estudos de expressão gênica uma vez que possibilita uma rápida, sensível e acurada avaliação dos níveis de mRNA em amostras biológicas (Huggett *et al.* 2005). A partir de uma quantidade mínima de amostra, moléculas de DNA ou de cDNA são amplificadas enzimaticamente milhares ou milhões de vezes de forma bastante rápida. Métodos convencionais de quantificação de RNA, como *Northern blotting*, hibridização *in situ*, RT-PCR qualitativo, *microarray*, foram substituídos por esta técnica (Radonic *et al.* 2004), a qual tem mostrado representar com alta confiabilidade o padrão de expressão gênica de um determinado grupo de amostras ou de um conjunto de diferentes amostras quando avaliadas concomitantemente.

Por ser um método constituído de múltiplos passos de realização, desde a obtenção das amostras até a análise dos dados de amplificação, existe uma variabilidade inerente nessa técnica, o que poderia levar a uma distorção dos valores reais de expressão caso os dados extraídos desse sistema não sejam devidamente corrigidos. Desse modo, faz-se necessária

uma estratégia de normalização adequada para informações quantitativas geradas a partir da amplificação do material genético, com o objetivo de permitir comparações acuradas entre as amostras. Sem uma normalização apropriada, o perfil de expressão de um gene alvo pode ser erroneamente interpretado (Tricarico *et al.* 2002). Dentre os fatores geradores de variações na técnica estão: a própria variabilidade inerente do RNA, os protocolos de extração que podem co-purificar inibidores e as discrepâncias de eficiência entre as amostras durante o processo de transcrição reversa e da PCR que comprometam as análises (Bustin *et al.* 2005).

Dentre as opções de métodos para a normalização de dados, a normalização por gene de referência é um método simples e popular para controle interno de erros no PCR em tempo real, considerada o padrão-ouro para normalizar as frações de mRNA (Huggett *et al.* 2005; de Jonge *et al.* 2007). Uma quantificação acurada de um gene de referência verdadeiro permite a normalização das diferenças na quantidade do RNA ou cDNA amplificado em amostras individuais geradas por: i) diferentes quantidades de material inicial, ii) variações na qualidade desse material e iii) diferenças na extração do RNA ou na síntese de cDNA, uma vez que o gene de referência é exposto aos mesmos passos experimentais que o gene de interesse. Além disso, o procedimento é simplificado uma vez que tanto o gene de interesse como o gene normalizador são mensurados utilizando-se a mesma técnica (Huggett *et al.* 2005).

Um gene de referência, ou normalizador, idealmente é expresso em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do seu desenvolvimento, não sofrendo alteração pelos tratamentos experimentais. Para ser usado como referência, um gene deve apresentar estabilidade, expressão não-regulada no tipo de amostra analisado e

deve ter seu nível de expressão semelhante aos níveis de transcritos do(s) gene(s) em estudo (Bustin 2000). Genes constitutivos satisfazem esses critérios e são utilizados com o propósito de normalização em muitos estudos de expressão (Romanowski *et al.* 2007). Estes genes regulam funções celulares básicas e estão presentes, se não em todas, na maioria das células, codificando, por exemplo, componentes do citoesqueleto ( *$\beta$ -actina*); do complexo principal de histocompatibilidade ( *$\beta$ -2-microglobulina*); da via glicolítica (*gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*, *fosfogliceroquinase 1*); da recuperação metabólica de nucleotídeos (*hipoxantina ribosiltransferase*); do dobramento de proteínas (*ciclofilina*) ou da síntese de subunidades ribossomais (*rRNA*).

Estudos de expressão gênica que fazem uso de genes constitutivos para normalização dos dados de expressão utilizam, em sua grande maioria, os genes  *$\beta$ -actina* (*ACTB*), *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*),  *$\beta$ -glicuronidase* (*GUSB*), *hipoxantina-guanina fosforibosil transferase 1* (*HPRT1*) e a subunidade menor do ribossomo (*18S*). No entanto, muitas publicações tem mostrado que  *$\beta$ -actina* (Selvey *et al.* 2001) e *GAPDH* (Zhong & Simons 1999; Hamalainen *et al.* 2001; Deindl *et al.* 2002; Glare *et al.* 2002) variam consideravelmente e conseqüentemente são referências inadequadas para a análise de transcritos de RNA (Radonic *et al.* 2004). De acordo com Schmittgen e colaboradores, preferencialmente, os níveis de expressão do gene a ser utilizado como normalizador devem ser similares aos do gene de interesse (Schmittgen & Zakrajsek 2000). Assim, o uso de transcritos de RNAs ribossômicos (rRNAs) para gene de referência, como *18S* e *28S*, fica comprometido, já que a expressão desses genes se dá em maior quantidade que a dos genes precursores de mRNA (2-3% do RNA total), os quais são alvos usuais em estudos de

expressão. Além disso, ficou evidenciado que a transcrição de rRNAs é afetada por fatores biológicos e por drogas (Spanakis 1993; Johnson *et al.* 1995; Warner 1999). Outra desvantagem no seu uso é a ausência de rRNAs em amostras purificadas de cDNA sintetizadas exclusivamente a partir de mRNA utilizando-se um oligonucleotídeo complementar à cauda de poli-A, característica do mRNA (Vandesompele *et al.* 2002).

Estes fatos evidenciam um procedimento bastante comum nos trabalhos científicos de hoje, que, mesmo sabendo-se que variações na expressão de genes normalizadores podem comprometer o passo de normalização dos dados de expressão de um gene alvo (Tricarico *et al.* 2002; Vandesompele *et al.* 2002; Bustin *et al.* 2005; Dheda *et al.* 2005), os genes de referência comumente aceitos são frequentemente utilizados sem o processo devido de validação sob as condições experimentais às quais as amostras serão submetidas. A normalização imprecisa leva a uma quantificação inadequada nos níveis de mRNA e a conclusões precipitadas sobre a expressão gênica (de Kok *et al.* 2005). Uma série de evidências revela que não existe um gene normalizador universal, sendo que o nível de transcrição desses genes pode variar entre diferentes tipos de tecidos (normal e patológico) e sob diferentes condições de tratamento (Huggett *et al.* 2005; Romanowski *et al.* 2007; Byun *et al.* 2009). Dessa forma, os genes de referência endógenos devem ser escolhidos levando-se em conta o tipo de tecido a ser analisado e as condições experimentais específicas aplicadas às amostras.

Os estudos de expressão gênica já realizados com tecido prostático e com linhagem celular utilizam, na sua maioria, os genes *GAPDH* (Rosner *et al.* 2007; Mink *et al.* 2010),  *$\beta$ -actina* (Luo *et al.* 2002; Stephan *et al.* 2004; Kinoshita *et al.* 2005), *18S* (Jariwala *et al.* 2007)



e *B2M* ( $\beta$ -2-microglobulina) (Taplin *et al.* 1995; Brum *et al.* 2003; Valenti *et al.* 2006). No entanto, trabalhos têm mostrado variações em alguns desses genes em tecidos prostáticos (Gross *et al.* 2007; Harada *et al.* 2007; Shi *et al.* 2009), sugerindo que os mesmos são inapropriados para uso como gene de referência em estudos de expressão gênica para essas amostras. Estudos recentes têm buscado a identificação de genes normalizadores adequados para os estudos de expressão gênica neste tipo de tecido (Ohl *et al.* 2005; Schmidt *et al.* 2006; Byun *et al.* 2009), o que revela a preocupação em reportar o perfil de expressão gênica a partir de uma normalização adequada. No entanto, não existem estudos específicos que tenham avaliado e validado o melhor gene normalizador para estudos de expressão gênica em cultura primária de células de carcinoma prostático.

### ***Receptor de Androgênios e seus corretores***

Os androgênios são fundamentais para o desenvolvimento e crescimento normal da próstata (Yang *et al.* 2005). A ação androgênica é mediada pelo receptor de androgênios, que atua como fator de transcrição dependente de ligante (Gobinet *et al.* 2002). Este receptor pertence à família de receptores nucleares de hormônios esteroides, que atuam como reguladores da transcrição, e compartilham uma mesma estrutura básica e homologia funcional (Gobinet *et al.* 2002). Estes receptores são caracterizados por uma estrutura modular primária, onde cada módulo representa uma unidade funcional distinta (Chatterjee 2003): i) domínio amino-terminal (NTD), implicado na função de transativação e recrutamento de cofatores; ii) domínio de ligação ao DNA (DBD), na porção central da

proteína; e iii) domínio carboxi-terminal de ligação ao ligante (LBD) (revisado em (Gobinet *et al.* 2002; Chatterjee 2003)).

Os principais efeitos dos androgênios são mediados pela testosterona e diidrotestosterona (DHT) nas células. A ligação destes ligantes induz o AR a assumir uma configuração que conduz à ativação ou inibição transcricional e permite a transmissão de sinais extracelulares em respostas intracelulares, pela ativação de elementos responsivos presentes nos promotores de genes-alvo e o recrutamento de cofatores da transcrição. Estes incluem corre reguladores que induzem a descompactação da cromatina para permitir o acesso da RNA polimerase e dos demais fatores de transcrição. Estes corre reguladores formam uma ponte entre a maquinaria transcricional e os receptores, modulando a transcrição gênica (Gobinet *et al.* 2002; Berrevoets *et al.* 2004).

A regulação transcricional pelo AR é modulada por interação deste com cofatores ou corre reguladores, os quais apresentam afinidade não-específica de ligação ao DNA (Gobinet *et al.* 2001; Suh *et al.* 2008). Essas proteínas corre reguladoras são componentes dispensáveis para a transcrição basal, mas têm a capacidade de aumentar (coativadores) ou reprimir (correpressores) a atividade transcricional de receptores nucleares (Berrevoets *et al.* 2004; Peng *et al.* 2008). Coativadores potencializam a transativação dependente do ligante do receptor de diferentes maneiras, incluindo interação direta com a maquinaria de transcrição e modificação covalente de histonas e outras proteínas. Correpressores regulam negativamente a transativação do AR por diversos mecanismos, induzindo alterações na estrutura da cromatina pelo recrutamento de desacetilases de histonas, inibindo o recrutamento de

coativadores pelo receptor e também inibindo a translocação nuclear do AR e sua ligação ao DNA (Berrevoets *et al.* 2004; Suh *et al.* 2008).

Mais de 170 proteínas já foram identificadas como correguladores do AR (Heemers *et al.* 2009). Estes correguladores têm sido sugeridos como alvos potenciais para intervenções terapêuticas no câncer prostático. Porém, estas proteínas apresentam diversos padrões de expressão durante a progressão do câncer de próstata, sendo expressas diferencialmente em tumores responsivos aos androgênios em relação aos tumores resistentes à ablação. Embora este grande número de correguladores tenha sido identificado, a contribuição de grande parte destas proteínas para a atividade do AR ainda não foi determinada (Agoulnik & Weigel 2006; Heemers *et al.* 2009).

A maioria dos cofatores do AR já isolados são coativadores, os quais apresentam diversos padrões de expressão no câncer de próstata. (Peng *et al.* 2008). Apesar de geralmente aumentarem a transativação do AR, nem sempre os coativadores encontram-se em níveis aumentados nos cânceres prostáticos (Golias *et al.* 2009). Os cofatores ARA24, PIAS1, ciclina D1, SRC1, ARA70 e FHL2 aparecem superexpressos no CaP, enquanto que ART-27 está reduzido em cânceres de próstata, quando comparado com o tecido adjacente. Além disso, embora a maioria dos cofatores seja expressa no epitélio prostático, o ARA55 é expresso exclusivamente no estroma prostático, e apresenta expressão reduzida no câncer de próstata (Peng *et al.* 2008; Golias *et al.* 2009).

São conhecidos relativamente menos correpressores do AR em comparação aos coativadores. Alguns já descritos são ARIP3, TR4, HBO1 e SHP, os quais atuam reprimindo a transcrição gênica mediada por diversos receptores nucleares (Gobinet *et al.* 2001). Dois

novos repressores da transativação do receptor de androgênios foram recentemente descritos, SREBP-1c e CRIF1; a inibição da expressão destes genes aumentou a proliferação das células prostáticas induzida por androgênios e a transativação do AR, enquanto a superexpressão destes fatores levou a uma diminuição da expressão do antígeno prostático específico (PSA) (Suh *et al.* 2008; Suh *et al.* 2008). Outro correpressor de receptores nucleares, NCoR, foi inicialmente estudado em camundongos *knock-out* para este gene, que apresentaram defeitos na diferenciação de eritrócitos e no desenvolvimento do timo e do sistema nervoso central (Jepsen *et al.* 2000). NCoR e o correpressor SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*) interagem com desacetilases de histonas para reprimir a transcrição, direta ou indiretamente (Cano *et al.* 2007). Alguns estudos observaram que o NCoR também está envolvido na regulação da ativação do AR (Cheng *et al.* 2002; Berrevoets *et al.* 2004). O NCoR interage com o AR e reprime a atividade transcricional estimulada pela diidrotestosterona, indicando que esta proteína é um regulador fisiológico da atividade do AR (Cheng *et al.* 2002). Além disso, uma alta expressão de NCoR transformou agonistas parciais do receptor de androgênios, RU486 e acetato de ciproterona, em antagonistas completos do AR (Berrevoets *et al.* 2004).

Estudos envolvendo estes correguladores ainda são controversos devido a complexidade da ação androgênica em tecidos-alvo, e pesquisas que busquem o conhecimento da função destes ativadores e repressores da atividade transcricional do AR são fundamentais para o entendimento do desenvolvimento do câncer de próstata. Estes genes podem servir como marcadores para o prognóstico e evolução do câncer para estágios

independentes do estímulo androgênico, além de tornarem-se possíveis alvos para tratamentos capazes de silenciar genes envolvidos na evolução tumoral.

### ***siRNAs***

A descoberta do silenciamento de genes mediado por RNAs dupla fita proporcionou rapidamente seu uso como método de escolha para bloquear a expressão de um gene (Lenz 2005). Em 1998, Fire e colaboradores observaram que duplas fitas de RNA (dsRNA) podem induzir um potente efeito de silenciamento de genes no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.* 1998). Este processo é chamado de RNA de interferência (RNAi), e apesar de ter originado uma técnica que é amplamente usada para induzir fenótipos de perda de função por inibir a expressão gênica pós-transcricionalmente (Czauderna *et al.* 2003), o RNAi é um processo evolutivamente conservado entre plantas e animais como um mecanismo de interferência na replicação viral ou atividade de transposons, ou em resposta a outras formas de expressão gênica inapropriadas (Moss 2001; Coburn & Cullen 2003; Hammond 2005). Duas principais formas de silenciamento gênico por RNAi podem ser observadas: silenciamento de genes pela degradação de seus mRNAs, obtido por dsRNA exógenas de 21 a 25 nucleotídeos, chamadas siRNAs (*small interfering RNA*), e bloqueio da tradução de mRNAs específicos, por meio de microRNAs (miRNAs) endógenos, que desempenham um importante papel na regulação da expressão de genes específicos durante o desenvolvimento dos organismos (Moss 2001; Hammond 2005).

Desde os primeiros estudos sobre RNAi, são demonstrados 5 passos envolvidos no funcionamento deste mecanismo. Duplas fitas de RNA maiores que 26 pb são clivadas por

uma enzima semelhante à RNase III, chamada Dicer, em fragmentos de 21-23 nucleotídeos (passo 1). Esses siRNAs correspondem a sequências sense e antisense do mRNA-alvo, e são reconhecidos por uma helicase, que transforma o duplex em duas fitas simples de RNA (passo 2). Uma fita então é incorporada em um complexo proteico de alto peso molecular chamado RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA) (passo 3), enquanto a outra serve como RNA guia para direcionar a clivagem de sequências homólogas de RNA por um componente endonucleotíptico do RISC (passo 4). Finalmente, o RISC é liberado do mRNA clivado e reciclado para reiniciar múltiplas etapas de catálise (passo 5) (Coburn & Cullen 2003).

Os siRNAs têm sido utilizados de maneira bem sucedida para avaliar o papel de uma determinada proteína em determinados tipos de cânceres. A expressão endógena do AR em células LNCaP foi suprimida com o uso de siRNAs, mostrando que estas células de CaP não conseguiram proliferar nem sobreviver em ausência do AR. Correguladores do AR também foram silenciados pela técnica de RNAi. O silenciamento do corregulador ARA70 inibiu a transativação do receptor de androgênios em células LNCaP (Rahman *et al.* 2003). A inibição da expressão dos correpressores SREBP-1c e CRIF1 por siRNAs aumentou a proliferação de células prostáticas induzida por androgênios, bem como a transativação do AR (Suh *et al.* 2008; Suh *et al.* 2008). CDC25A foi silenciado com siRNAs em células LNCaP e observou-se um aumento na atividade do promotor do gene *PSA*, indicando que a transativação do AR é normalmente suprimida pela proteína CDC25A endógena, confirmando seu papel de correpressora do AR (Chiu *et al.* 2009).

As pesquisas sobre o câncer de próstata têm sido prejudicadas pela ausência de modelos nos quais a doença é iniciada a partir de células epiteliais prostáticas humanas primárias. Os modelos mais comumente usados são linhagens celulares tumores xenográficos derivados de lesões metastáticas (Goldstein *et al.* 2010). A escassez de modelos utilizando culturas primárias de câncer prostático se reflete na ausência de um perfil de marcadores tumorais que possam ser associados ao diagnóstico e ao prognóstico dos tumores, bem como auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos. Assim, o estabelecimento de uma cultura primária de câncer de próstata e avaliação da resposta das células a diferentes tratamentos pode auxiliar no entendimento da fisiopatologia desta doença, uma vez que reflete melhor a variabilidade de resposta inerente à variabilidade dos indivíduos.

## **HIPÓTESES**

Supõe-se que, durante a transição da dependência para a independência androgênica dos tumores prostáticos, a via de sinalização do AR permaneça ativada, por mecanismos envolvendo alterações na expressão de correguladores do AR ou pela ativação do receptor por vias independentes de androgênios. Assim, o silenciamento do AR por siRNAs em células de câncer de próstata pode substituir a ablação hormonal, e tornar-se uma estratégia eficaz no tratamento de tumores independentes de androgênios. Ainda, o silenciamento de correguladores do AR pode auxiliar no entendimento do mecanismo de ação dos androgênios e sua participação nas diferentes vias envolvidas no desenvolvimento tumoral. Assim, supõe-se que a inibição de NCoR1 pode estimular o crescimento dos tumores, uma vez que a repressão deste corregulador sobre a ativação do AR seria diminuída, e, conseqüentemente, poderia aumentar a expressão de PSA pelo aumento da transativação do AR.



## OBJETIVOS

1. Estabelecer a cultura primária de carcinoma prostático a partir de fragmentos de tecido tumoral (*explants*);
2. Estabelecer a técnica de transfecção com siRNAs, silenciando o mRNA do *AR* em culturas primárias de CaP;
3. Identificar o melhor gene ou a melhor combinação de genes normalizadores para os estudos de expressão gênica em células de cultura primária de carcinoma prostático;
4. Verificar a expressão proteica de *AR*, *NCoR1* e  $\beta$ -tubulina por Western Blot em culturas de células LNCaP e em cultura primária de células de carcinoma prostático transfectadas ou não com siRNAs para o corregulador *NCoR1* ou para o *AR*;
5. Avaliar a proliferação celular, a expressão gênica de *PSA* e a dosagem de *PSA* no sobrenadante das células, em culturas de células LNCaP e em cultura primária de células de carcinoma prostático transfectadas ou não com siRNAs para o corregulador *NCoR1* ou para o *AR*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Delineamento do estudo*

Este estudo tratou-se de um estudo experimental.

### *Cultura de células LNCaP*

A linhagem celular LNCaP foi obtida da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA). As células foram mantidas a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI 1640 (Gibco BRL, NY, EUA) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) ou 0,5 mg/mL de kanamicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL, NY, EUA). As passagens foram feitas com tripsina/EDTA (0,25% w/v e 0,53 mM, respectivamente) (Gibco BRL, NY, EUA).

### *Cultura primária de células*

#### **Obtenção do tecido prostático**

Para realização das culturas primárias a população em estudo envolveu pacientes com diagnóstico de câncer de próstata. Os pacientes foram consultados e autorizaram a utilização

do material para este estudo. O tecido prostático (TP) foi obtido de pacientes masculinos, submetidos à prostatectomia radical por diagnóstico de CaP. Os pacientes foram recrutados nos turnos de ambulatório do Serviço de Urologia do HCPA, pelos urologistas participantes deste projeto. Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de câncer de próstata que não tivessem recebido tratamento com hormonioterapia ou quimioterapia e que não possuíam diagnóstico de outra neoplasia concomitante, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, indicados para cirurgia por seu médico responsável. Os objetivos da pesquisa foram explicados e foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1). No dia da cirurgia, foi coletado um fragmento do tecido de carcinoma prostático para realização das culturas primárias, sendo que um fragmento menor deste foi encaminhado ao exame anatomopatológico para confirmação do diagnóstico de tumor prostático.

### **Classificação dos tumores**

A classificação histológica da agressividade dos tumores seguiu o escore desenvolvido por Gleason em 1974, o qual se baseia no grau de perda da arquitetura normal do tecido glandular (forma, tamanho e diferenciação das glândulas). A classificação leva em conta o grau de Gleason e o escore de Gleason. O escore Gleason é uma soma do grau primário (representando a maior parte do tumor) e um grau secundário (relacionado à minoria do tumor) e é um número que varia de 2 a 10. Quanto mais alto o escore de Gleason, mais agressivo é o tumor e pior é o prognóstico do paciente (O'Dowd *et al.* 2001). A classificação

segundo este escore foi feita pelo Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Cultura celular de carcinoma prostático**

As condições de cultivo foram testadas de forma a obter a melhor condição experimental para estas células. O fragmento de tecido de carcinoma prostático foi seccionado em fragmentos menores, de cerca de 2 x 2 mm, que foram distribuídos em placas de 6 poços de 35 mm (cerca de 5 fragmentos por placa). Foi inicialmente testado o plaqueamento nas seguintes condições: i) com 1 mL de SBF ou ii) com 1 mL de meio DMEM com 10% de SBF. Após 24 horas: i) o SBF foi retirado e foi adicionado 1 mL de meio com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina, ou ii) o meio com soro foi mantido por mais 24 horas. Após mais 24 horas, este meio foi retirado e foram adicionados 2 mL de meio (com 10 % de soro e 1% de penicilina/estreptomicina) por poço. As culturas foram mantidas por aproximadamente 10 dias, sendo realizadas trocas de meio de cultura a cada 48 horas (2 mL de meio DMEM com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina). Além de testadas as condições de plaqueamento, foram testados os meios: DMEM (LCG Biotecnologia, Brasil), 199 e F12K (Gibco BRL, EUA). Depois de padronizadas as condições, as placas das culturas subsequentes foram divididas nos grupos de tratamento de acordo com o protocolo experimental, que são descritos no fluxograma a seguir.

## **Confirmação do diagnóstico de câncer prostático**

Para algumas culturas foi realizada uma análise de imunocitoquímica para a enzima  $\alpha$ -metilacil-coenzima A racemase (AMACR), um biomarcador de malignidade de células prostáticas (Kumaresan *et al.* 2010; Tischler *et al.* 2010). Uma amostragem de células cultivadas foi tripsinizada e fixada em lâmina para a realização da imunocitoquímica, com o kit CytoFunnel e CytoClip (Shandon). As células foram fixadas em paraformaldeído 4% e encaminhadas para o Instituto de Patologia, Porto Alegre, RS, onde foi realizada a análise. Foram utilizados os anticorpos anti-citoqueratina, clone 34 $\beta$ E12, código M0630 (Dako, Glostrup, Dinamarca), para identificação da presença de células epiteliais e anti-AMACR, clone 13H4, código IS060 (Dako, Dinamarca).

## ***Transfecção com siRNAs***

Os siRNAs para o *AR* foram adquiridos da Upstate (Charlottesville, Virginia, EUA). Os siRNAs para um gene específico são fornecidos em um reagente chamado *SMARTpool*®, que combina quatro siRNAs selecionados. Os siRNAs para o *NCoRI* foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), num conjunto de três siRNAs selecionados. Ambos apresentam uma eficiência de silenciamento de 75 a 95%. As concentrações dos siRNAs utilizadas foram definidas de acordo com o protocolo do fabricante, sendo estes adicionados aos meio de cultivo a uma concentração de 10 nM. A tabela 1 traz informações sobre os siRNAs utilizados para o *NCoRI*. A Upstate não fornece informações sobre as sequências que compõem o *SMARTpool*®.

Tabela 1. Identificação e sequências dos siRNAs para o mRNA do *NCoR1*.

ID Oligo	Fita	Sequência (5' - 3')	% GC	Tamanho
HSS114352	<i>Forward</i>	AUCACCUUCAACUUUAGAUGCAUGG	40%	25
	<i>Reverse</i>	CCAUGCAUCUAAAGUUGAAGGUGAU		25
HSS114353	<i>Forward</i>	AGCUGUGGCAGAUCCAGUGGAUUUG	52%	25
	<i>Reverse</i>	CAAUCCACUGGAUCUGCCACACGU		25
HSS114354	<i>Forward</i>	UAACGGUGCUGAUACAGGAGACUCC	52%	25
	<i>Reverse</i>	GGAGUCUCCUGUAUCAGCACCGUUA		25

Para a transfecção dos siRNAs, foi utilizado o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Este reagente contém uma formulação lipídica catiônica que apresenta uma alta eficiência de transfecção em uma ampla variedade de linhagens de células de mamíferos com toxicidade extremamente baixa. O kit também apresenta um diluente para os siRNAs. Também foi usado um controle negativo de siRNA não específico na mesma concentração que os siRNAs experimentais a cada transfecção. Todas as transfecções foram feitas seguindo-se o protocolo do fabricante. Para verificar a eficiência da transfecção, foi adicionado o *Block-iT Fluorescent Oligo*, uma molécula de RNA dupla fita que, uma vez localizado intracelularmente, emite uma fluorescência verde, que pode ser visualizada em microscópio invertido utilizando um filtro para FITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$ ).

### ***Tratamento hormonal***

Quando a quantidade de células permitia, os grupos referentes ao silenciamento (controle, silenciado e controle negativo) foram divididos em subgrupos tratados com diferentes doses de diidrotestosterona (DHT): grupo controle (meio de cultivo suplementado com 5% de SBF desteroideado), grupo DHT  $10^{-8}$  M e grupo DHT  $10^{-13}$  M. A diidrotestosterona foi dissolvida em etanol absoluto nas concentrações  $10^{-5}$  M e DHT  $10^{-10}$  M e, nos dias de tratamento, foi acrescentado 1  $\mu$ L de DHT para cada mL de meio de cultivo acrescido de 5% de SBF desteroideado.

### ***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 foram distribuídas em placas *multiwell* de 96 poços numa densidade de  $1 \times 10^2$  células/100 $\mu$ L de meio de cultura, sendo incubadas com 100  $\mu$ L de meio com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram divididas nos grupos de tratamento de acordo com o protocolo experimental, e no dia de avaliação (3º dia após silenciamento), foram retirados 10  $\mu$ L de meio de cultura e adicionados 10  $\mu$ 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 h. Após a incubação, todo o meio da placa foi aspirado e adicionou-se 100  $\mu$ L de DMSO (*dimethyl sulfoxide*) (Sigma, St Louis, MO, EUA) por poço, o qual reage com o MTT

formando uma solução de coloração arroxeada, que tem sua densidade óptica medida em uma leitora de ELISA no comprimento de onda de 540 nm.

### ***Análise da expressão gênica***

O RNA total foi extraído lisando as células diretamente nas placas com 1 mL do reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação foi feita a partir de 1 µL 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 absorvância a 260 nm ( $[RNA] = A_{260} \times \text{diluição} \times 40 \mu\text{g/mL}$ ).

### **Reação em Cadeia da Polimerase a partir de Transcrição Reversa (RT-PCR)**

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. A técnica consiste de duas etapas, sendo a primeira a transcrição reversa do mRNA mensageiro a DNA complementar (cDNA), o qual é submetido à Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, que permite a quantificação do cDNA submetido à amplificação pela enzima Taq DNA Polimerase.



### **Síntese do 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 (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)<sub>12-18</sub> e os desoxirribonucleotídeos (dNTPs). Em seguida foi adicionada uma mistura contendo tampão Tris-HCl 200 mM pH 8,4 com KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 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**

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 *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 obter a especificidade do produto amplificado, uma vez que a  $T_m$  é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado apresentam picos de desnaturação mais baixos.

#### *Curva Padrão*

Para cada gene em estudo foi realizada uma curva padrão, através da 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 momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência é definido como o  $C_T$ , que é inversamente proporcional ao logaritmo (log) da quantidade de cDNA (ng) (Higuchi *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.

### *Normalização*

A normalização por gene de referência é um método simples e popular para controle interno de erros na PCR em tempo real (Huggett *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 do(s) gene(s) em estudo (Bustin 2002).

Para a seleção do melhor gene normalizador para as análises de expressão gênica nas amostras de cultura primária de carcinoma prostático foram amplificados 9 genes candidatos a normalizador, cujos resultados foram posteriormente analisados utilizando-se *softwares* específicos para busca de genes normalizadores *geNorm* (Vandesompele *et al.* 2002) e *NormFinder* (Andersen *et al.* 2004). Ambos estão disponíveis *on-line* e utilizam o Microsoft Excel (Windows Office) como plataforma de trabalho. O *geNorm* ranqueia os genes de acordo com a variação pareada com todos os outros genes e define uma medida de estabilidade, o valor *M*, de um gene em particular comparado com todos os outros, que deve ser menor do que 1,5. Genes com o menor valor *M* apresentam maior estabilidade de expressão. O software fornece ao final a combinação de dois genes candidatos com valores de expressão similares como sendo os mais adequados para uso como normalizadores, indicando um fator de normalização que pode ser utilizado diretamente para normalizar os valores obtidos na amplificação do gene de interesse. Já o *NormFinder* examina a estabilidade de expressão de cada gene independentemente dos demais analisados. A aplicação do

*NormFinder* estima a variação na expressão gênica, levando em conta a possível variação ao longo de subgrupos amostrais. A estabilidade dos genes é mostrada como valor de estabilidade, sendo que os genes com menor valor de estabilidade possuem alta estabilidade de expressão. Além da escolha do melhor gene normalizador, o programa ainda fornece a melhor combinação de dois genes para as amostras divididas em subgrupos como forma de compensar a variabilidade do sistema.

Os genes estudados foram: *β-actina (ACTB)*, *aminolevulinato sintase 1 (ALAS1)*, *β-2-microglobulina (B2M)*, *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*, *hipoxantina fosforibosil-transferase 1 (HPRT1)*, *complexo succinato desidrogenase, subunidade A (SDHA)*, *proteína de ligação à TATA box (TATA Box binding protein – TBP)*, *ubiquitina C (UBC)* e *Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta (YWHAZ)* (tabela 2).

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.

Tabela 2. Informações sobre os genes candidatos a normalizadores para expressão gênica em cultura primária de células de carcinoma prostático.

Símbolo	Número de acesso*	Nome	Localização genômica	Função celular
<i>ACTB</i>	NM_001101.3	Beta-actina	7p22	Citoesqueleto
<i>ALAS1</i>	NM_199166.1	Aminolevulinato delta-sintase 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]	3p21.1	Síntese do Heme
<i>B2M</i>	NM_004048.2	Beta-2-microglobulina [ <i>Homo sapiens</i> ]	15q21-q22.2	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<i>GAPDH</i>	NM_002046.3	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [ <i>Homo sapiens</i> ]	12p13	Metabolismo de carboidratos
<i>HPRT1</i>	NM_000194.2	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]	Xq26.1	Recuperação metabólica de purinas
<i>SDHA</i>	NM_004168.2	Complexo succinato desidrogenase, subunidade A, flavoproteína (Fp) [ <i>Homo sapiens</i> ]	5p15	Transporte de elétrons (Ciclo de Krebs e Cadeia Respiratória)
<i>TBP</i>	NM_003194.4	Proteína de ligação ao TATA box [ <i>Homo sapiens</i> ]	6q27	Transcrição de genes
<i>UBC</i>	NM_021009.5	Ubiquitina C [ <i>Homo sapiens</i> ]	12q24.3	Ubiquitinação
<i>YWHAZ</i>	NM_001135699.1	Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta [ <i>Homo sapiens</i> ]	8q23.1	Proteína mediadora de transdução de sinal

\*Sequência de Referência NCBI (Gene Bank)

#### *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 *AR* e *β2-microglobulina*, desenhados pelo programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky 2000) e sintetizados pela Invitrogen. Os oligonucleotídeos iniciadores para avaliar a expressão gênica de *NCoRI*, *ALAS1*, *ACTB*, *GAPDH*, *HPRT1*, *PSA*, *SDHA*, *TBP*,

*UBC* e *YWHAZ*, 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 3.

Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do mRNA dos genes candidatos a normalizadores e dos genes de interesse e tamanho do fragmento amplificado.

<b>Oligo</b>	<b>Fita</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Fragmento (pb)</b>
<i>ACTB</i>	<i>Forward</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	140
	<i>Reverse</i>	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	
<i>ALAS1</i>	<i>Forward</i>	AGTGTGAAAACCGATGGAGG	140
	<i>Reverse</i>	CGATCATACTGAAAAGTGGAAACAG	
<i>B2M</i>	<i>Forward</i>	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	165
	<i>Reverse</i>	ACAAGTCTGAATGCTCCACT	
<i>GAPDH</i>	<i>Forward</i>	CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG	133
	<i>Reverse</i>	TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC	
<i>HPRT1</i>	<i>Forward</i>	AGATGGTCAAGGTCGCAAG	128
	<i>Reverse</i>	GTATTCATTATAGTCAAGGGCATATCC	
<i>SDHA</i>	<i>Forward</i>	TGGTTGTCTTTGGTCGGG	85
	<i>Reverse</i>	GCGTTTGGTTTAATTGGAGGG	
<i>TBP</i>	<i>Forward</i>	GGGTTTCCAGCTAAGTTCTTG	150
	<i>Reverse</i>	CTGTAGATTAAACCAGGAAATAAC	
<i>UBC</i>	<i>Forward</i>	GCCTTAGAACCCAGTATCAG	74
	<i>Reverse</i>	AAGAAAACCAGTGCCCTAGAG	
<i>YWHAZ</i>	<i>Forward</i>	CAACACATCCTATCAGACTGGG	133
	<i>Reverse</i>	AATGTATCAAGTTCAGCAATGGC	
<i>AR</i>	<i>Forward</i>	CTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCG	427
	<i>Reverse</i>	GGGCTGACATTCATAGCCTTCAATGTGTGAC	
<i>PSA</i>	<i>Forward</i>	ACCAGAGGAGTTCTTGACCCCAA	161
	<i>Reverse</i>	CCCCAGAATCACCCGAGCAG	
<i>NCOR1</i>	<i>Forward</i>	TCAAAACACCATGTCCAGAGG	137
	<i>Reverse</i>	GAGACTTCGCTGGGATACTTTC	

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.

### *Análise da expressão proteica*

#### **Extração de Proteínas**

Para extração das proteínas, as células foram retiradas das placas com auxílio de um raspador e solução salina-fosfato (PBS), transferidas para um microtubo de 2 mL e lisadas com uma solução tampão contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 1mM pH 7,4, desoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, PMSF 1 mM, NaF 1 mM e leupeptina 1 µg/mL. O material foi solubilizado por 2 h a 4°C, e após foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi transferido para um tubo novo, e submetido à dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bradford 1976), e o material estocado a -20°C para análise da expressão proteica pelo método de *Western Blot*.

## Western Blot

Para separação das proteínas foi utilizado o SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) com uma concentração de poliacrilamida de 7%. Aproximadamente 50 µg da proteína extraída das amostras foram incubadas com solução de Laemmli (glicerol 50%, SDS 10%, Tris 62,5 mM, azul de bromofenol 0,1% e 2-β-mercaptoetanol 0,05%) a 95°C por 2 min (Laemmli 1970) para desnaturação e foram submetidas à eletroforese na presença de tampão contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. Depois de efetuada a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, previamente incubada em tampão de transferência (glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1% e metanol 20%, pH 8,3). A transferência foi efetuada no sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad), por 1 h e 30 min, com uma diferença de potencial elétrico de aproximadamente 100 V. As membranas foram incubadas durante 1 hora em solução bloqueadora (TTBS - NaCl 15 mM, EDTA 5 mM, TRIS 50 mM, Tween 20 0,5%, pH 7,4 e leite desnatado 5%). Após o bloqueio, as membranas de nitrocelulose foram incubadas por 16 h a 4°C, sob agitação constante, com os anticorpos específicos diluídos em TBS (anti-AR, Upstate, Charlottesville, Virginia, EUA; anti-NCoR1, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; anti-βtubulina, Invitrogen). Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS (3 lavagens de 10 min cada) e então incubadas com o segundo anticorpo (IgG *goat anti-mouse* ou *anti-rabbit*, Zymed, Invitrogen) conjugado com a enzima *horseradish peroxidase* por 1 h a 4°C. Após, as membranas foram novamente lavadas com TBS (3 lavagens de 10 min cada) e incubadas com solução para quimioluminescência (ECL) por 1 min, em sala escura e colocadas em contato com o filme fotográfico (HyperFilm ECL, GE



HealthCare, Uppsala, Suécia), de 30 s a 5 min. Para revelação, o filme foi colocado em solução reveladora por 1 min, lavado em água, colocado na solução fixadora por mais 1 min, e novamente lavado em água, deixando-se secar. A densidade óptica das bandas foi medida por um sistema de processamento de imagem (ImageStation 4000MM PRO, Carestream Health, EUA). A densitometria obtida para as bandas das proteínas em estudo foi corrigida pela obtida para a banda da proteína  $\beta$ -tubulina, e os resultados expressos em unidades arbitrárias.

### *Dosagem de PSA*

O sobrenadante das células LNCaP em cultivo para realização dos experimentos de proliferação celular foi coletado em dois momentos (anterior e posterior ao silenciamento) para dosagem de PSA (figura 2). O meio foi coletado em microtubos de 0,5 mL (união do sobrenadante de 5 poços) e congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A dosagem de PSA foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com o kit Immulite PSA (Siemens Medical, EUA).

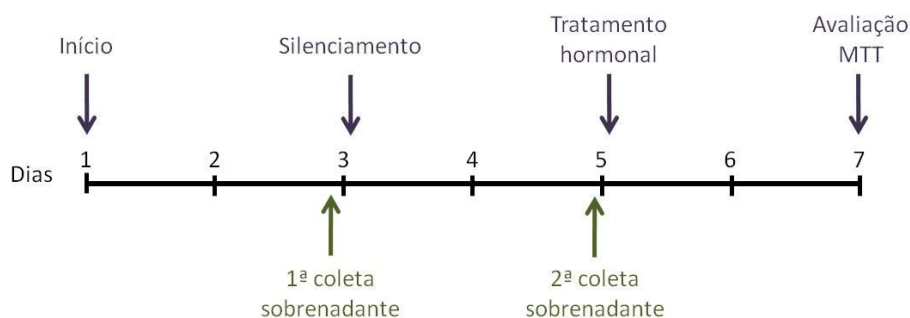


Figura 2. Esquema de coletas do sobrenadante das células LNCaP em cultivo para dosagem de PSA.

*Fluxogramas dos grupos de tratamento*

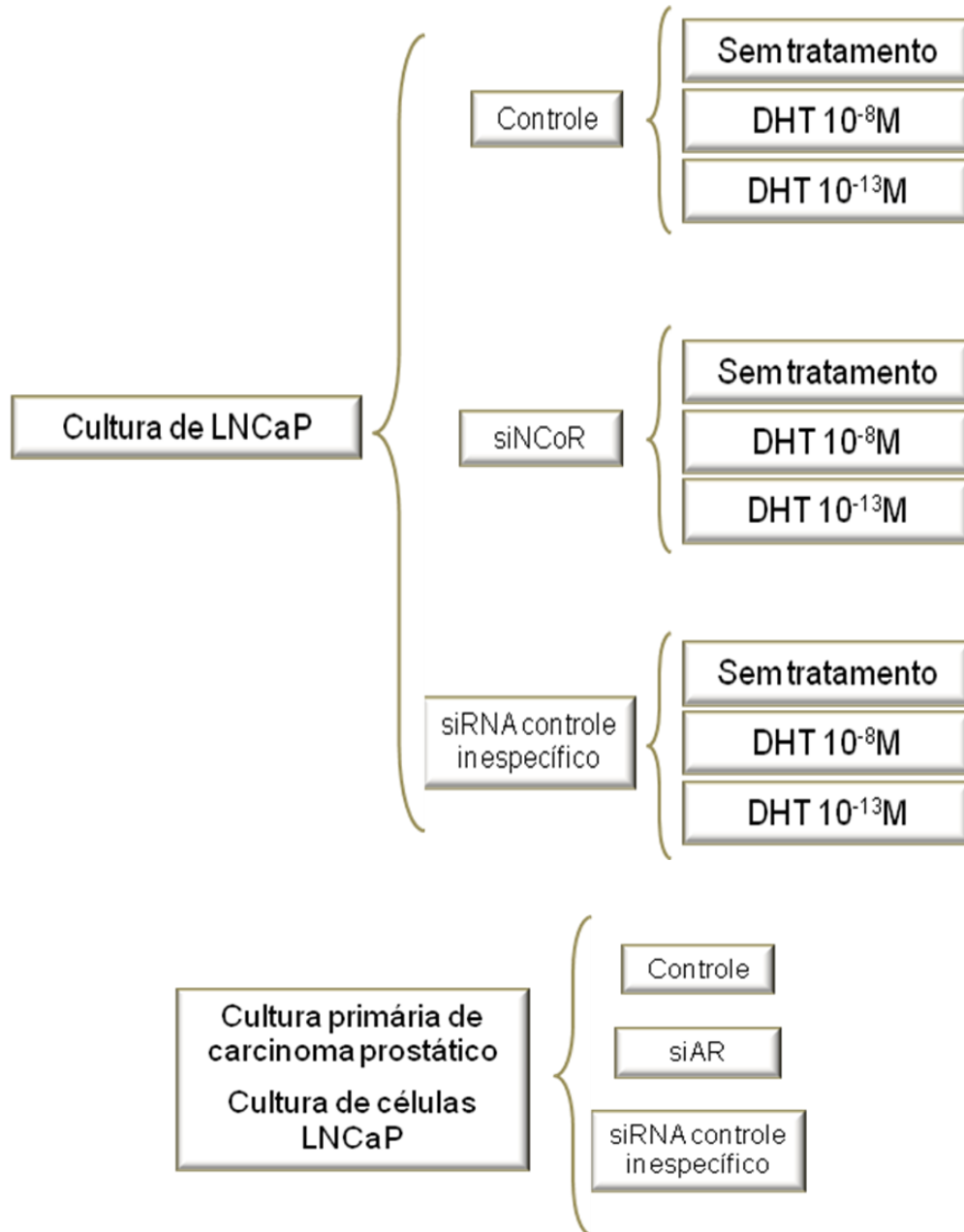


Figura 3. Fluxograma dos grupos de tratamento experimental das culturas primárias de câncer de próstata e de células LNCaP.

### ***Cálculo do tamanho amostral***

O tamanho da amostra para a análise da expressão gênica nas culturas celulares foi calculado através do programa PEPI 3, utilizando-se dados de Ozen e Ittman, 2005 (Ozen & Ittmann 2005) e para análise de proliferação, dados de Brum e cols, 2003 (Brum *et al.* 2003). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 80% e diferença entre as médias de 0,98 unidades arbitrárias para análise da expressão gênica e 0,04 unidades de absorvância para análise de proliferação, chegando-se a um N de 5 indivíduos por grupo de silenciamento, totalizando um N de 15 pacientes e 15 experimentos com células LNCaP.

### ***Análise Estatística***

Foi realizado um teste de Qui-quadrado para avaliar a associação entre os escores de Gleason dos tumores cultivados e a adesão e proliferação dos fragmentos. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas, para comparação entre os grupos nos experimentos de proliferação celular e dosagens de PSA no sobrenadante das células em cultivo. Foi considerado o nível de significância quando  $P < 0,05$ . Todas as análises foram feitas utilizando-se o processador de dados SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

### ***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 em abril de 2008, sob o número 08-172.

### ***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 proteica, em colaboração com os laboratórios de Fisiologia Cardiovascular e Laboratório de Interação Neuro-humoral do departamento de Fisiologia da UFRGS, local onde foram efetuadas as quantificações das imagens de autorradiografias.

### ***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 08-172) e da Capes (Programa de Fomento à Pós-Graduação – PROF).

## **RESULTADOS**

O presente trabalho terá seus resultados divididos em três capítulos:

1. Estabelecimento da cultura primária de carcinoma prostático;
2. Seleção do gene de referência para estudos de expressão gênica em células de cultura primária de carcinoma prostático;
3. Silenciamento do *AR* e do corregulador *NCoRI*.

## ***CAPÍTULO 1***

### ***Estabelecimento da cultura primária de carcinoma prostático***

As culturas foram padronizadas para as condições ideais de cultivo, nas quais as células foram capazes de aderir e proliferar a partir do *explant* colocado na placa. Foram avaliados, para verificar a melhor adesão dos *explants*, o plaqueamento com soro bovino fetal puro e o plaqueamento com o próprio meio de cultivo. Quando o plaqueamento foi feito com 1 mL de SBF puro, este foi trocado após 24 horas, para evitar a toxicidade para as células. Quando plaqueados no meio de cultivo (meio com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina ou 0,5 mg/mL de kanamicina), foram mantidos por 48 horas com 1 mL de meio. A condição que proporcionou maior adesão dos fragmentos foi o plaqueamento com SBF puro por 24 horas.

Em seguida, foram testados três tipos de meio de cultivo: DMEM, 199 e F12K. O meio 199 foi o que menos manteve a adesão e proliferação das células, enquanto que o DMEM e o F12K mostraram resultados semelhantes em relação à manutenção das culturas. O meio escolhido para cultivo foi o meio F12K. A figura 4 mostra o padrão de expansão das células a partir dos fragmentos tumorais.

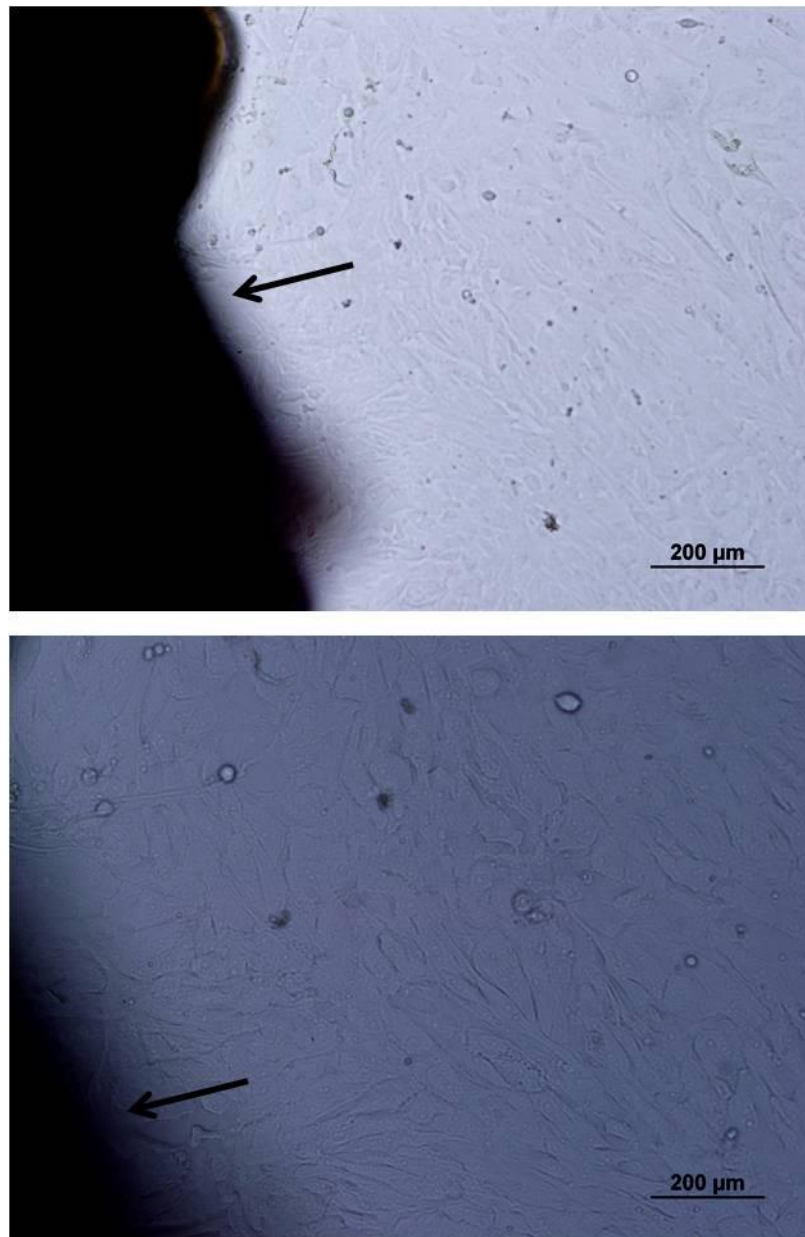


Figura 4. Células de cultura primária de fragmentos de tumor de próstata. A seta indica o fragmento tumoral a partir do qual as células proliferam. Aumento: 40x.



Mesmo depois de padronizadas as condições de cultivo, diversas culturas não tiveram sucesso devido a não-adesão dos fragmentos ou ao descolamento precoce dos mesmos (47,7% dos cultivos apresentaram adesão e proliferação, 35,4% não aderiram ou não proliferaram e 9,2% contaminaram). Avaliando o resultado do exame anatomopatológico destas amostras, verificou-se que a grande maioria das culturas realizadas correspondiam a tumores classificados com escore de Gleason igual a 6 e 7, sendo a menor proporção (6,2%) classificados com escore de Gleason igual a 8 e 9, e um não informado (tabela 4). A figura 5 ilustra a classificação estabelecida para as culturas segundo a adesão e proliferação das células, mostrando as proporções de culturas aderidas e não aderidas a partir de tumores com escore de Gleason 6 e 7. Não há associação entre o escore do tumor e a adesão das células (Qui-quadrado,  $P = 0,149$ ).

As células se mantinham viáveis por no máximo 15 dias em cultivo, depois disso, a camada de células começava a descolar da placa. Nos dias de tratamento, o fragmento era retirado das placas e somente as células eram tratadas.

Tabela 4. Classificação segundo o escore de Gleason das culturas realizadas.

<b>Escore de Gleason</b>	<b>Nº culturas</b>	<b>% do total</b>
6	28	43,1
7	32	49,2
8	2	3,1
9	2	3,1
NI	1	1,5
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>100,0</b>

NI - não informado

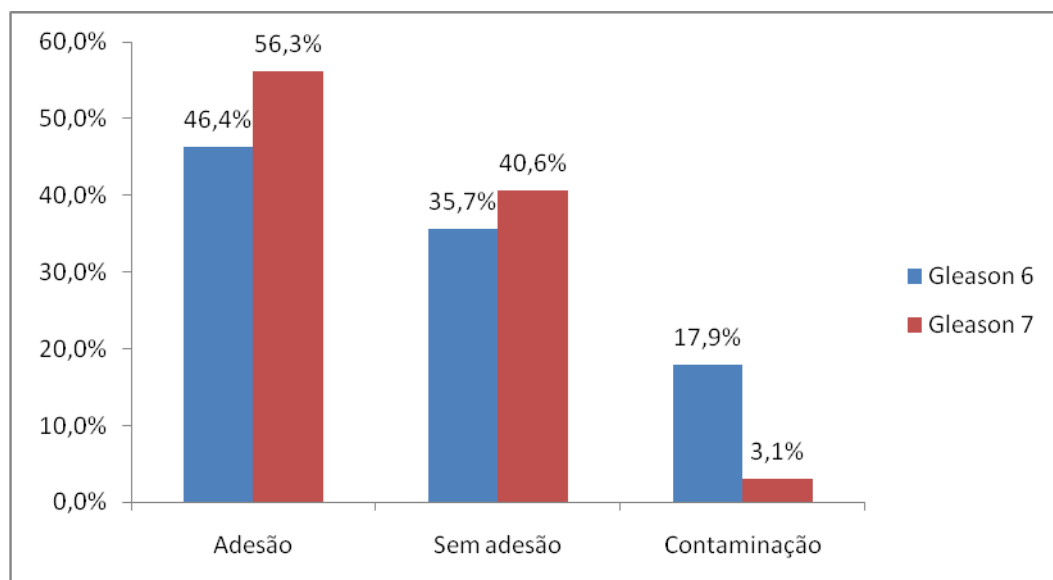


Figura 5. Proporção de culturas aderidas, não aderidas e contaminadas entre o total de culturas de tecido prostático com escore de Gleason 6 e 7.

As células em cultivo foram testadas inicialmente para a presença de citoqueratinas de alto peso molecular (1, 5, 10 e 14), que evidenciam a presença de células epiteliais. Houve marcação positiva para esta proteína, caracterizando o cultivo de células epiteliais prostáticas (figura 6A). Com o intuito de estabelecer uma confirmação do cultivo de células tumorais prostáticas, foi testada a técnica de imunocitoquímica para a enzima  $\alpha$ -metilacil-coenzima A racemase (AMACR), recentemente descrita como biomarcador de malignidade de células prostáticas. A marcação também foi positiva para a racemase, indicando que estas células epiteliais são células malignas, confirmando que esta técnica permite o cultivo de células tumorais prostáticas (figura 6B).

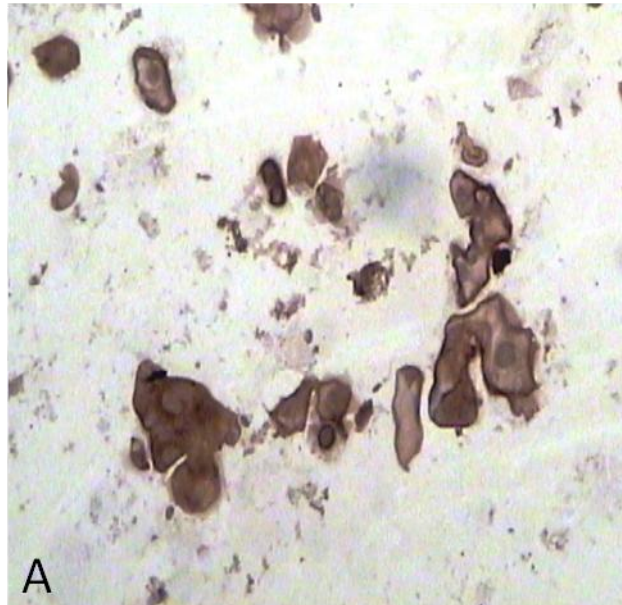


Figura 6. Imunocitoquímica das células tumorais prostáticas em cultura primária. A) Marcação positiva (em marrom) da citoqueratina de alto peso molecular, evidenciando a presença de células epiteliais. B) Marcação positiva (em marrom) da racemase, indicando a malignidade das células epiteliais prostáticas em cultivo. Aumento: 40X.

## ***CAPÍTULO 2***

### ***Seleção do gene de referência para estudos de expressão gênica em células de cultura primária de carcinoma prostático***

Para avaliação do melhor gene ou da melhor combinação de genes de referência para as análises de expressão gênica realizadas nas amostras de cultura primária de carcinoma prostático, após amplificação e quantificação baseada na curva padrão, os valores obtidos para as amostras foram avaliados pelos softwares *geNorm* (Vandesompele *et al.* 2002) e *NormFinder* (Andersen *et al.* 2004), específicos para busca de genes normalizadores.

As amostras utilizadas para avaliar o melhor gene ou a melhor combinação de genes para serem usados como normalizadores foram tanto amostras de células cultivadas em condição controle, não submetidas a nenhum tratamento experimental (grupo controle), bem como amostras provenientes de células submetidas à transfecção com siRNAs específicos para o AR ou siRNAs inespecíficos (grupo transfectado), de um total de 10 culturas. Foram testados inicialmente os valores de diluição adequados para a amplificação das amostras dentro dos pontos de diluição da curva padrão, sendo utilizada uma diluição de 100 vezes do cDNA original. O gene da *ubiquitina C* foi excluído da análise com os softwares *geNorm* e *NormFinder* pelo fato das amostras, mesmo diluídas 100 vezes, apresentarem o ciclo limiar de amplificação mais precoce do que o ponto mais concentrado da curva padrão, o que poderia levar a quantificação e interpretação errôneas. As reações foram repetidas e os dados se confirmaram, levando à decisão de excluir este gene da análise.

Dos oito genes restantes, *ALAS1*, *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA*, *TBP*, e *YWHAZ*, foram obtidos os valores de quantidade média de expressão e de ciclo limiar médio. A tabela 5 mostra uma análise inicial da dispersão das amostras considerando os valores de ciclo limiar, listados em ordem crescente de coeficiente de variação, ou seja, os localizados na parte superior teriam menor variabilidade devido à menor dispersão dos dados. O valor da razão entre os valores mínimo e máximo dos  $C_T$ s (MFC, *maximum fold change*) foi inferior a 2, o que também é um indicador de estabilidade de expressão (tabela 5). Os dados de quantidade média (em ng) obtidos a partir dos valores de  $C_T$  foram analisados pelas ferramentas descritas a seguir.

Tabela 5. Medidas de dispersão dos valores de  $C_T$  dos genes analisados.

<b>Gene</b>	<b>Média dos <math>C_T</math>s</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>CV (%)</b>	<b>MFC</b>
<i>ALAS1</i>	29,83	2,25	7,55	1,26
<i>YWHAZ</i>	24,77	2,05	8,26	1,43
<i>HPRT1</i>	31,40	2,65	8,43	1,31
<i>SDHA</i>	29,43	2,50	8,49	1,34
<i>B2M</i>	21,15	1,86	8,78	1,33
<i>GAPDH</i>	21,97	2,13	9,68	1,35
<i>ACTB</i>	22,35	2,39	10,71	1,44
<i>TBP</i>	30,33	3,39	11,17	1,47

MFC = *maximum fold change* (razão entre os valores máximo e mínimo)

### *geNorm*

O algoritmo *geNorm* indica os genes com expressão mais estável através do valor  $M$ , e apresenta ao final a combinação dos dois genes com expressão mais estável no grupo de amostras analisado, sem levar em conta qualquer condição experimental aplicada às mesmas.

A figura 7 mostra os valores  $M$  correspondentes aos oito genes analisados, indicando quais destes são os menos estáveis e quais são os mais estáveis. Este software indicou a combinação dos genes *B2M* e *YWHAZ* como a melhor combinação de genes normalizadores para estudos de expressão gênica nas amostras estudadas ( $M = 0,578$ ).

Pelo fato desta ferramenta não discriminar entre grupos de tratamento para analisar a estabilidade de expressão dos genes, foi realizada uma análise em paralelo, na qual foram avaliados separadamente os grupos controle (células cultivadas sem nenhum tratamento) e transfectado (células que sofreram transfecção com siRNAs para o AR ou siRNAs inespecíficos). A figura 8 mostra os valores  $M$  para os oito genes analisados, tanto para o grupo controle (A) quanto para o grupo transfectado (B). A análise de cada grupo separadamente mostrou o mesmo resultado, indicando os genes *ALAS1* e *SDHA* como os genes mais estáveis ( $M = 0,518$  nos controles e  $M = 0,425$  nos tratados).

O *geNorm* fornece ainda uma análise de quantos genes referência seriam necessários para uma estratégia de normalização acurada, com base na contribuição de cada gene adicionado sobre o fator de normalização das amostras, fazendo um cálculo de variação pareada. A sugestão do programa é que, à medida que são acrescentados os genes menos estáveis à comparação e esta variação atinge um valor de 0,15, a contribuição deste gene não teria efeito significativo sobre o fator de normalização, e que, portanto, o número ideal de

genes de referência seria o anterior. A figura 9 ilustra as variações calculadas a partir dos dados de todas as amostras avaliadas simultaneamente. Como o valor  $V_{2/3}$  é 0,225, é sugerido o uso de três genes normalizadores. Sendo o valor  $V_{3/4}$  igual a 0,155, muito próximo do sugerido como ideal, a inclusão de um quarto gene não tem efeito significativo na normalização, confirmando que o número ideal de genes normalizadores seria três.

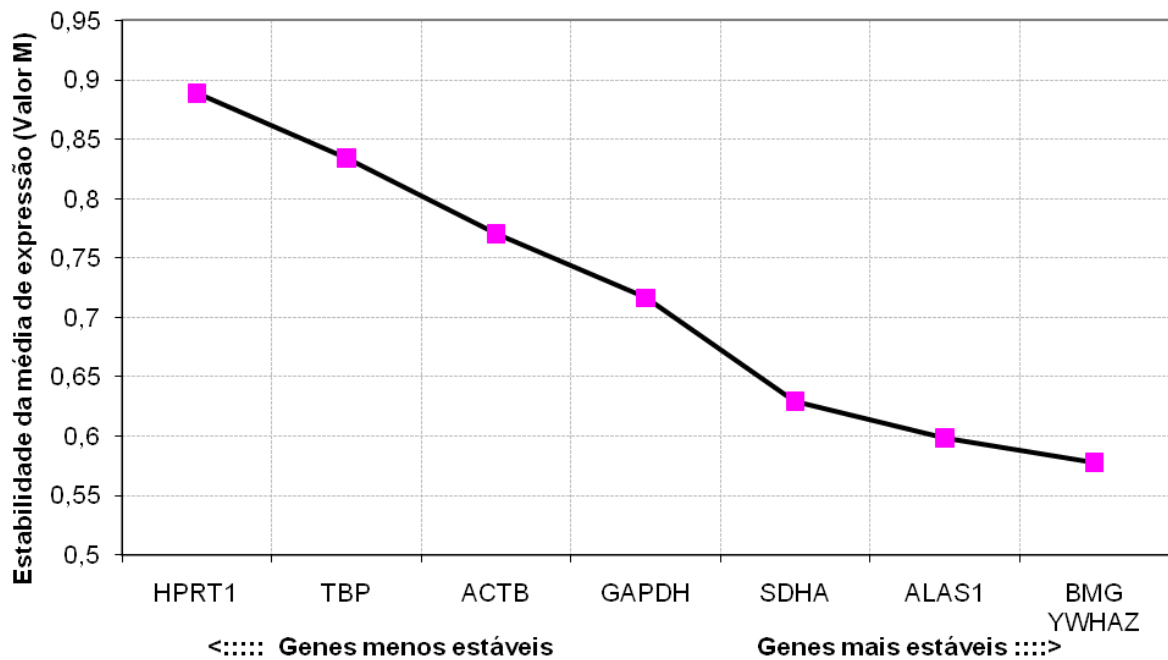


Figura 7. Valores de estabilidade da média de expressão dos genes em estudo pela análise com o *software geNorm* para todas as amostras, indicando a combinação dos dois genes de referência mais estáveis. O maior valor M corresponde ao gene menos estável (*HPRT1*), enquanto os menores valores M correspondem aos genes mais estáveis (*B2M* e *YWHAZ*).



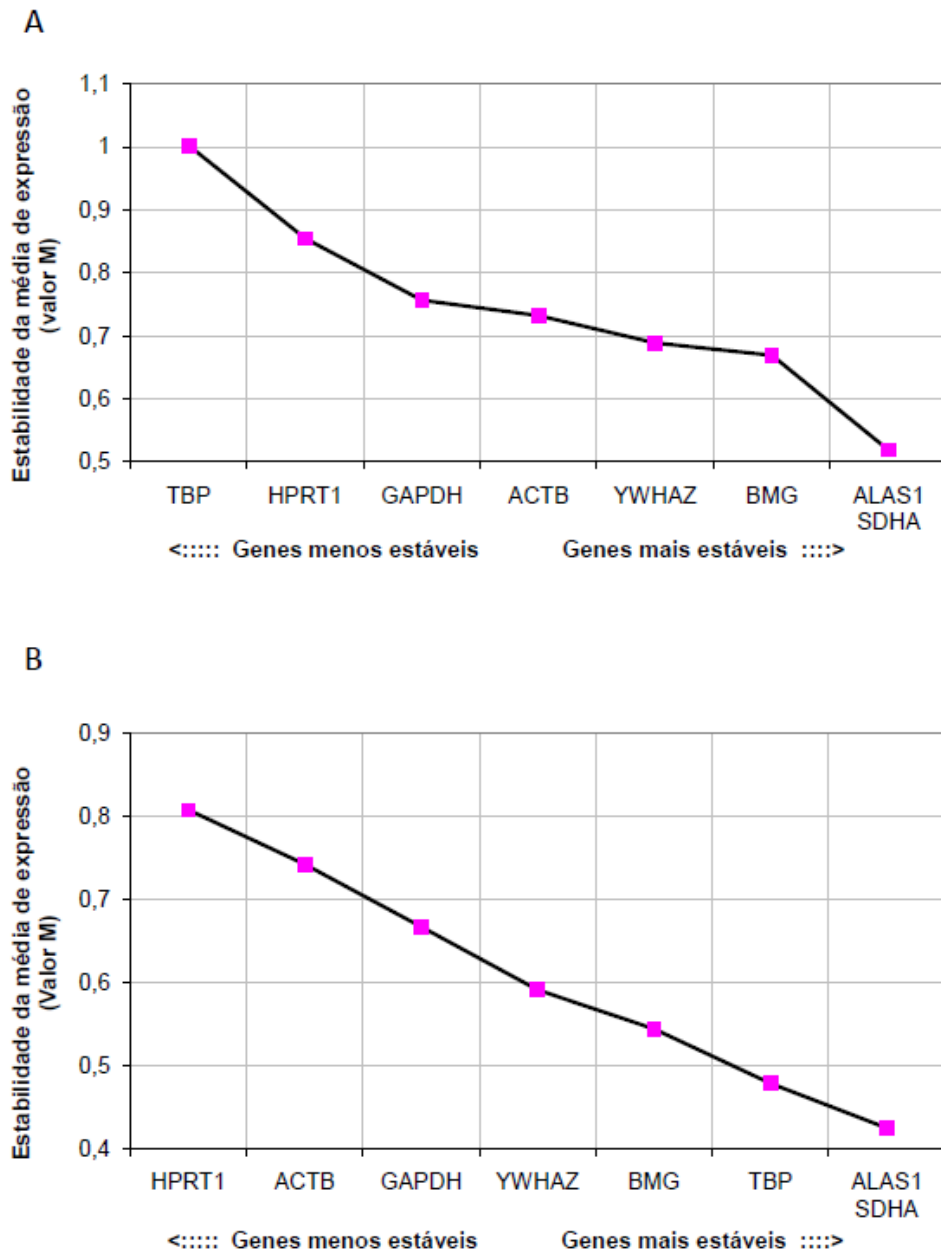


Figura 8. Valores de estabilidade da média de expressão dos genes em estudo pela análise com o *software geNorm* para as amostras divididas em grupo controle (A) e grupo transfectado com siRNAs (B), indicando a combinação dos dois genes de referência mais estáveis. A análise de ambos os grupos indicou os genes *ALAS1* e *SDHA* como os mais estáveis.

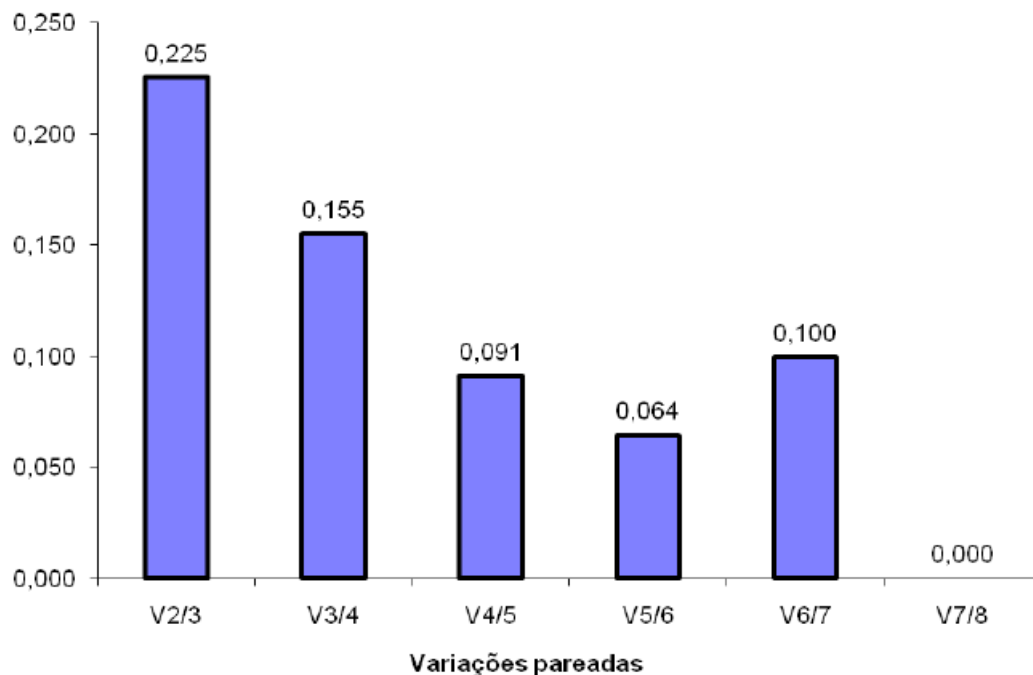


Figura 9. Análise da variação pareada feita com base no fator de normalização gerado pelos dados dos genes mais estáveis à medida que um gene adicional é inserido. Considerando um ponto de corte em 0,15, o número de genes de referência indicados para uma normalização adequada é igual a três.

### ***NormFinder***

O *NormFinder* fornece os valores de estabilidade dos genes analisados, avaliando cada um de maneira independente nas amostras estudadas. Fazendo uma avaliação das amostras analisadas, tanto sem divisão quanto divididas nos grupos controle e transfectado, o gene com menor variabilidade foi o *SDHA*, com valor de estabilidade de 0,143 e 0,035, respectivamente (tabela 6). O software ainda fornece os valores de estabilidade considerando análises intragrupo e intergrupo (figura 10), as quais confirmam a menor variabilidade do gene *SDHA*

quando considerados os grupos experimentais. A melhor combinação de genes sugerida foi *SDHA* e *GAPDH*.

Tabela 6. Valores de estabilidade dos genes de referência analisados quando comparados sem a subdivisão nos grupos controle e tratado (Total) e com a divisão (Grupos). Menores valores de estabilidade indicam menor variabilidade na expressão, sugerindo o gene *SDHA* como melhor escolha para normalização nas amostras estudadas.

Gene	Valor de estabilidade	
	Total	Grupos
<i>ACTB</i>	0,387	0,161
<i>ALAS1</i>	0,638	0,237
<i>B2M</i>	0,433	0,220
<i>GAPDH</i>	0,202	0,127
<i>HPRT1</i>	0,282	0,171
<i>SDHA</i>	<b>0,143</b>	<b>0,035</b>
<i>TBP</i>	0,242	0,132
<i>YWHAZ</i>	0,854	0,297

Melhor gene

***SDHA***

Melhor combinação de dois genes

***GAPDH e SDHA***

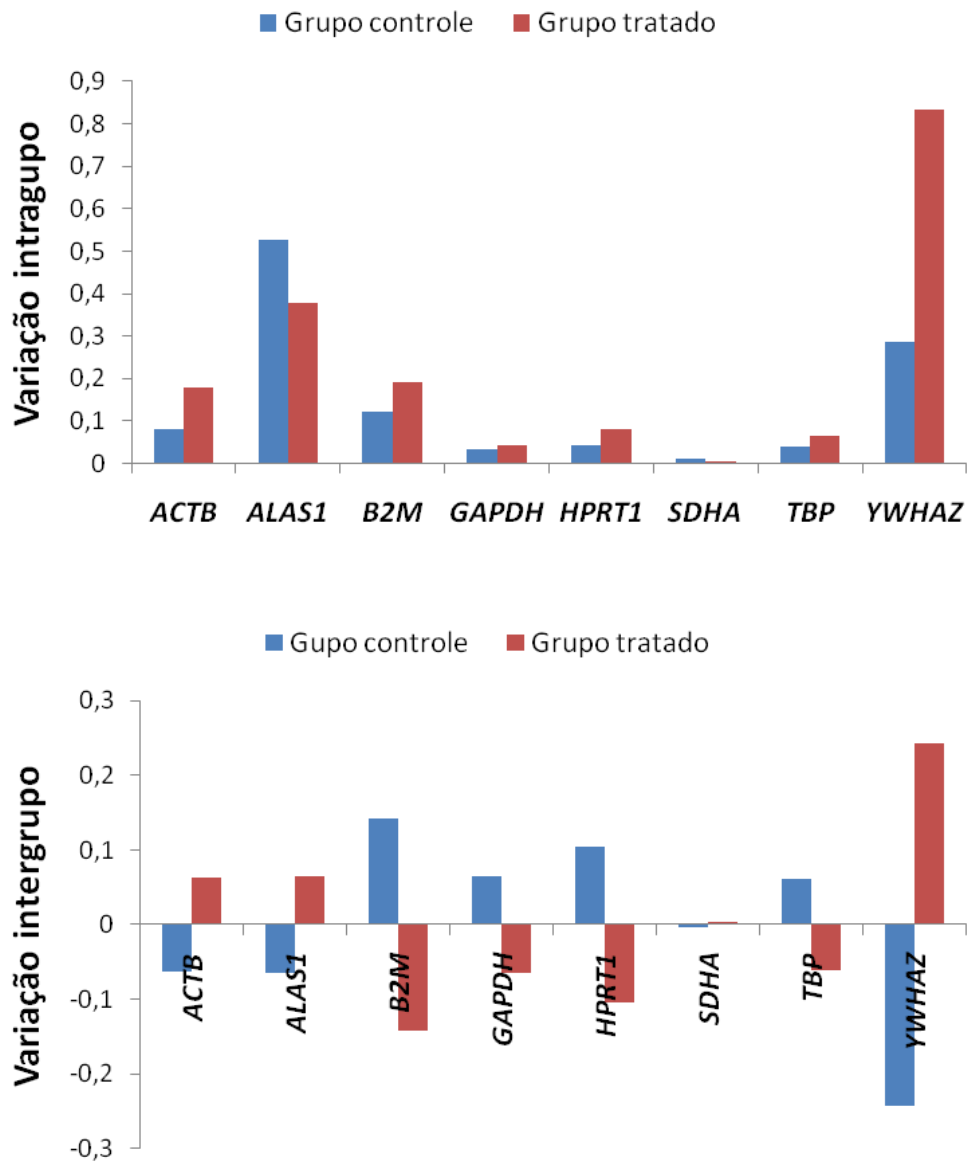


Figura 10. Estabilidade dos genes normalizadores quando avaliadas as variações de expressão intragrupo e intergrupo. O gene *SDHA* mostrou menor variabilidade em ambas as situações.

## Normalização da expressão gênica

Para visualizar as diferenças de resultados obtidos quando a normalização da expressão de um mRNA é feita pela expressão de um ou mais genes normalizadores, os dados de amplificação do mRNA do receptor de androgênios foram normalizados por cada um dos genes candidatos estudados, bem como pelas combinações sugeridas (*B2M* e *YWHAZ*, *SDHA* e *ALAS1* e *SDHA* e *GAPDH*). Os dados mostrados na figura 11 mostram os valores arbitrários da relação AR/normalizador para os grupos controle, transfectado com siRNA para AR (siAR) e transfectado com siRNA inespecífico (siCN - controle negativo), após 24 h da transfecção. Somente quando normalizado por *GAPDH* ou pela combinação *GAPDH* e *SDHA* a expressão se mostrou significativamente diferente entre o grupo controle e siAR e controle e siCN. Porém, em todos as situações, exceto quando normalizado pela expressão de TBP, a expressão gênica do AR foi menor no grupo siAR (silenciado).

Os dados referentes a este capítulo foram submetidos para o *Journal of Molecular Endocrinology* para avaliação e publicação (anexo 2).

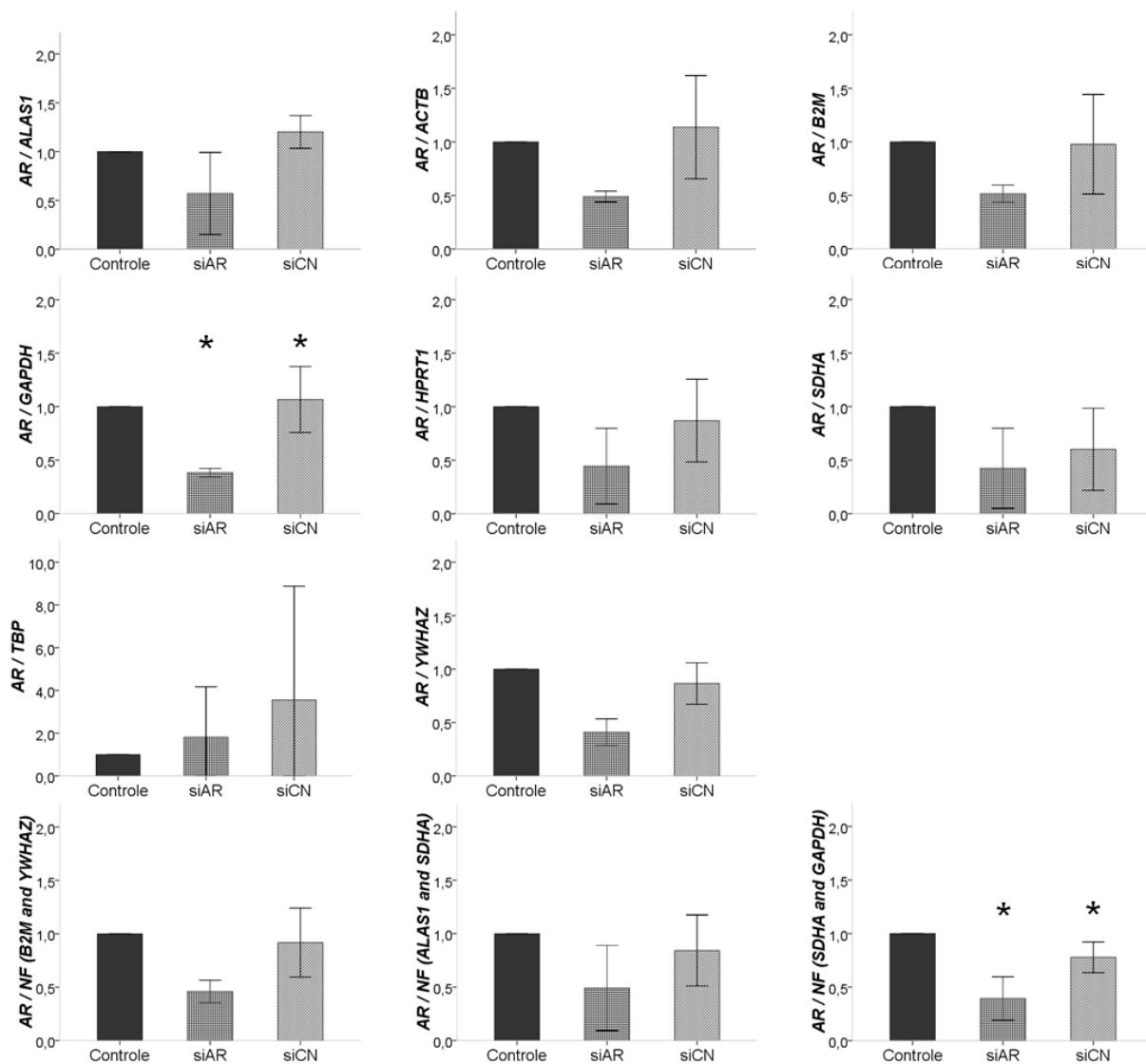


Figura 11. Expressão gênica do AR em cultura primária de células de carcinoma prostático com normalização por oito diferentes genes referência e por fator de normalização obtido a partir da expressão de dois genes (três diferentes combinações). Os resultados são apresentados como média e erro padrão da média nos grupos Controle (sem transfecção), siAR (transfectado com siRNA específico para o receptor de androgênicos) e siCN (controle negativo – transfectado com um siRNA inespecífico). \*Diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de AR entre os grupos controle e siAR e controle e siCN,  $P < 0,05$  (ANOVA de uma via, teste *post hoc* de Duncan). N = 10.

### ***CAPÍTULO 3***

#### ***Silenciamento do receptor de androgênios***

O silenciamento do mRNA do receptor de androgênios foi feito usando um *pool* de siRNAs comercialmente disponível. Foi feita uma curva de silenciamento tanto nas culturas primárias de carcinoma prostático quanto na cultura de células LNCaP. O tempo necessário para o silenciamento do AR foi 48 horas. A figura 12 ilustra a expressão do AR após transfecção com siRNAs em cultura primária de CaP.

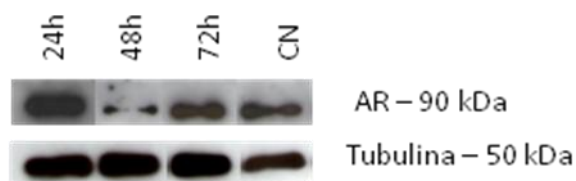


Figura 12. Silenciamento da proteína do AR verificado por WB em cultura primária de carcinoma prostático. Imunoblot das proteínas AR (90 kDa) – painel superior – e tubulina (50 kDa) – painel inferior. Observa-se uma diminuição nos níveis do AR em 48 h após a transfecção com siRNAs específicos.

Foi avaliada também a expressão do mRNA do AR em 24 horas, mostrando uma menor expressão deste mRNA quando comparado ao controle sem transfecção e ao controle negativo, transfectado com siRNA inespecífico (figura 13).

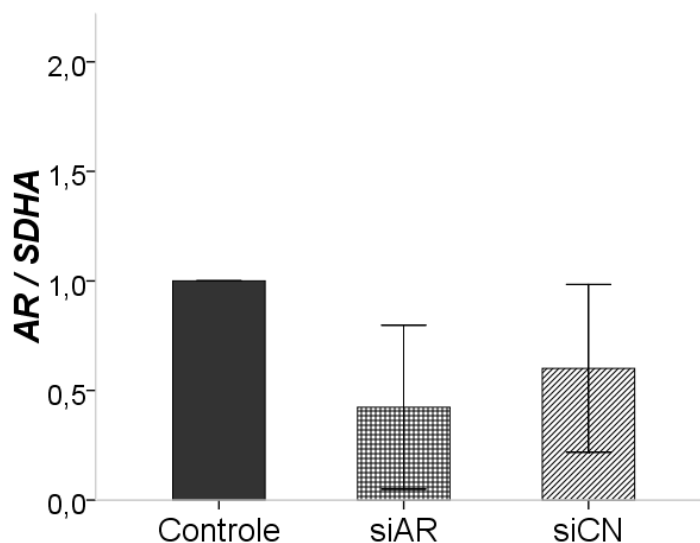


Figura 13. Expressão gênica do *AR* em cultura primária de células de CaP transfectadas com siRNA para o *AR*. A expressão do mRNA do *AR* foi normalizada pela expressão do gene *SDHA*, e expressa em unidades arbitrárias (UA). N=10.

Para verificar se este silenciamento influenciou a atividade das células prostáticas, foi feita a amplificação do mRNA do *PSA*, um gene alvo do *AR*. Em uma amostra de cultura de LNCaP verificou-se uma aparente diminuição da expressão do *PSA* no grupo siAR em relação ao controle, tanto em 12 horas quanto em 24 horas (figura 14A). A amplificação do mRNA do *PSA* nas amostras de cultura primária foi de baixa qualidade, sendo possível verificar os efeitos do silenciamento do *AR* sobre a expressão deste gene somente em uma das culturas primárias. Verificou-se, nesta amostra, também a aparente diminuição da expressão de *PSA* no grupo siAR em 24 h (figura 14B).



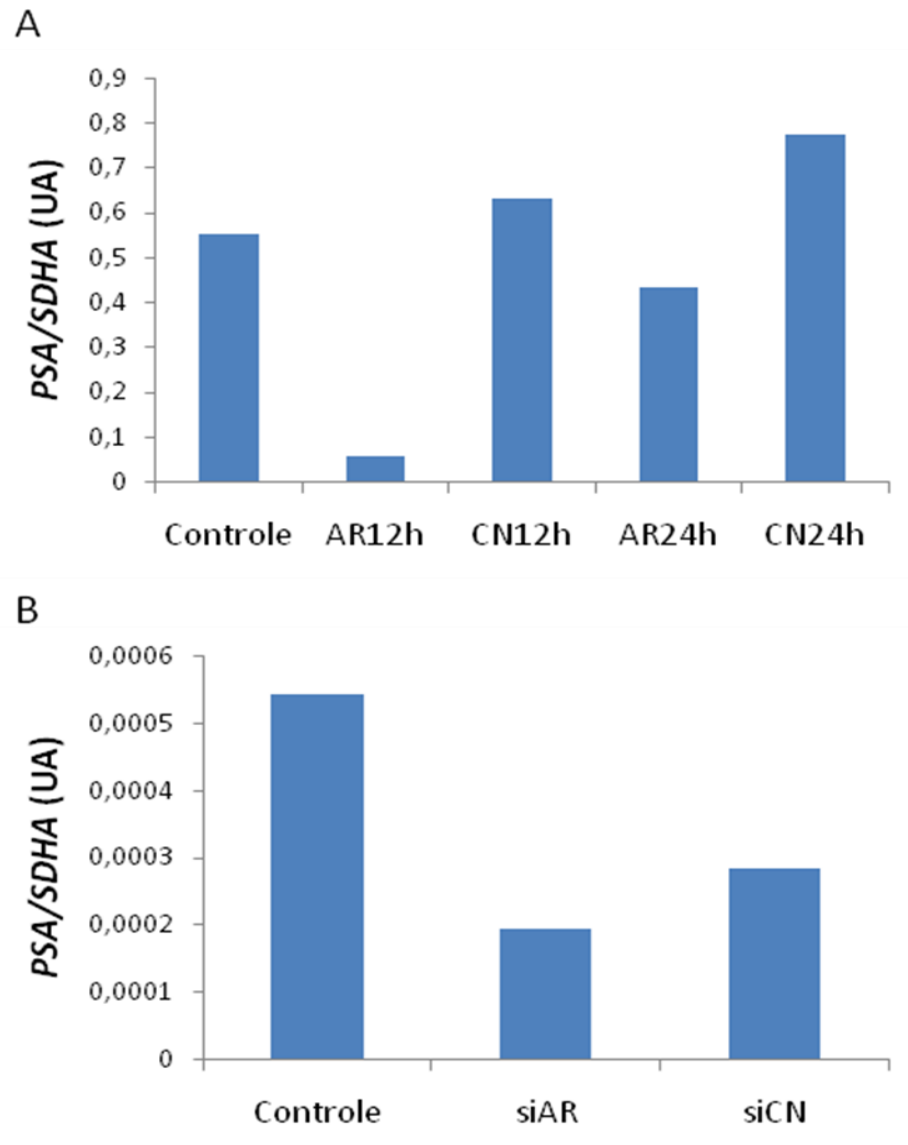


Figura 14. Expressão gênica de *PSA* em células LNCaP (A) e de cultura primária transfectadas com siRNA para o AR (B). A expressão do mRNA do *PSA* foi normalizada pela expressão do gene *SDHA*, e expressa em unidades arbitrárias (UA). Em células LNCaP, foram avaliados os tempos de 12 e 24 horas, na cultura primária, somente o tempo de 24 horas. N=1.

### ***Silenciamento do correpressor do receptor de androgênios NCoR1***

O silenciamento do correpressor do receptor de androgênio *NCoR1* foi feito através da técnica de transfecção com siRNAs específicos para o mRNA do *NCoR1*. Para verificar a eficiência da transfecção, recomenda-se o uso de um marcador fluorescente que, uma vez internalizado pela célula, emite uma fluorescência que pode ser detectada. Foi utilizado o reagente *Block-iT* (Invitrogen), que emite uma fluorescência verde quando presente no núcleo da célula. A figura 15 mostra a emissão de fluorescência pelas células LNCaP transfectadas com siRNAs para o *NCoR1*, indicando que o processo de transfecção ocorreu adequadamente. O mesmo padrão de fluorescência foi visualizado para os grupos transfectados com siRNAs inespecíficos (controle negativo).

O silenciamento de *NCoR1* foi avaliado por Western Blot (figura 16). Foi observado que em 24h, 48h e em 72h os níveis de *NCoR1* pareciam estar diminuídos em relação ao controle sem transfecção e ao controle negativo, porém não foi observada uma ausência total desta proteína.

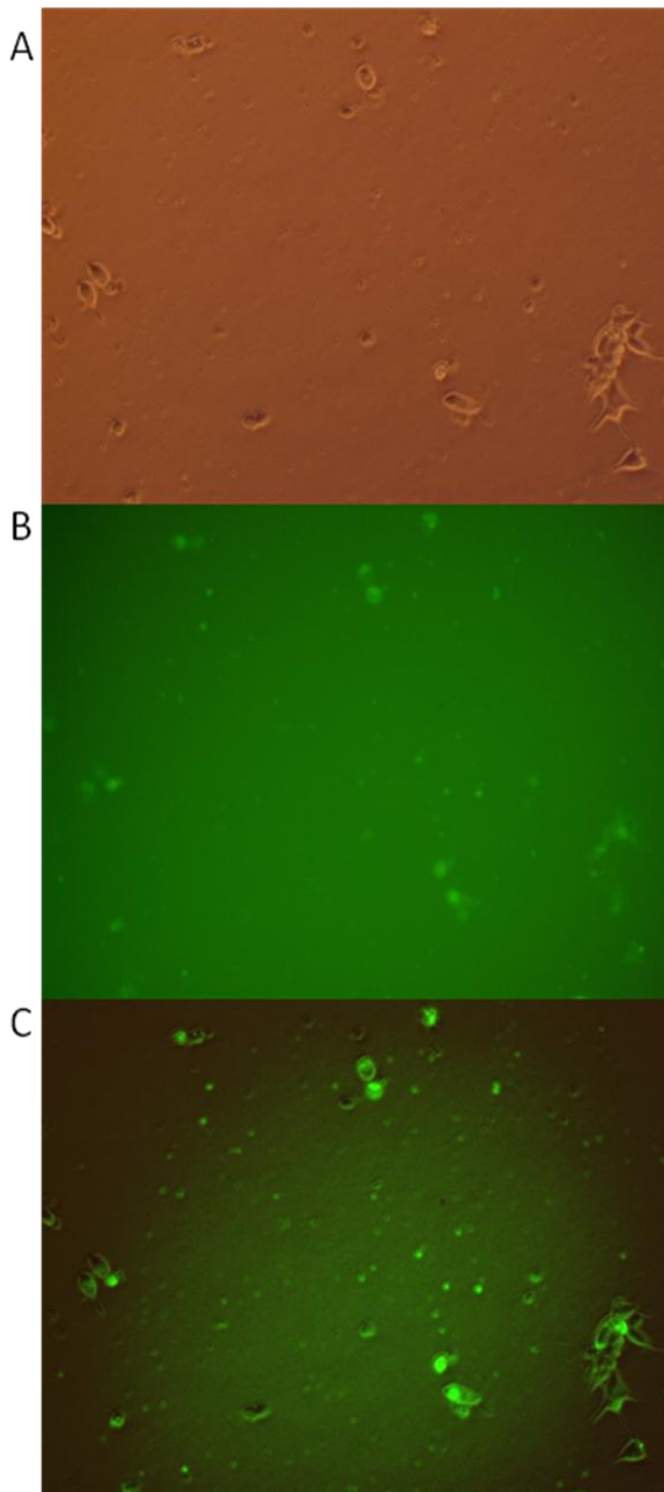


Figura 15. Transfecção de células LNCaP com siRNAs para o *NCoRI*. A. Imagens das células visualizadas em microscópio invertido (aumento: 20X). B. Fluorescência emitida pelo reagente Block-iT quando internalizado pelas células (aumento: 20X; filtro para FITC,  $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$ ). C. Sobreposição das imagens, mostrando que a fluorescência é emitida principalmente a partir do núcleo das células.

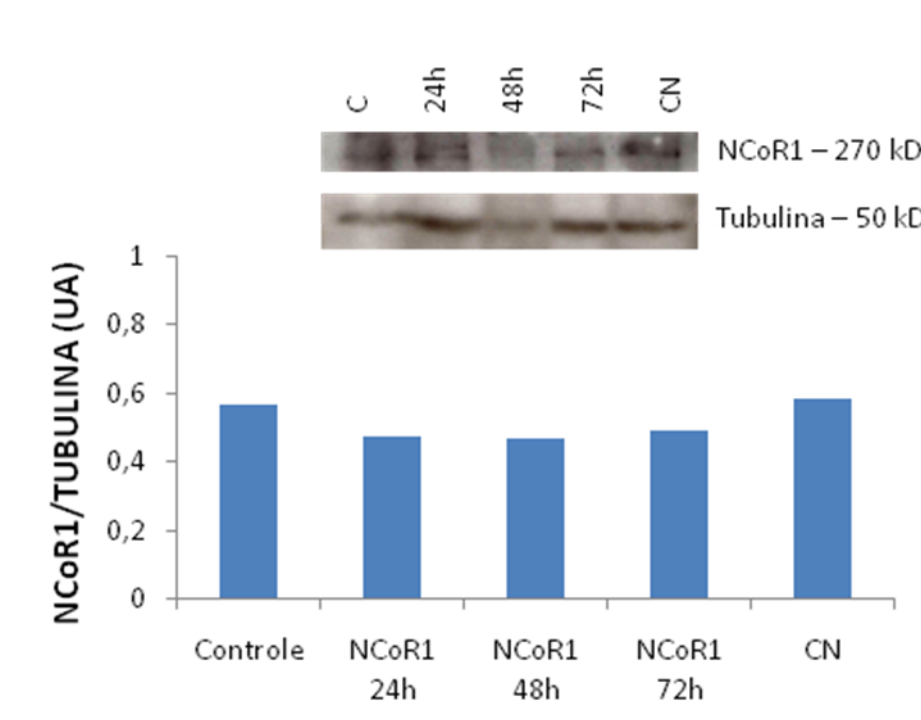


Figura 16. Silenciamento da proteína NCoR1 verificado por WB. Painel superior: imunoblot das proteínas NCoR1 (270 kDa) e tubulina (50 kDa). Gráfico: Representação gráfica da intensidade das bandas de NCoR1 (normalizado pela intensidade das bandas de tubulina) nas condições controle e diferentes tempos de silenciamento. N=1.

### **Efeitos sobre a proliferação de células LNCaP**

Ao avaliar a proliferação das células LNCaP quando submetidas ao silenciamento de *NCoRI*, verificou-se que as células não submetidas ao silenciamento (grupo controle) proliferam mais que as células submetidas ao silenciamento para o *NCoRI* e as células transfectadas com siRNA inespecífico (Teste de Kruskal-Wallis,  $P=0,004$ , e teste de comparações múltiplas,  $P<0,05$ ). Não foi observada diferença entre as doses de tratamento dentro de cada grupo de silenciamento, apesar do subgrupo tratado com DHT  $10^{-13}$ M ter proliferado mais em relação aos demais tratamentos no grupo siCN (figura 17).

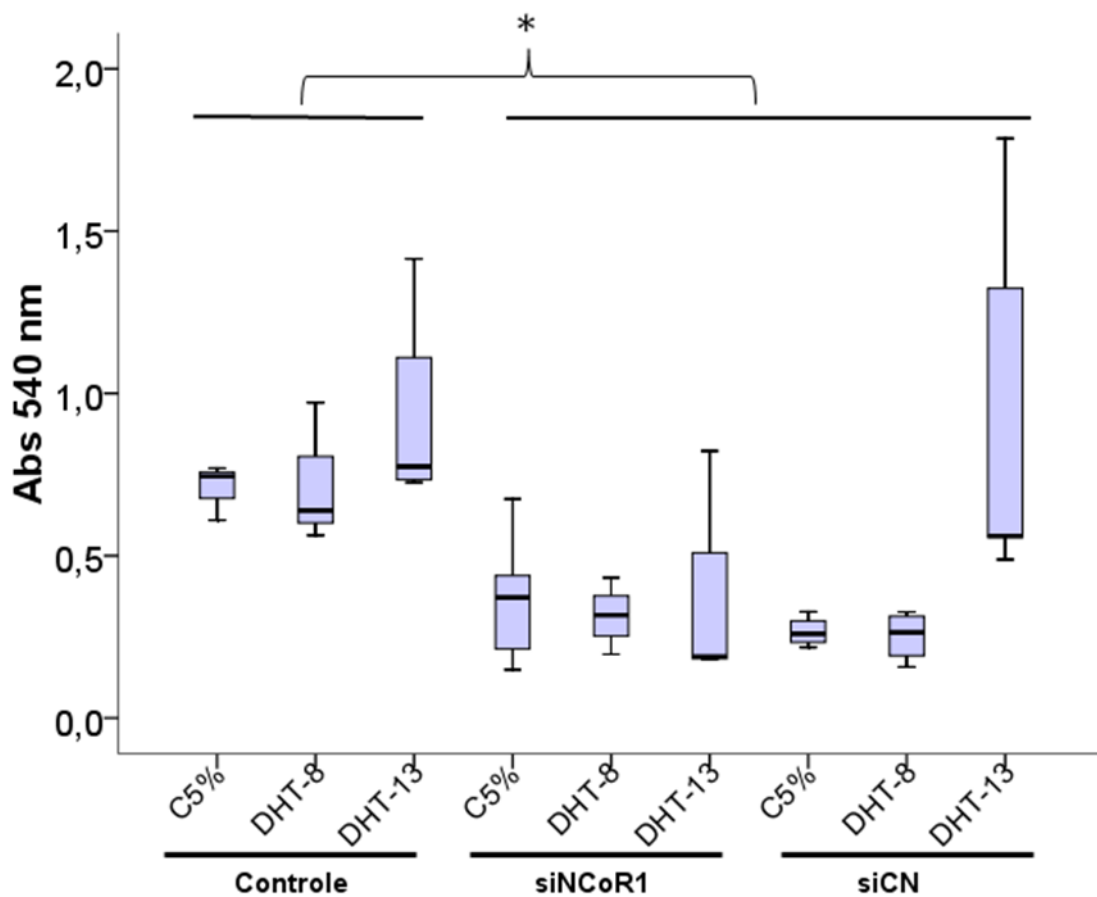


Figura 17. Avaliação da proliferação celular em células LNCaP transfectadas com siRNA para o *NCoR1* e submetidas a tratamento com diferentes doses de androgênios. Medianas e intervalos interquartis dos valores de absorvância a 540 nm. \* $P < 0,05$  (teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparações múltiplas). N = 3-5.

### Efeitos sobre a expressão gênica e secreção de *PSA* pelas células LNCaP

Foi verificada a expressão do gene *PSA* em células LNCaP transfectadas com siRNA para o corregulador *NCoR1* tratadas com diidrotestosterona na concentração de  $10^{-13}$  M. Observou-se um aparente aumento da expressão gênica de *PSA* nas células com silenciamento do *NCoR1* em comparação com os grupos controle (figura 18).

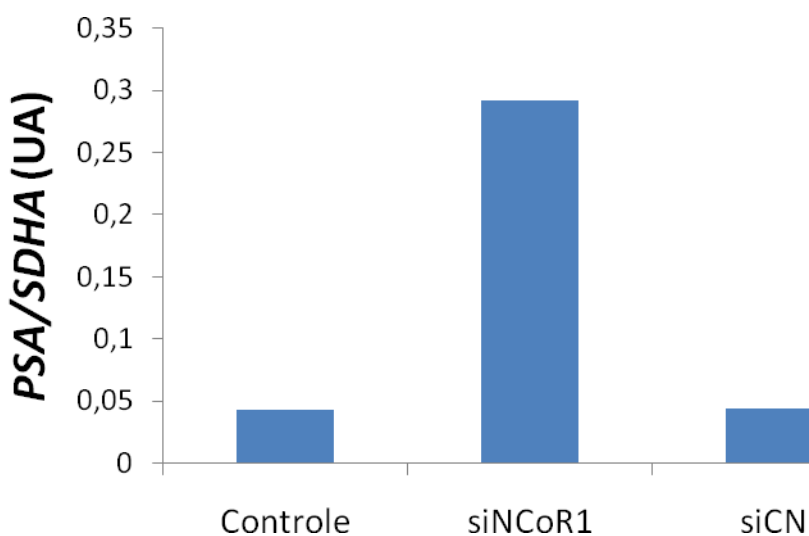


Figura 18. Expressão gênica de *PSA* em células LNCaP transfectadas com siRNA para o *NCoR1* tratadas com diidrotestosterona  $10^{-13}$  M. A expressão do mRNA do *PSA* foi normalizada pela expressão do gene *SDHA*, e expressa em unidades arbitrárias (UA). N=1.

A secreção de PSA pelas células LNCaP foi avaliada pela dosagem desta proteína no sobrenadante das culturas. A figura 19 mostra as medianas e intervalos interquartis do delta da dosagem de PSA do sobrenadante das células LNCaP (diferenças entre os valores 24 horas após o silenciamento para o *NCoR1* e os valores iniciais). Foi observado um aumento da quantidade de PSA no sobrenadante das células LNCaP do grupo controle (sem transfecção) em relação aos grupos transfectados (tanto com siRNA específico para o *NCoR1* quanto o controle inespecífico) (teste de Kruskal-Wallis,  $P=0,002$ , seguido de teste de comparações múltiplas,  $P<0,05$ ). Não foi observada diferença entre os grupos siNCoR1 e siCN.



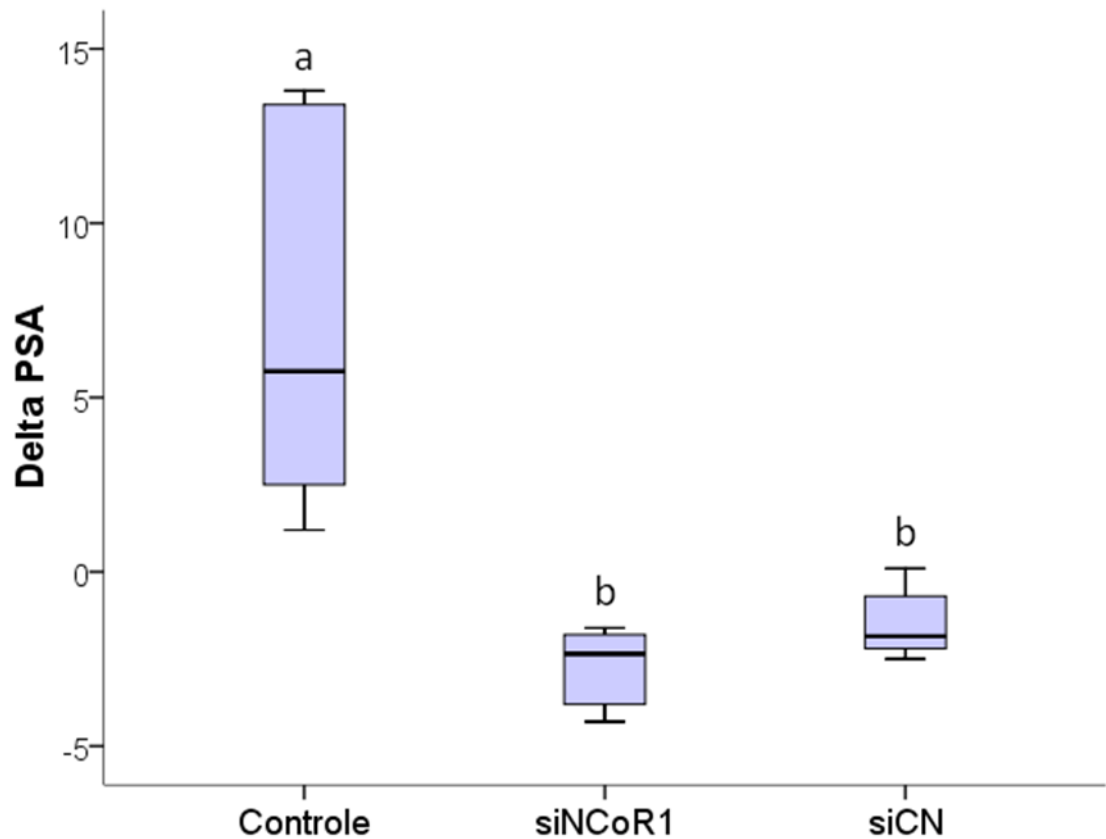


Figura 19. Dosagem de PSA no sobrenadante das células LNCaP em cultivo silenciadas para o *NCoR1*. Medianas e intervalos interquartis da diferença entre os valores finais (24 horas após silenciamento de *NCoR1*) e iniciais de PSA. a, diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos siNCoR1 e siCN (b), Teste de Kruskal-Wallis,  $P=0,002$ , seguido de teste de comparações múltiplas,  $P<0,05$ .  $N=6$  observações por grupo. Unidade: ng/mL.

## DISCUSSÃO

O aumento da incidência do câncer de próstata, sobretudo nos países ocidentais, onde o estilo de vida é baseado em dietas com alta ingestão de gordura, carne e derivados do leite, considerados como fatores de risco para progressão do câncer (Gronberg 2003), tem motivado a realização de pesquisas acerca dos mecanismos de desenvolvimento e progressão desta doença. O receptor de androgênios tem um papel central no estabelecimento e na progressão do CaP, e a terapia de deprivação androgênica, seja por supressão da produção testicular de androgênios (por remoção cirúrgica ou administração de agonistas do GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas) ou por tratamento com antagonistas do AR (flutamida ou bicalutamida) ainda é o principal tratamento (Hodgson *et al.* 2007). Porém, o crescimento tumoral, que em um primeiro momento regride, pode ser retomado e o tumor torna-se então independente de androgênios, sendo dito refratário à deprivação hormonal, principalmente nos casos de carcinoma metastático. Diversos mecanismos podem estar envolvidos na transição da dependência para a independência androgênica, incluindo amplificação, superexpressão ou mutação do gene do AR, atividade anormal dos correguladores e, ainda, vias independentes do AR (Suzuki *et al.* 2007; Schulman *et al.* 2010). Mecanismos envolvendo superexpressão do AR podem levar à hipersensibilidade deste receptor, que, associada a níveis baixos circulantes de androgênios produzidos pelas glândulas suprarrenais,

podem ser fatores envolvidos na progressão da dependência para a independência androgênica.

Estudos envolvendo o silenciamento da via de sinalização do AR podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos do crescimento tumoral refratário à terapia de ablação hormonal e auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Para isso, é importante o conhecimento da fisiologia dos tumores prostáticos e uma maneira bastante eficiente de obter informações a esse respeito é por meio do cultivo de células de carcinomas prostáticos. O modelo mais utilizado para estudo de células tumorais prostáticas é o cultivo de linhagens celulares. A linhagem celular de câncer de próstata LNCaP (carcinoma prostático metastático de linfonodo) constitui um bom modelo experimental para avaliar a ação androgênica sobre as células de carcinoma prostático. A linhagem LNCaP expressa o receptor de androgênios e assim mostra uma resposta transcricional robusta e reprodutível ao tratamento com androgênios (Bebermeier *et al.* 2006). Além disso, permite o estabelecimento de um modelo de células independentes da ação androgênica, com o uso de suplemento livre de hormônios esteroides cronicamente, simulando o câncer de próstata recorrente (D'Antonio *et al.* 2008). Porém, por mais bem estabelecidos que sejam estes modelos, a análise das culturas primárias de câncer prostático pode fornecer dados mais representativos da variabilidade tumoral sobre o padrão de expressão e resposta a tratamentos de cânceres primários ou recorrentes. O silenciamento de corretores do AR em culturas primárias, comparativamente às linhagens celulares, pode confirmar o papel dos mesmos no estabelecimento e progressão do câncer prostático, contribuindo para o desenvolvimento de terapias mais eficientes para tratamento destes tumores.

Pela variabilidade inerente entre os indivíduos, o cultivo celular nem sempre atinge o sucesso esperado para este tipo de estudo. Isto pode ser visualizado pelo alto índice de não adesão e proliferação das células submetidas ao cultivo (mais de um terço do total de amostras, 35,4%) (figura 4). Ainda, por se tratar de uma amostra restrita em tamanho, existe o obstáculo do número total de células que pode ser obtido do fragmento tumoral, o que restringe os grupos experimentais do estudo. Apesar destas dificuldades, as culturas que obtiveram êxito puderam ser utilizadas para o estabelecimento da técnica de cultura primária de câncer prostático, a partir do cultivo de pequenos fragmentos do tumor amostrado. O diagnóstico de adenocarcinoma prostático foi confirmado por exame anatomopatológico, assegurando a malignidade do tecido amostrado. Porém, o diagnóstico de câncer prostático é feito com base na combinação de características arquiteturais do tecido (Kumaresan *et al.* 2010; Wong & Bushman 2010), as quais são perdidas quando as células são colocadas em cultivo. Deste modo, para confirmar se as células que partiam do fragmento de tecido e aderiam nas placas eram células epiteliais malignas, foram realizadas análises imunocitoquímicas para marcadores de células epiteliais (citoqueratinas de alto peso molecular, 1, 5, 10 e 14) e malignas de próstata (enzima  $\alpha$ -metilacil-coenzima A racemase - AMACR). Os resultados foram positivos para ambos os marcadores (figura 5), confirmando o cultivo de células epiteliais prostáticas malignas, permitindo o estabelecimento da cultura primária de carcinoma prostático a partir de *explants*. O uso da racemase como marcador de malignidade de células prostáticas foi inicialmente indicado com cautela, uma vez que aproximadamente 18% de cânceres diagnosticados por exame anatomopatológico são negativos para a racemase (Zhou *et al.* 2004), e algumas variantes de adenocarcinoma apresentam uma marcação positiva fraca para esta enzima (Epstein 2004). No entanto, um

estudo recente observou uma superexpressão da racemase nos tumores quando em comparação com o tecido adjacente em 94,7% dos casos analisados (Tischler *et al.* 2010). Adicionalmente, o valor diagnóstico da AMACR é reconhecido quando utilizado em combinação com exame anatomopatológico (por coloração hematoxilina-eosina simples) e marcadores adicionais, como marcadores de células basais (citoqueratinas de alto peso molecular – *high molecular weight cytokeratin*, HMWCK 34bE12) e ácido graxo sintase (*fatty acid synthase*, FASN) (Kumaresan *et al.* 2010; Tischler *et al.* 2010).

Apesar do aumento crescente das pesquisas acerca dos mecanismos de desenvolvimento e progressão do câncer prostático, ainda não existe um perfil de expressão de marcadores diagnósticos e prognósticos bem estabelecido para esta doença. Inúmeros estudos têm avaliado a expressão gênica de um ou mais genes que podem estar envolvidos na tumorigênese prostática. O estabelecimento de um perfil de expressão gênica para o câncer de próstata contribuirá para o prognóstico do paciente, estratificação dos tumores, classificação da significância clínica do CaP, desenvolvimento de ferramentas para detecção precoce e identificação de alvos terapêuticos (Luo *et al.* 2002). Para estes estudos, a quantificação relativa é uma estratégia frequentemente utilizada para avaliar os dados obtidos a partir da amplificação de mRNAs específicos pela reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR) (Ohl *et al.* 2005). Para isso, o mRNA do gene alvo amplificado é normalizado pela amplificação de um gene constitutivo ou normalizador, que deve apresentar estabilidade, expressão não regulada nas amostras estudadas, não apresentar variação sob condições de tratamento experimental e ter níveis semelhantes ao gene alvo (Bustin 2002). Apesar do grande número de estudos para encontrar genes de

referência mais estáveis comparando diversos tipos de tecidos e condições experimentais, o consenso atual é de que não existe um único gene normalizador universal (Huggett *et al.* 2005). Por ter estabelecido um novo modelo experimental, diferente dos até então estudados, decidiu-se avaliar qual o gene normalizador mais adequado para estudos de expressão gênica em amostras de células prostáticas tumorais em cultivo primário.

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para identificar a estabilidade de expressão de um gene e indicar qual o gene de referência mais adequado sob diferentes condições experimentais e usando diferentes tipos celulares, como os softwares *geNorm* e *NormFinder* (Vandesompele *et al.* 2002; Andersen *et al.* 2004; Pfaffl *et al.* 2004; de Jonge *et al.* 2007). Porém, como estas estratégias são baseadas em diferentes algoritmos e processos analíticos, cada software produz uma classificação diferente da estabilidade dos genes de referência (Tong *et al.* 2009). Apesar da recomendação para o uso de somente uma das ferramentas disponíveis para a busca de genes normalizadores (Wan *et al.* 2011), optou-se por utilizar os softwares *geNorm* e *NormFinder* para analisar os dados de expressão gênica de células de carcinoma prostático.

O *geNorm* fornece um ranking dos genes testados baseado no valor de estabilidade (valor  $M$ ) calculado para cada gene. Uma variação na razão de expressão de dois *housekeeping genes* verdadeiros reflete o fato de que um, ou ambos, os genes não são constitutivamente expressos (o aumento na variação da razão corresponde a uma redução da estabilidade de expressão). O *geNorm* fornece um ranking dos genes testados baseado no valor de estabilidade (valor  $M$ ) calculado para cada gene de acordo com o princípio de que a razão de expressão entre dois genes normalizadores ideais é a mesma em todas as amostras,

não levando em consideração as condições experimentais ou o tipo celular. O valor  $M$ , dessa maneira, representa o valor de estabilidade da média de expressão de um determinado gene em comparação com os demais genes analisados nas amostras em questão e deve ser menor do que 1,5 (Vandesompele *et al.* 2002). O *software* permite a exclusão sucessiva dos genes que apresentarem maior valor  $M$ , seguida sempre de novo cálculo deste valor para cada gene considerando apenas os genes restantes de modo que, ao final deste processo, este método apresenta a combinação de dois genes candidatos com valores de expressão similares como sendo os mais adequados para uso como normalizadores, indicando um fator de normalização que pode ser utilizado diretamente para normalizar os valores obtidos na amplificação do gene de interesse (fator de normalização), o qual é calculado a partir da média geométrica da expressão dos genes em estudo (Vandesompele *et al.* 2002).

Enquanto que o *geNorm* analisa todas as amostras em conjunto, sem discriminação entre amostras controle e amostras submetidas a tratamento experimental, o algoritmo *NormFinder* examina a estabilidade de expressão de cada gene independentemente dos demais analisados. A aplicação do *NormFinder* estima a variação total na expressão gênica, levando em conta a possível variação ao longo de subgrupos amostrais, e classifica como genes mais estáveis aqueles com variação intra e intergrupo mínima (Andersen *et al.* 2004). Esta é a principal diferença entre *geNorm* e *NormFinder*, uma vez que este permite a divisão em subgrupos de acordo com os tratamentos experimentais a que as amostras foram submetidas e calcula a variabilidade de um gene levando em conta esse fator.

De acordo com Andersen e colaboradores, as discrepâncias nos resultados destas duas estratégias são devidas às diferenças entre as abordagens analíticas (Andersen *et al.* 2004). De

fato, no presente estudo encontraram-se resultados diferentes a respeito do gene normalizador indicado como mais estável por cada um dos algoritmos. *geNorm* indicou *B2M* e *YWHAZ* como a melhor combinação de genes mais estáveis para normalização em amostras de cultura primária de células de carcinoma prostático transfetadas ou não com siRNAs, enquanto *NormFinder* indicou *SDHA* como gene mais estável (figura 6 e tabela 5). Contudo, analisando as amostras subdivididas em grupos (controle ou transfetado), o *geNorm* indicou *SDHA* e *ALAS1* como a melhor combinação entre dois genes para ambos os grupos (figura 7). Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que o *geNorm* tende a selecionar os genes com o maior grau de similaridade do perfil de expressão ao longo de todo o grupo amostral, sendo que os genes com variação de expressão mínima não são necessariamente os classificados no topo da lista (Andersen *et al.* 2004). Este resultado também sugere que *B2M* e *YWHAZ* podem mudar sua expressão em resposta às condições experimentais (neste caso, a transfecção), não sendo, desta forma, a melhor escolha para normalizar frações de mRNA alvo nesta condição. Como o *NormFinder* considera as variações inter e intragrupo para fazer a classificação dos genes mais estáveis, o gene *SDHA*, indicado por este algoritmo, parece ser a melhor escolha para a normalização dos níveis de mRNA amplificado por RT-PCR em tempo real em cultura primária de células de carcinoma prostático, uma vez que este modelo avalia a influência de um determinado tratamento sobre a expressão de genes alvo, gerando subgrupos amostrais que devem ser levados em consideração.

O algoritmo *geNorm* também indica o número ótimo de genes de referência para gerar um fator de normalização (FN) adequado para a normalização. A variação pareada de *geNorm* indicou três genes como o número ótimo para normalização (figura 7). Apesar da



recomendação de utilizar mais de um gene de referência para uma normalização acurada tanto em espécies animais quanto vegetais (Vandesompele *et al.* 2002; Lisowski *et al.* 2008; Tong *et al.* 2009), isto nem sempre é praticável quando poucos genes alvo estão sendo estudados ou quando existe pouca quantidade de RNA disponível (Andersen *et al.* 2004; Huggett *et al.* 2005). Culturas celulares feitas a partir de uma quantidade limitada de tecido ou a partir de biópsias são exemplos destas situações. Andersen e colaboradores demonstraram que a normalização não é necessariamente melhorada quando se usa um fator de normalização a partir de dois ou mais genes. O uso do FN é recomendado somente quando os genes de referência em análise mostram uma variação significativa. Nestes casos, os genes com variação intergrupo em direções opostas devem ser os selecionados para a normalização (Andersen *et al.* 2004).

Para avaliar o impacto do uso de um ou dois genes de referência no presente modelo, foi realizada a amplificação do mRNA do receptor de androgênios, o alvo do silenciamento nestas culturas celulares. Como esperado, houve uma diminuição do mRNA do AR no grupo transfectado com siRNA contra o mesmo, em relação ao grupo controle não transfectado e ao grupo transfectado com siRNA inespecífico (controle negativo). Porém, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e transfectado somente com a normalização pelo gene *SDHA* ou pela combinação de *SDHA* e *GAPDH* (figura 10).

Alguns estudos realizaram a avaliação do gene normalizador mais adequado para uso em amostras de tecido prostático, porém nenhum deles avaliou culturas primárias de carcinoma prostático (Radonic *et al.* 2004; de Kok *et al.* 2005; Ohl *et al.* 2005; Mogal & Abdulkadir 2006). Além disso, muitos estudos que avaliaram o perfil de expressão gênica em

amostras de câncer de próstata usaram somente um gene para normalizar a expressão dos genes alvo (*ACTB*, *BMG*, *GAPDH*, *HPRT1*, *TBP*, *18S* entre outros), sem uma avaliação prévia de sua estabilidade (Taplin *et al.* 1995; Luo *et al.* 2002; Brum *et al.* 2003; Stephan *et al.* 2004; Kinoshita *et al.* 2005; Ohl *et al.* 2005; Valenti *et al.* 2006; Jariwala *et al.* 2007; Rosner *et al.* 2007; Mink *et al.* 2010). Os estudos realizados para identificar controles endógenos adequados para amostras prostáticas usaram diferentes tipos de amostras, como cDNA disponível comercialmente (Radonic *et al.* 2004), tecido normal, tecido hiperplásico e tecido tumoral prostático (de Kok *et al.* 2005), tecido maligno e não maligno emparelhados (Ohl *et al.* 2005), e células LNCaP (Mogal & Abdulkadir 2006). Estes estudos encontraram, portanto, resultados distintos: *RNA Polimerase II* (Radonic *et al.* 2004), *HPRT1* (de Kok *et al.* 2005), *HPRT1* sozinho ou a combinação de *HPRT1* e *ALAS1*, ou *HPRT1*, *ALAS1* e *K-ALPHA-1* (Ohl *et al.* 2005), e *ribosomal highly-basic 23-kDa protein*, *RPL13A* (Mogal & Abdulkadir 2006).

O presente estudo encontrou *SDHA* e *ALAS1* ou *B2M* e *YWHAZ* como a combinação mais apropriada de dois genes para o propósito de normalização neste modelo experimental usando o *geNorm*. *NormFinder* indicou *SDHA* sozinho ou em combinação com *GAPDH*. A expressão relativa do AR mostrou-se diminuída no grupo siAR, como esperado, porém com significância estatística somente quando normalizado por *GAPDH* ou pela combinação *SDHA* e *GAPDH*. O uso de *GAPDH* como gene de referência não é recomendado por esta enzima estar envolvida em uma via direta do metabolismo de carboidratos, o qual pode estar alterado em alguns cânceres (Blanquicett *et al.* 2002; Unwin *et al.* 2003). Adicionalmente, o gene *GAPDH* não apresentou os melhores parâmetros de estabilidade de expressão neste modelo.

Assim, sugere-se o uso de *SDHA* sozinho ou em combinação com *ALAS1* para normalizar frações de mRNA amplificadas em estudos de expressão gênica de cultura primária de células de carcinoma prostático submetidas a experimentos de transfecção com siRNAs. Ainda, recomenda-se que uma avaliação preliminar da estabilidade de expressão de vários candidatos a controle endógeno seja feita antes de iniciar um estudo de perfil de expressão gênica a fim de evitar uma normalização imprecisa e gastos desnecessários.

Apesar de não existir um perfil de expressão gênica bem definido no câncer prostático, sabe-se que o receptor de androgênios tem um papel fundamental tanto no desenvolvimento e crescimento normal da próstata quanto no desenvolvimento das doenças prostáticas. A expressão de AR no estroma, mas não no epitélio, é essencial para o desenvolvimento prostático, que ocorre a partir de fatores de crescimento secretados pelas células estromais (Agoulnik & Weigel 2006; Cano *et al.* 2007). Porém, o desenvolvimento completo, a diferenciação e a função secretora do epitélio prostático dependem da expressão do AR em ambos os compartimentos. Desse modo, as funções normais da glândula prostática são dependentes da influência dos androgênios em ambos os compartimentos, e alterações nas vias de sinalização reguladas por androgênios podem afetar o desenvolvimento e a progressão do câncer de próstata (Cano *et al.* 2007). A dependência androgênica também é observada no câncer prostático, e sua descoberta abriu caminho para a terapia de ablação androgênica, descrita por Huggins e Hodges em 1941 (Huggins & Hodges 1941). Ainda que inicialmente responsivos à deprivação androgênica, muitos tumores tornam-se resistentes a esta terapia e são necessárias outras estratégias de contenção do crescimento tumoral (Agoulnik & Weigel 2006). Embora os mecanismos moleculares responsáveis pela independência androgênica do

CaP não estejam bem entendidos, diversos estudos evidenciam a presença e atividade do AR nestes tumores. Já foram descritos superexpressão, mutação e amplificação do AR, e que este pode ainda ser ativado por vias independentes de androgênios, como por citocinas, fatores de crescimento peptídicos, neuropeptídeos, hormônios esteroides não androgênicos e outros agentes tróficos. Todos estes mecanismos podem atuar regulando a expressão e/ou a atividade do AR por meio de sinalizações intracelulares e contribuir para a manutenção das células tumorais na ausência dos androgênios (revisado em (Koochekpour 2010)). A descoberta do silenciamento mediado por RNAs dupla-fita como um processo bastante eficiente para bloquear a expressão de um gene específico permitiu a realização de diversos estudos sobre os efeitos do silenciamento do AR sobre o crescimento e manutenção do câncer de próstata. O bloqueio do receptor de androgênios na linhagem LNCaP reduziu a proliferação celular e aumentou a taxa de apoptose (Liao *et al.* 2005; Yang *et al.* 2005). Também foi observada a diminuição da expressão de *PSA*, um gene alvo do AR, indicando a ausência de atividade transcricional (Compagno *et al.* 2007). O presente estudo inicialmente avaliou a expressão do AR em células de cultura primária de CaP, observando o silenciamento do mRNA em 24 horas (figura 10) e o silenciamento da proteína em 48 horas (figura 11). Porém, devido a pouca quantidade de RNA disponível, por se tratar de um número restrito de células, a quantidade de cDNA também era limitada. Após os experimentos de identificação do melhor gene normalizador a ser utilizado e a amplificação do mRNA do AR para identificação do silenciamento, a quantidade de cDNA disponível para amplificação do mRNA do *PSA* foi muito restrita, e só foi possível amplificá-lo em amostras de uma cultura. Apesar disto, observamos a resposta esperada de diminuição da expressão de *PSA* nas células transfectadas com siRNA para o AR, confirmando a diminuição da atividade transcricional deste receptor.

O mesmo foi observado em células LNCaP transfectadas com siRNA para o AR, porém a diminuição dos níveis do mRNA de *PSA* foi observada já em 12 horas de transfecção (figura 11).

O receptor de androgênios ligado à diidrotestosterona atua como um fator de transcrição, e, para montar um complexo transcricional ativo, depende da interação com múltiplas proteínas regulatórias, as quais podem aumentar sua atividade transcricional (coativadores) ou diminuí-la (correpressores) (Urbanucci *et al.* 2008; Heemers *et al.* 2009). Cerca de 170 corre reguladores do AR já foram descritos, sendo que alguns destes têm sido sugeridos como alvos em potencial para intervenções terapêuticas no CaP, uma vez que são expressos do forma aberrante durante a progressão do câncer, sendo que sua expressão frequentemente está correlacionada com um pior prognóstico (Heemers *et al.* 2009; Koochekpour 2010). Além disso, mudanças na expressão de corre reguladores parecem contribuir substancialmente para a atividade do AR em tumores resistentes à castração (Heemers *et al.* 2009).

Cheng e colaboradores demonstraram que o NCoR interage diretamente com o AR e reprime a atividade transcricional mediada pela diidrotestosterona (Cheng *et al.* 2002). Além disso, a função de antagonista do receptor de androgênios de certas drogas é mediada pelo recrutamento de correpressores do AR, como NCoR e SMRT (Baniahmad 2005). O silenciamento de NCoR e SMRT mediado por RNAi aumenta a expressão de genes estimulada por diidrotestosterona e diminui a atividade antagonista do AR da flutamida em células LNCaP (Yoon & Wong 2006). A depleção destes mesmos correpressores aumenta a expressão de *PSA* estimulada por DHT, também em células LNCaP, porém não é suficiente

para tornar o antagonista bicalutamida em agonista do AR, indicando que a resistência a drogas antiandrogênicas como a bicalutamida não se dá pela perda dos correpressores, e sim o aumento do recrutamento de coativadores (Hodgson *et al.* 2007). Um aumento de expressão do NCoR foi capaz de transformar antiandrogênios parciais, como o RU486 e o acetato de ciproterona, em antagonistas completos do AR. No mesmo estudo, a atividade transcricional do AR induzida pelo androgênio sintético R1881 também foi reduzida com a superexpressão de NCoR. Também se observou que os níveis proteicos do AR não se modificam com o aumento da expressão de NCoR, confirmando que as mudanças transcricionais não se devem à diminuição dos níveis do receptor de androgênios (Berrevoets *et al.* 2004).

No presente estudo, observou-se uma diminuição da proliferação celular de células LNCaP quando transfectadas com siRNAs, tanto específicos para o NCoR1 quanto inespecíficos (controle negativo) (figura 15). Porém, não houve diferença entre os dois grupos transfectados, indicando que a diminuição da proliferação pode ser um resultado direto do procedimento de transfecção, o qual representa um estresse para as células, e que não está diretamente envolvido com a diminuição dos níveis do correpressor NCoR1. As células do grupo siCN tratadas com diidrotestosterona  $10^{-13}$  M mostraram uma resposta muito semelhante ao grupo controle tratado com a mesma concentração, indicando que talvez as células pudessem retomar as condições normais de proliferação caso fosse dado um período maior de tempo. As alterações de proliferação nos grupos transfectados com siRNAs, tanto específicos como inespecíficos, também podem refletir um efeito de silenciamento de outros mRNA alvos, os chamados *off-targets*. Embora os siRNAs inicialmente tenham sido considerados ativos somente contra mRNAs maduros presentes no citoplasma, alguns estudos

mostraram que eles também podem estar presentes no núcleo, indicando que sequências de pré-mRNAs contendo introns e outras regiões não transcritas também podem ser alvo do silenciamento induzido por estas sequências de RNA, sendo que este silenciamento pode ser extenso e significativo (Seinen *et al.* 2011). Assim, as alterações de proliferação podem ser devidas também ao um efeito de silenciamento de outros genes envolvidos no processo de replicação celular.

Ao avaliar a expressão de *PSA* em células LNCaP submetidas ao silenciamento do NCoR1, observou-se um aumento da expressão deste gene em resposta ao tratamento com diidrotestosterona na concentração  $10^{-13}$  M, o que vai ao encontro dos dados descritos em estudos prévios, citados acima, em que a diminuição dos níveis de NCoR é capaz de aumentar a atividade do AR. Analisando a secreção do PSA no sobrenadante das células em cultivo, observou-se que há uma diminuição da secreção de PSA pelas células submetidas à transfecção. Esta resposta foi semelhante à do experimento de proliferação celular, e pode indicar que estas células simplesmente diminuem a secreção como uma resposta da célula ao estresse da transfecção. Um aumento no tempo de avaliação pode talvez mostrar se realmente o aumento dos níveis de mRNA do *PSA* reflete, a mais longo prazo, um aumento da secreção desta proteína.

## CONCLUSÕES

Este trabalho propôs o estabelecimento de um novo modelo experimental para o estudo da fisiologia de células tumorais prostáticas, a partir de pequenos fragmentos de tumor excisionados da glândula prostática (*explants*). Neste estudo, concluiu-se que o modelo de cultura primária de carcinoma prostático a partir de *explants* é viável, apesar de apresentar grande variação em relação à adesão e proliferação das células a partir dos fragmentos.

Para estudos de expressão gênica em cultura primária de carcinoma prostático, identificamos o gene *SDHA*, ou a combinação dos genes *SDHA* e *ALAS1* como os mais indicados para a normalização das frações de mRNA amplificadas por RT-PCR em tempo real.

A estratégia de silenciamento gênico com o uso de siRNAs mostrou-se adequada para o silenciamento do AR em cultura primária de câncer de próstata, bem como em uma linhagem celular de CaP, a LNCaP, nas quais se observou a diminuição da expressão de *PSA* no grupo transfectado com siRNA específico para o AR. A mesma estratégia de silenciamento foi utilizada para o NCoR1, sendo possível observar uma diminuição da proliferação celular em resposta à transfecção, mas aparentemente, não relacionada à ausência deste corressor do AR, e sim, ao estresse sofrido pelas células. Observou-se um aumento da expressão do gene do *PSA*, porém não da sua secreção por células LNCaP em cultivo, o que demonstra que



o silenciamento do correpressor NCoR1 pode aumentar a atividade transcricional do receptor de androgênios.

## PERSPECTIVAS

Os dados obtidos no presente estudo precisam ser reproduzidos em mais alguns experimentos, além da necessidade de verificar os dados referentes ao silenciamento do NCoR1 nas culturas primárias de CaP. Além disso, pretende-se avaliar o efeito do silenciamento do FHL2, um coativador específico do AR, tanto em células LNCaP, para confirmar dados existentes na literatura que demonstram o papel deste corregulador na proliferação destas células (Heemers *et al.* 2007), como nas culturas primárias, para verificar a importância clínica do bloqueio da expressão deste coativador na fisiopatologia do câncer prostático. Os siRNAs específicos para o FHL2 já estão disponíveis no laboratório.

Também pretendemos avaliar o papel de NCoR e FHL2 em câncer prostático primário *versus* câncer recorrente, além de avaliar a expressão de marcadores putativos em ambos os tumores na tentativa de identificar um perfil de expressão gênica que possa ser útil como marcador diagnóstico ou prognóstico de pacientes com tumores malignos da glândula prostática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agoulnik IU and Weigel NL. 2006. Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer. *J Cell Biochem* **99**(2) 362-72.
- Andersen CL, Jensen JL and Orntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**(15) 5245-50.
- Baniahmad A. 2005. Nuclear hormone receptor co-repressors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**(2-5) 89-97.
- Bebermeier JH, Brooks JD, DePrimo SE, Werner R, Deppe U, Demeter J, Hiort O and Holterhus PM. 2006. Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription. *J Mol Med* **84**(11) 919-31.
- Berrevoets CA, Umar A, Trapman J and Brinkmann AO. 2004. Differential modulation of androgen receptor transcriptional activity by the nuclear receptor co-repressor (N-CoR). *Biochem J* **379**(Pt 3) 731-8.
- Blanquicett C, Johnson MR, Heslin M and Diasio RB. 2002. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies. *Anal Biochem* **303**(2) 209-14.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** 248-54.
- Brum IS, Morsch DM, Pozzobon A, Boeri VA, Geib G and Spritzer PM. 2003. Androgen-dependent expression of c-jun and c-fos in human non-transformed epithelial prostatic cells: association with cell proliferation. *Horm Res* **60**(5) 209-14.
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**(2) 169-93.

- Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* **29**(1) 23-39.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T and Pfaffl MW. 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**(3) 597-601.
- Byun J, Logothetis CJ and Gorlov IP. 2009. Housekeeping genes in prostate tumorigenesis. *Int J Cancer* **125**(11) 2603-8.
- Cano P, Godoy A, Escamilla R, Dhir R and Onate SA. 2007. Stromal-epithelial cell interactions and androgen receptor-coregulator recruitment is altered in the tissue microenvironment of prostate cancer. *Cancer Res* **67**(2) 511-9.
- Chatterjee B. 2003. The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cell Biochem* **253**(1-2) 89-101.
- Cheng S, Brzostek S, Lee SR, Hollenberg AN and Balk SP. 2002. Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* **16**(7) 1492-501.
- Chiu YT, Han HY, Leung SC, Yuen HF, Chau CW, Guo Z, Qiu Y, Chan KW, Wang X, Wong YC, *et al.* 2009. CDC25A functions as a novel Ar corepressor in prostate cancer cells. *J Mol Biol* **385**(2) 446-56.
- Coburn GA and Cullen BR. 2003. siRNAs: a new wave of RNA-based therapeutics. *J Antimicrob Chemother* **51**(4) 753-6.
- Compagno D, Merle C, Morin A, Gilbert C, Mathieu JR, Bozec A, Mauduit C, Benahmed M and Cabon F. 2007. siRNA-directed in vivo silencing of androgen receptor inhibits the growth of castration-resistant prostate carcinomas. *PLoS One* **2**(10) e1006.
- Czauderna F, Santel A, Hinz M, Fechtner M, Durieux B, Fisch G, Leenders F, Arnold W, Giese K, Klippel A, *et al.* 2003. Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res* **31**(21) e127.
- D'Antonio JM, Ma C, Monzon FA and Pflug BR. 2008. Longitudinal analysis of androgen deprivation of prostate cancer cells identifies pathways to androgen independence. *Prostate* **68**(7) 698-714.
- Daneshgari F and Crawford ED. 1993. Endocrine therapy of advanced carcinoma of the prostate. *Cancer* **71**(3 Suppl) 1089-97.

- de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ and ter Elst A. 2007. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* **2**(9) e898.
- de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW and Span PN. 2005. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* **85**(1) 154-9.
- Deindl E, Boengler K, van Royen N and Schaper W. 2002. Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries. *Mol Cell Biochem* **236**(1-2) 139-46.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA and Zumla A. 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* **344**(1) 141-3.
- Epstein JI. 2004. Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Mod Pathol* **17**(3) 307-15.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669) 806-11.
- Glare EM, Divjak M, Bailey MJ and Walters EH. 2002. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* **57**(9) 765-70.
- Gobinet J, Auzou G, Nicolas JC, Sultan C and Jalaguier S. 2001. Characterization of the interaction between androgen receptor and a new transcriptional inhibitor, SHP. *Biochemistry* **40**(50) 15369-77.
- Gobinet J, Poujol N and Sultan C. 2002. Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* **198**(1-2) 15-24.
- Goldstein AS, Huang J, Guo C, Garraway IP and Witte ON. 2010. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science* **329**(5991) 568-71.
- Golias C, Iliadis I, Peschos D and Charalabopoulos K. 2009. Amplification and co-regulators of androgen receptor gene in prostate cancer. *Exp Oncol* **31**(1) 3-8.
- Gronberg H. 2003. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* **361**(9360) 859-64.
- Gross M, Top I, Laux I, Katz J, Curran J, Tindell C and Agus D. 2007. Beta-2-microglobulin is an androgen-regulated secreted protein elevated in serum of patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* **13**(7) 1979-86.

- Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrola T, Ylikoski E, Warrington JA and Lahesmaa R. 2001. Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Anal Biochem* **299**(1) 63-70.
- Hammond SM. 2005. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* **579**(26) 5822-9.
- Harada N, Yasunaga R, Higashimura Y, Yamaji R, Fujimoto K, Moss J, Inui H and Nakano Y. 2007. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **282**(31) 22651-61.
- Heemers HV, Regan KM, Dehm SM and Tindall DJ. 2007. Androgen induction of the androgen receptor coactivator four and a half LIM domain protein-2: evidence for a role for serum response factor in prostate cancer. *Cancer Res* **67**(21) 10592-9.
- Heemers HV, Regan KM, Schmidt LJ, Anderson SK, Ballman KV and Tindall DJ. 2009. Androgen modulation of coregulator expression in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* **23**(4) 572-83.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**(9) 1026-30.
- Hodgson MC, Astapova I, Hollenberg AN and Balk SP. 2007. Activity of androgen receptor antagonist bicalutamide in prostate cancer cells is independent of NCoR and SMRT corepressors. *Cancer Res* **67**(17) 8388-95.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**(4) 279-84.
- Huggins C and Hodges CV. 1941. Effect of castration, estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research* **1** 293-297.
- Huggins C and Hodges CV. 1941. Studies on prostate cancer. Effect of castration, estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research* **1** 293-297.
- INCA. (2010). "Estimativa 2010. Incidência de Câncer no Brasil." Retrieved Acessado em 01 de fevereiro de 2010.
- Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP, Arasheben A, Tilley WD, Scher HI, Gerald WL, *et al.* 2007. Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Mol Cancer* **6** 39.

- Jepsen K, Hermanson O, Onami TM, Gleiberman AS, Lunyak V, McEvelly RJ, Kurokawa R, Kumar V, Liu F, Seto E, *et al.* 2000. Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* **102**(6) 753-63.
- Johnson ML, Redmer DA and Reynolds LP. 1995. Quantification of lane-to-lane loading of poly(A) RNA using a biotinylated oligo(dT) probe and chemiluminescent detection. *Biotechniques* **19**(5) 712-5.
- Khimani AH, Mhashilkar AM, Mikulskis A, O'Malley M, Liao J, Golenko EE, Mayer P, Chada S, Killian JB and Lott ST. 2005. Housekeeping genes in cancer: normalization of array data. *Biotechniques* **38**(5) 739-45.
- Kinoshita M, Nakagawa T, Shimizu A and Katsuoka Y. 2005. Differently regulated androgen receptor transcriptional complex in prostate cancer compared with normal prostate. *Int J Urol* **12**(4) 390-7.
- Koochekpour S. 2010. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl* **12**(5) 639-57.
- Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, *et al.* 2005. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol* **205**(3) 359-76.
- Kumaresan K, Kakkar N, Verma A, Mandal AK, Singh SK and Joshi K. 2010. Diagnostic utility of alpha-methylacyl CoA racemase (P504S) & HMWCK in morphologically difficult prostate cancer. *Diagn Pathol* **5**(1) 83.
- Kyprianou N, Tu H and Jacobs SC. 1996. Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. *Hum Pathol* **27**(7) 668-75.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259) 680-5.
- Latil A, Bieche I, Vidaud D, Lidereau R, Berthon P, Cussenot O and Vidaud M. 2001. Evaluation of androgen, estrogen (ER alpha and ER beta), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res* **61**(5) 1919-26.
- Lenz G. 2005. The RNA interference revolution. *Braz J Med Biol Res* **38**(12) 1749-57.
- Liao X, Tang S, Thrasher JB, Griebeling TL and Li B. 2005. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* **4**(4) 505-15.

- Lisowski P, Pierzchala M, Goscik J, Pareek CS and Zwierzchowski L. 2008. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid. *J Appl Genet* **49**(4) 367-72.
- Luo JH, Yu YP, Ciepły K, Lin F, DeFlavia P, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G and Becich M. 2002. Gene expression analysis of prostate cancers. *Mol Carcinog* **33**(1) 25-35.
- Mink SR, Hodge A, Agus DB, Jain A and Gross ME. 2010. Beta-2-microglobulin expression correlates with high-grade prostate cancer and specific defects in androgen signaling. *Prostate* **70**(11) 1201-10.
- Mogal A and Abdulkadir SA. 2006. Effects of Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi); Trichostatin-A (TSA) on the expression of housekeeping genes. *Molecular and Cellular Probes* **20**(2) 81-86.
- Morrison TB, Weis JJ and Wittwer CT. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**(6) 954-8, 960, 962.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2) 55-63.
- Moss EG. 2001. RNA interference: it's a small RNA world. *Curr Biol* **11**(19) R772-5.
- Nelson PS. 2004. Predicting prostate cancer behavior using transcript profiles. *J Urol* **172**(5 Pt 2) S28-32; discussion S33.
- Nelson WG, De Marzo AM and Isaacs WB. 2003. Prostate cancer. *N Engl J Med* **349**(4) 366-81.
- O'Dowd GJ, Veltri RW, Miller MC and Strum SB (2001) "The Gleason Score: A Significant Biologic Manifestation of Prostate Cancer Aggressiveness On Biopsy." PCRI Papers.
- Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A, et al. 2005. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med* **83**(12) 1014-24.
- Ozen M and Ittmann M. 2005. Increased expression and activity of CDC25C phosphatase and an alternatively spliced variant in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **11**(13) 4701-6.
- Peng Y, Li CX, Chen F, Wang Z, Ligr M, Melamed J, Wei J, Gerald W, Pagano M, Garabedian MJ, et al. 2008. Stimulation of prostate cancer cellular proliferation and invasion by the androgen receptor co-activator ARA70. *Am J Pathol* **172**(1) 225-35.



- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**(6) 509-15.
- Pienta KJ, Abate-Shen C, Agus DB, Attar RM, Chung LW, Greenberg NM, Hahn WC, Isaacs JT, Navone NM, Peehl DM, *et al.* 2008. The current state of preclinical prostate cancer animal models. *Prostate* **68**(6) 629-39.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W and Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**(4) 856-62.
- Rahman MM, Miyamoto H, Takatera H, Yeh S, Altuwajiri S and Chang C. 2003. Reducing the agonist activity of antiandrogens by a dominant-negative androgen receptor coregulator ARA70 in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **278**(22) 19619-26.
- Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N and Bielawski KP. 2007. [Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **61** 500-10.
- Rosner IL, Ravindranath L, Furusato B, Chen Y, Gao C, Cullen J, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S and Petrovics G. 2007. Higher tumor to benign ratio of the androgen receptor mRNA expression associates with prostate cancer progression after radical prostatectomy. *Urology* **70**(6) 1225-9.
- Rozen S and Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132** 365-86.
- Santos AR and Duarte CB. 2008. Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **86**(16) 3684-92.
- Schalken J. 2005. Androgen Receptor Mediated Growth of Prostate (Cancer). *European Urology Supplements* **4** 4-11.
- Schmidt U, Fuessel S, Koch R, Baretton GB, Lohse A, Tomasetti S, Unversucht S, Froehner M, Wirth MP and Meye A. 2006. Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate* **66**(14) 1521-34.
- Schmittgen TD and Zakrajsek BA. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* **46**(1-2) 69-81.
- Schulman CC, Irani J, Morote J, Schalken JA, Montorsi F, Chlosta PL and Heidenreich A. 2010. Testosterone measurement in patients with prostate cancer. *Eur Urol* **58**(1) 65-74.

- Seinen E, Burgerhof JG, Jansen RC and Sibon OC. 2011. RNAi-induced off-target effects in *Drosophila melanogaster*: frequencies and solutions. *Brief Funct Genomics* **10**(4) 206-14.
- Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG and Griffiths LR. 2001. Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes* **15**(5) 307-11.
- Shi C, Zhu Y, Su Y, Chung LW and Cheng T. 2009. Beta2-microglobulin: emerging as a promising cancer therapeutic target. *Drug Discov Today* **14**(1-2) 25-30.
- Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, Tamayo P, Renshaw AA, D'Amico AV, Richie JP, *et al.* 2002. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* **1**(2) 203-9.
- Spanakis E. 1993. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res* **21**(16) 3809-19.
- Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, Hauptmann S, Kishi T, Nakamura T, Loening SA, *et al.* 2004. Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. *J Urol* **171**(1) 187-91.
- Suh JH, Gong EY, Kim JB, Lee IK, Choi HS and Lee K. 2008. Sterol regulatory element-binding protein-1c represses the transactivation of androgen receptor and androgen-dependent growth of prostatic cells. *Mol Cancer Res* **6**(2) 314-24.
- Suh JH, Shong M, Choi HS and Lee K. 2008. CR6-interacting factor 1 represses the transactivation of androgen receptor by direct interaction. *Mol Endocrinol* **22**(1) 33-46.
- Suzuki K, Nishiyama T, Hara N, Yamana K, Takahashi K and Labrie F. 2007. Importance of the intracrine metabolism of adrenal androgens in androgen-dependent prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **10**(3) 301-6.
- Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN and Balk SP. 1995. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* **332**(21) 1393-8.
- Tischler V, Fritzsche FR, Gerhardt J, Jager C, Stephan C, Jung K, Dietel M, Moch H and Kristiansen G. 2010. Comparison of the diagnostic value of fatty acid synthase (FASN) with alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) as prostatic cancer tissue marker. *Histopathology* **56**(6) 811-5.
- Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J and Zhang Z. 2009. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol Biol* **10** 71.

- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA and Orlando C. 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* **309**(2) 293-300.
- Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, Eardley I, Selby PJ and Banks RE. 2003. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* **3**(8) 1620-32.
- Urbanucci A, Waltering KK, Suikki HE, Helenius MA and Visakorpi T. 2008. Androgen regulation of the androgen receptor coregulators. *BMC Cancer* **8** 219.
- Valenti MT, Bertoldo F, Dalle Carbonare L, Azzarello G, Zenari S, Zanatta M, Balducci E, Vinante O and Lo Cascio V. 2006. The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer* **6** 49.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**(7) RESEARCH0034.
- Wan Q, Whang I, Choi CY, Lee JS and Lee J. 2011. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying biomarkers of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **153**(3) 259-68.
- Warner JR. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**(11) 437-40.
- Wong L and Bushman W. 2010. Comment on basal epithelial stem cells as efficient targets for prostate cancer initiation. *Stem Cell Res Ther* **1**(2) 16.
- Xu XF, Zhou SW, Zhang X, Ye ZQ, Zhang JH, Ma X, Zheng T and Li HZ. 2006. Prostate androgen-regulated gene: a novel potential target for androgen-independent prostate cancer therapy. *Asian J Androl* **8**(4) 455-62.
- Yang Q, Fung KM, Day WV, Kropp BP and Lin HK. 2005. Androgen receptor signaling is required for androgen-sensitive human prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Cell Int* **5**(1) 8.
- Yoon HG and Wong J. 2006. The corepressors silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor and nuclear receptor corepressor are involved in agonist- and antagonist-regulated transcription by androgen receptor. *Mol Endocrinol* **20**(5) 1048-60.

Zhong H and Simons JW. 1999. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **259**(3) 523-6.

Zhou M, Aydin H, Kanane H and Epstein JI. 2004. How often does alpha-methylacyl-CoA-racemase contribute to resolving an atypical diagnosis on prostate needle biopsy beyond that provided by basal cell markers? *Am J Surg Pathol* **28**(2) 239-43.

## **ANEXO 1**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Título:** Efeitos do silenciamento do receptor de androgênios e seus correguladores FHL2 e NCoR por siRNAs na expressão gênica e resposta proliferativa de células de carcinoma prostático

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos, como o câncer de próstata (CaP), que são diagnosticados nas clínicas de urologia. 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 carcinoma de próstata e foi recomendado cirurgia para retirada do mesmo, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que um pequeno fragmento do seu nódulo prostático seja encaminhado para estudo genético. O restante do nódulo da próstata será destinado ao exame histológico normal.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras por até cinco anos, para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos do nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se

possível, será solicitado novo termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

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

Os pesquisadores responsáveis por este projeto são Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (51 33083559) e Ms. Gisele Branchini (51 81401240). 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 *Journal of Molecular Endocrinology* 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.

Reference gene for primary culture of prostate cancer cells

Gisele Branchini<sup>1,2\*</sup>, Aline Francielle Damo Souza<sup>1,2\*</sup>, Brasil Silva Neto<sup>3</sup>, Milton Berger<sup>3</sup>, Ilma Simoni Brum<sup>1,2§</sup>

\*The two first authors contributed equally to this work

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 - BR;

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

§Corresponding author

E-mail address: Ilma@ufrgs.br

Short title: reference gene in prostate cancer

Keywords: reference gene, mRNA quantification, prostate cancer, primary cell culture



## Abstract

Reference genes are used to normalize mRNA levels between samples in quantitative polymerase chain reaction. Selection of control genes is critical for gene expression studies because their expression can vary depending on the tissues or cells used and the experimental conditions. We evaluated nine reference genes for gene expression studies in primary culture of prostate cancer cells submitted to siRNA transfection. The genes analyzed were: *aminolevulinate, delta-, synthase 1 (ALAS1)*; *beta-actin (ACTB)*; *beta-2-microglobulin (B2M)*; *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*; *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)*; *succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) (SDHA)*; *TATA box binding protein (TBP)*; *ubiquitin C (UBC)*; *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ)*. Expression stability was calculated using geNorm and NormFinder algorithms to find the most stable genes. We evaluated the androgen receptor mRNA expression after normalization by each candidate gene. The algorithms indicated different genes or a combination of two genes as the most stable ones. geNorm indicated *B2M* and *YWHAZ* when all samples were analyzed; when the analysis considered the subdivided groups (control and transfected groups), the best combination of two genes was *SDHA* and *ALAS1*. NormFinder calculated *SDHA* as the most stable gene and the gene with the lowest intergroup variation. The androgen receptor expression showed statistical difference in the transfected group compared with the control group only when normalized by *GAPDH* or the combination of *GAPDH* and *SDHA*. Based on the algorithm analysis, *SDHA* should be used to normalize target genes mRNA levels in primary culture of prostate cancer cells submitted to transfection with siRNAs.

## Introduction

Prostate cancer (PCa) is the sixth most common cancer in the world and the most prevalent in men, accounting for 10% of all types of cancers. In Brazil PCa is the second main cause of cancer death among men (INCA 2010). Despite the rising knowledge about the hormonal, nutritional, and environmental context of PCa, several mechanisms concerning the pathogenesis of prostate cancer have to be clarified. PCa is a heterogeneous disease with variation in clinical aggressiveness, and its behavior could be a direct or indirect result of gene expression alterations in prostate epithelial cells (Luo *et al.* 2002). However, the molecular events by which PCa progresses from an asymptomatic and non-life-threatening disease to a life-threatening disease are not well understood (Luo *et al.* 2002). Thus, many researchers are using the gene expression profile of prostate tumors to detect alterations related to tumor development (Singh *et al.* 2002; Nelson 2004; Kristiansen *et al.* 2005). The establishment of a gene expression profile for prostate cancer will contribute to patients' prognosis, tumor stratification, classification of insignificant PCa, development of tools for early detection, and identification of therapeutic targets (Luo *et al.* 2002).

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) is a well established, easy to perform technique used in gene expression studies because it allows fast, accurate, and sensitive evaluation of mRNA levels in biological samples (Huggett *et al.* 2005). As RT-PCR is a multiple step method, from sample collection to amplification data analysis, there is an inherent variability in its use, which may result in gene expression data distinct from the actual data. Therefore, an appropriate normalization strategy for the quantitative data is necessary to make accurate comparison between samples. Without appropriate normalization, the expression profile of a gene could be erroneously interpreted (Tricarico *et al.* 2002). Several normalization strategies have been proposed, however, the use of reference genes is the gold standard to normalize mRNA fractions from biological samples (de Jonge *et al.* 2007).

Housekeeping genes (HKGs), also called reference genes or maintenance genes, maintain basic cell metabolic functions and provide support to cell cycle (Khimani *et al.* 2005). To be used as a reference gene, a gene should meet the following criteria: stability, non-regulated expression in the analyzed samples, absence of variation under experimental treatment conditions, and similar expression levels to transcript levels of the target

gene (Bustin 2002). Constitutive genes or housekeeping genes meet those criteria and have been used for normalization in many gene expression studies (Radonic *et al.* 2004).

Even though an inappropriate normalization can result in inadequate quantification of mRNA levels and erroneous conclusions about gene expression profile, the use of reference genes commonly accepted as housekeeping genes without prior validation of this gene under experimental conditions is frequent (de Kok *et al.* 2005). Evidence shows that there is not an universal reference gene (Huggett *et al.* 2005); therefore, the gene should be chosen and validated considering the tissue and specific experimental conditions applied to the samples (Bustin *et al.* 2005).

There is no information about a validated housekeeping gene for gene expression studies in primary culture of prostate cancer cells. Most of the previous gene expression studies with prostatic tissues and cell lines have used the following genes: *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Rosner *et al.* 2007), *beta-actin* (Luo *et al.* 2002; Stephan *et al.* 2004; Kinoshita *et al.* 2005), and *B2M* (*beta-2-microglobulin*) (Taplin *et al.* 1995). However, studies have shown variation in some of those genes in prostatic tissue (Gross *et al.* 2007; Harada *et al.* 2007; Shi *et al.* 2009), suggesting that they are inappropriate for normalization in gene expression studies of prostate cells.

The objective of the present study was to identify appropriate reference genes for normalization in gene expression studies using RT-PCR in primary culture of prostate cancer cells submitted to androgen receptor silencing by small interfering RNAs (siRNAs).

## **Materials and Methods**

### *Materials and Reagents*

Hank's solution, kanamycin sulfate, and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DMEM high glucose was purchased from LGC Biotecnologia (Cotia, SP, Brazil). Six-well plates were purchased from Nunc (Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Denmark). RNAi reagents were obtained from Upstate (Charlottesville, Virginia, USA).

### *Primary culture of prostate cancer cells*

Primary culture was performed from a fragment of tumor collect on the day of surgical procedure (radical prostatectomy or prostatovesiculectomy). Patients were recruited from the Department of Urology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). PCa diagnosis was confirmed by anatomic pathology test. The patients selected were not treated with hormone therapy or chemotherapy, and did not have another type of cancer. All patients provided written consent to participate in the study. The present study was approved by the Research Ethics Committee of the HCPA.

Ten primary cultures were performed. The initial fragment was placed in Hank's solution plus 0.5 mg/mL kanamycin sulfate. The tissue was sectioned in 2x2-mm fragments (explants), and the explants were plated in 1 mL of FBS in 6-well plates (approximately 6 fragments per well). After 24 hours, FBS was replaced with 1 mL of culture medium (DMEM high glucose supplemented with 10% FBS (v/v) and 0.5 mg/mL kanamycin sulfate). The cultures were kept in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for approximately ten days, and the medium was replaced every 48 hours. The cells were divided into two groups: a control group (non-transfected cells) and a transfected group (with androgen receptor siRNA or non-specific siRNA).

### *Androgen receptor silencing*

Androgen receptor siRNAs and negative controls (non-specific siRNAs) were obtained from Upstate (SMARTpool®) (Charlottesville, Virginia, USA). The transfection reagent used was siIMPORTER™ Transfection Reagent (Upstate, Charlottesville, Virginia, USA). All transfections were done according to the manufacturer's protocol.

#### *Total RNA extraction*

Total RNA was extracted using the reagent Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were lysed directly in wells containing 1 mL of Trizol per 10 cm<sup>2</sup>. The extraction 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)<sub>12-18</sub> primer, using the SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol.

RT-PCR 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<sup>-1</sup> Rox Dye, 0.1 µL of each primer [10 µmol l<sup>-1</sup> forward and 10 µmol l<sup>-1</sup> 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).

#### *Primer design*

Primers were designed with PrimeTime qPCR Assay Entry (IDT, Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA), except for the androgen-receptor primer, which was designed with Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000) and synthesized by IDT (table 1).

The genes included in the study were: *aminolevulinatase, delta-, synthase 1 (ALAS1)*; *beta-actin (ACTB)*; *beta-2-microglobulin (B2M)*; *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*; *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)*; *succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) (SDHA)*; *TATA box binding protein (TBP)*; *ubiquitin C (UBC)*; *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ)*. All these genes have been previously evaluated in different tissues and sample types (de Kok *et al.* 2005; Ohl *et al.* 2005).

### *Statistical analysis*

Analysis of quantification data was done using geNorm (Vandesompele *et al.* 2002) and NormFinder (Andersen *et al.* 2004) algorithms, which are Visual Basic applications for Microsoft Excel. For geNorm analysis, quantification data was relativized to the highest value sample. For NormFinder analysis, data was subdivided into control group (control samples, non-transfected cells) and transfected group (androgen receptor siRNA and negative control). The data of androgen receptor mRNA quantification were normalized by each reference gene data. The data of androgen receptor expression of the transfected group of each culture was relativized to the control group data and analyzed using one-way ANOVA (Duncan's post hoc test) in the SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc).

## Results

To identifying the best reference gene for sample normalization in gene expression studies in primary culture of prostate cancer cells, we amplified nine genes commonly used as control genes (*ALASI*, *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA*, *TBP*, *UBC*, and *YWHAZ*). The samples were diluted 100X and nevertheless the sample CT values for the ubiquitin C gene extrapolated the highest concentration point of the standard curve; thus it was excluded from the analysis. Mean  $C_T$  values, standard deviation (SD), coefficient of variation (CV), and maximum fold change (MFC – ratio of the maximum and minimum values) are showed in table 2, in ascending order of CV. These values represent the first analysis of dispersion data, and could suggest the least variable gene. However, as demonstrated by the minimum and maximum values, none of the genes had a constant expression, which may indicate that the dispersion data is not sufficient to identify an adequate reference gene in primary culture of prostate cancer cells transfected with siRNA.

We proceeded the analysis using geNorm (Vandesompele *et al.* 2002) and NormFinder (Andersen *et al.* 2004) for quantification data (in ng). geNorm provides a rank of tested genes based on  $M$  value, which reflects the expression stability of a given control gene when compared with another control gene. This measure relies on the principle that the expression of two perfect housekeeping genes is constant in all samples, regardless of the experimental conditions. When the expression ratios vary, it means that one or both genes are not constantly expressed. Genes with lower  $M$  values have a more stable expression (Vandesompele *et al.* 2002; Lisowski *et al.* 2008; Tong *et al.* 2009). Figure 1 shows the  $M$  values for the eight genes evaluated, indicating that *B2M* and *YWHAZ* are the best combination for normalization when all samples were analyzed ( $M = 0.578$ ). In the analysis of the separate groups (control or transfected), geNorm calculated *ALASI* and *SDHA* as the most stable genes ( $M = 0.518$  and  $M = 0.425$ , respectively).

NormFinder directly estimates the variation in the expression of each candidate gene, considering systematic differences between sample subgroups (Andersen *et al.* 2004). The expression stability of a candidate gene is indicated by its stability value. NormFinder demonstrated that *SDHA* was the most stable gene, with the lowest stability value (figure 2A), also showing the smallest intergroup variation (figure 2B). The algorithm also suggested the best combination of the two most stable genes to compensate the fluctuation of experimental data

in gene expression variations in response to a treatment (Santos & Duarte 2008). This algorithm considered *SDHA* and *GAPDH* as the best combination of two genes.

One of the main target genes in our studies is the androgen receptor (*AR*) gene. We evaluate the expression of the *AR* mRNA in control and transfected groups. The quantified data from amplification of the *AR* mRNA were normalized by each of the eight candidate reference genes and also by the normalization factor (NF) of the best combination of the two genes suggested by geNorm and NormFinder. The ratio *AR/control gene* was relativized to the control group value in each culture. Figure 3 shows the *AR* gene expression in the transfected group (androgen receptor siRNA or negative control) compared with the control group. Only when normalized by *GAPDH* or the combination of *SDHA* and *GAPDH*, the *AR* mRNA expression showed statistical difference between the control and transfected groups.



## Discussion

According to the current consensus on the use of reference genes to accurately quantify gene expression, there is not one single gene that is a “real” universal housekeeping gene. Different approaches have been proposed to identify gene expression stability and indicate the best control genes under various experimental conditions and using different cell types, such as the algorithms geNorm and NormFinder (Vandesompele *et al.* 2002; Andersen *et al.* 2004; Pfaffl *et al.* 2004; de Jonge *et al.* 2007; Tong *et al.* 2009). However, because these strategies are based on different algorithms and analytical procedures, each software produces a different set of top ranked housekeeping genes (Tong *et al.* 2009). Despite the recommendation for the use of only one of the tools available to choose stable housekeeping genes (Wan *et al.* 2011), we decided to use both geNorm and NormFinder to analyze our data of prostate cancer cells.

geNorm ranks the genes according to the pairwise variation with all other control genes and defines a measure of gene stability (*M* value) of a particular gene compared with all other genes (Vandesompele *et al.* 2002). However, this software analyzes all samples, regardless of the differences between control samples and experimental samples. NormFinder, on its turn, provides the overall expression variation and also the variation across subgroups of samples, top ranking the candidates with minimal estimated intra- and intergroup variation (Andersen *et al.* 2004). According to Andersen *et al.*, discrepancies in the results of these two strategies are caused by the differences between the approaches (Andersen *et al.* 2004). Indeed, in the present study, these algorithms showed different results for those genes indicated as the most stable ones. geNorm indicated *B2M* and *YWHAZ* as the best combination of most stable genes for normalization in primary culture of prostate cancer cells mRNA samples transfected with siRNA or in control samples; whereas NormFinder indicated that *SDHA* had the lowest stability value. Nevertheless, in the analysis of group samples (control or transfected cells), geNorm also indicated *SDHA* and *ALAS1* as the best combination of two genes for each group. This discrepancy could be explained by the fact that geNorm tends to select the genes with the highest degree of similarity of the expression profile across the sample set, and the genes with minimal expression variation are not necessarily top ranked (Andersen *et al.* 2004). This result also suggests that *B2M* and *YWHAZ* could change their expression in response to experimental conditions (transfection), thus these genes are not the best choice to normalize mRNA

fraction under this condition. As NormFinder considers intra- and intergroup variation in order to top rank the most stable genes, we suggest that *SDHA* may be the best choice for normalization of mRNA levels amplified by quantitative RT-PCR in primary culture of prostate cancer cells, since these cultures are performed to evaluate the influence of a given treatment on gene expression, thus generating subgroups of samples.

geNorm also indicated the optimal number of reference genes to generate an accurate NF for normalization. The pairwise variation of geNorm indicated that three genes is the optimal number of control genes (data not shown). In spite of the recommendation to use more than one reference gene for an accurate normalization in animal and vegetal species (Vandesompele *et al.* 2002; Lisowski *et al.* 2008; Tong *et al.* 2009), it may not be feasible when few target genes are being studied or when there is limited amount of RNA available (Andersen *et al.* 2004; Huggett *et al.* 2005). Cell cultures from a limited tissue sample or a biopsy sample are examples of such conditions. Andersen *et al.* also showed that the normalization is not necessarily improved by the use of a NF. The use of a NF is recommended only when the candidate reference genes show significant variation. When this is the case, those genes with opposite-directed intergroup variation should be selected to provide accurate normalization (Andersen *et al.* 2004).

In order to evaluate the impact of the use of one or two reference genes on our model, we amplified the androgen receptor mRNA, which was silenced in the cultures. We found a statistical difference between the control group and transfected group only after normalization by *GAPDH* or the combination of *SDHA* and *GAPDH* (figure 3). However, all cultures showed decreased *AR* mRNA levels in the siAR group, as expected.

Some studies have reported the evaluation of the best reference gene to be used in prostatic tissues, but none of them has performed primary culture of prostate cancer cells (Radonic *et al.* 2004; de Kok *et al.* 2005; Ohl *et al.* 2005; Mogal & Abdulkadir 2006). Also, many studies accessing gene expression profiles in prostate cancer samples have used only one gene to normalized the target gene expression (*ACTB*, *GAPDH*, *TBP*, *HPRT1*, and others) without a previous evaluation of their stability (Ohl *et al.* 2005). Nevertheless, the studies conducted to identify the adequate control gene for prostate samples used different types of samples, such as commercially available cDNA (Radonic *et al.* 2004), normal, prostatic hyperplasia, and prostatic tumor tissues (de Kok *et al.* 2005), paired malignant and nonmalignant prostatic tissue (Ohl *et al.* 2005), and LNCaP cells

(Mogal & Abdulkadir 2006). Therefore, distinct results were found: *RNA Polymerase II* (Radonic *et al.* 2004), *HPRT1* (de Kok *et al.* 2005), *HPRT1* alone or the combination of *HPRT1* and *ALAS1*, or *HPRT1*, *ALAS1* and *K-ALPHA-1* (Ohl *et al.* 2005), and *ribosomal highly-basic 23-kDa protein, RPL13A* (Mogal & Abdulkadir 2006).

We found *SDHA* and *ALAS1* or *B2M* and *YWHAZ* as the most appropriate combination of two genes for normalization in our model using geNorm. NormFinder indicated *SDHA* alone or in combination with *GAPDH*. The relative expression of AR showed a decrease in the group siAR, as expected, but only when there was normalization by *GAPDH* or by the combination of *SDHA* and *GAPDH* there was a statistical significant difference. We do not recommend the use of *GAPDH* as a reference gene because it is involved in a direct pathway of carbohydrate metabolism, which may be altered in some cancers (Blanquicett *et al.* 2002; Unwin *et al.* 2003). Likewise, *GAPDH* did not show the best parameters of expression stability in our model. Thus, we suggest the use of *SDHA* alone or in combination with *ALAS1* to normalize mRNA fractions in gene expression studies of primary culture of prostate cancer cells. In addition, we recommend that a preliminary evaluation of the expression stability of several candidate control genes is performed in order to avoid inaccurate normalization and unnecessary expenditures.

**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 08-172) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

- Andersen CL, Jensen JL and Orntoft TF 2004 Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**(15) 5245-50.
- Blanquicett C, Johnson MR, Heslin M and Diasio RB 2002 Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies. *Anal Biochem* **303**(2) 209-14.
- Bustin SA 2002 Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* **29**(1) 23-39.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T and Pfaffl MW 2005 Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**(3) 597-601.
- de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ and ter Elst A 2007 Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* **2**(9) e898.
- de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW and Span PN 2005 Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* **85**(1) 154-9.
- Gross M, Top I, Laux I, Katz J, Curran J, Tindell C and Agus D 2007 Beta-2-microglobulin is an androgen-regulated secreted protein elevated in serum of patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* **13**(7) 1979-86.
- Harada N, Yasunaga R, Higashimura Y, Yamaji R, Fujimoto K, Moss J, Inui H and Nakano Y 2007 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **282**(31) 22651-61.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A 2005 Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**(4) 279-84.
- INCA. (2010). "Estimativa 2010. Incidência de Câncer no Brasil." Retrieved Acessado em 01 de fevereiro de 2010.
- Khimani AH, Mhashilkar AM, Mikulskis A, O'Malley M, Liao J, Golenko EE, Mayer P, Chada S, Killian JB and Lott ST 2005 Housekeeping genes in cancer: normalization of array data. *Biotechniques* **38**(5) 739-45.
- Kinoshita M, Nakagawa T, Shimizu A and Katsuoka Y 2005 Differently regulated androgen receptor transcriptional complex in prostate cancer compared with normal prostate. *Int J Urol* **12**(4) 390-7.
- Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, et al. 2005 Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol* **205**(3) 359-76.
- Lisowski P, Pierzchala M, Goscik J, Pareek CS and Zwierzchowski L 2008 Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid. *J Appl Genet* **49**(4) 367-72.
- Luo JH, Yu YP, Cieply K, Lin F, Deflavia P, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G and Becich M 2002 Gene expression analysis of prostate cancers. *Mol Carcinog* **33**(1) 25-35.
- Mogal A and Abdulkadir SA 2006 Effects of Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi); Trichostatin-A (TSA) on the expression of housekeeping genes. *Molecular and Cellular Probes* **20**(2) 81-86.
- Nelson PS 2004 Predicting prostate cancer behavior using transcript profiles. *J Urol* **172**(5 Pt 2) S28-32; discussion S33.

- Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A, *et al.* 2005 Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med* **83**(12) 1014-24.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP 2004 Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**(6) 509-15.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W and Nitsche A 2004 Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **313**(4) 856-62.
- Rosner IL, Ravindranath L, Furusato B, Chen Y, Gao C, Cullen J, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S and Petrovics G 2007 Higher tumor to benign ratio of the androgen receptor mRNA expression associates with prostate cancer progression after radical prostatectomy. *Urology* **70**(6) 1225-9.
- Rozen S and Skaletsky H 2000 Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132** 365-86.
- Santos AR and Duarte CB 2008 Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **86**(16) 3684-92.
- Shi C, Zhu Y, Su Y, Chung LW and Cheng T 2009 Beta2-microglobulin: emerging as a promising cancer therapeutic target. *Drug Discov Today* **14**(1-2) 25-30.
- Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, Tamayo P, Renshaw AA, D'Amico AV, Richie JP, *et al.* 2002 Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* **1**(2) 203-9.
- Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, Hauptmann S, Kishi T, Nakamura T, Loening SA, *et al.* 2004 Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. *J Urol* **171**(1) 187-91.
- Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN and Balk SP 1995 Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* **332**(21) 1393-8.
- Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J and Zhang Z 2009 Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol Biol* **10** 71.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA and Orlando C 2002 Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* **309**(2) 293-300.
- Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, Eardley I, Selby PJ and Banks RE 2003 Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* **3**(8) 1620-32.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F 2002 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**(7) RESEARCH0034.
- Wan Q, Whang I, Choi CY, Lee JS and Lee J 2011 Validation of housekeeping genes as internal controls for studying biomarkers of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **153**(3) 259-68.

#### Figure legends

Figure 1. Expression stability ( $M$  values) of eight reference genes in samples of primary culture of prostate cancer cells, as determined by geNorm. A) All samples; B) Control samples; C) siRNA transfected samples.

Figure 2. Expression stability of eight reference genes in samples of primary culture of prostate cancer cells, as determined by NormFinder. A) Stability values of each candidate gene; B) Intergroup variation (control samples vs. siRNA transfected samples), showing *SDHA* as the gene with the smallest variation between groups.

Figure 3. *AR* relative gene expression in primary culture of prostate cancer cells with normalization to eight reference genes and a normalization factor of two genes. The results are presented as means  $\pm$  SEM in Control – control group (non-transfected); siAR group – transfected with specific RNA to *androgen receptor*; siNC group – transfected with non-specific siRNA (negative control) \*Statistically significant differences in gene expression between control and siAR or control and siNC,  $P < 0.05$  (one-way ANOVA, Duncan's post hoc test).

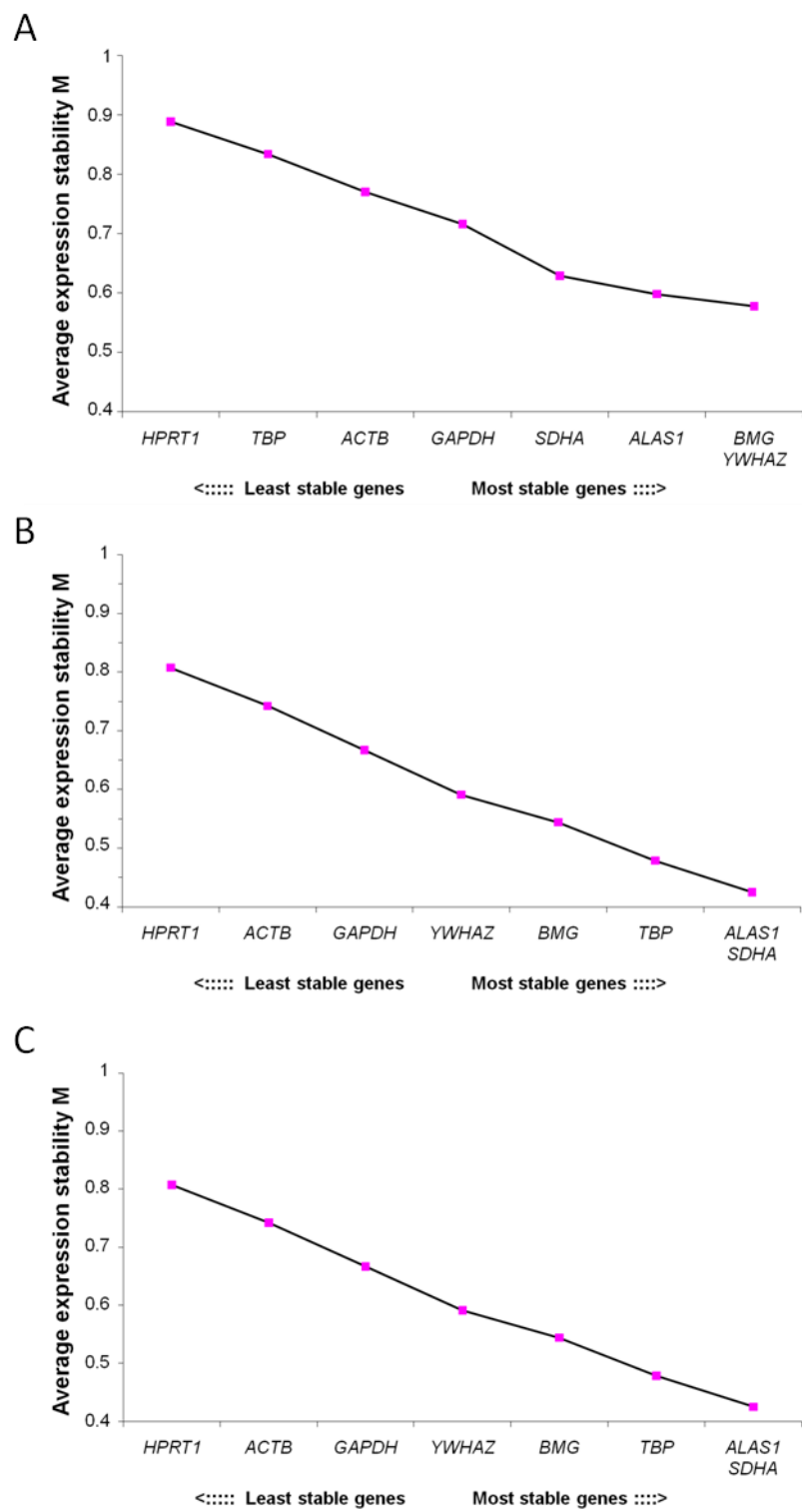


Figure 1



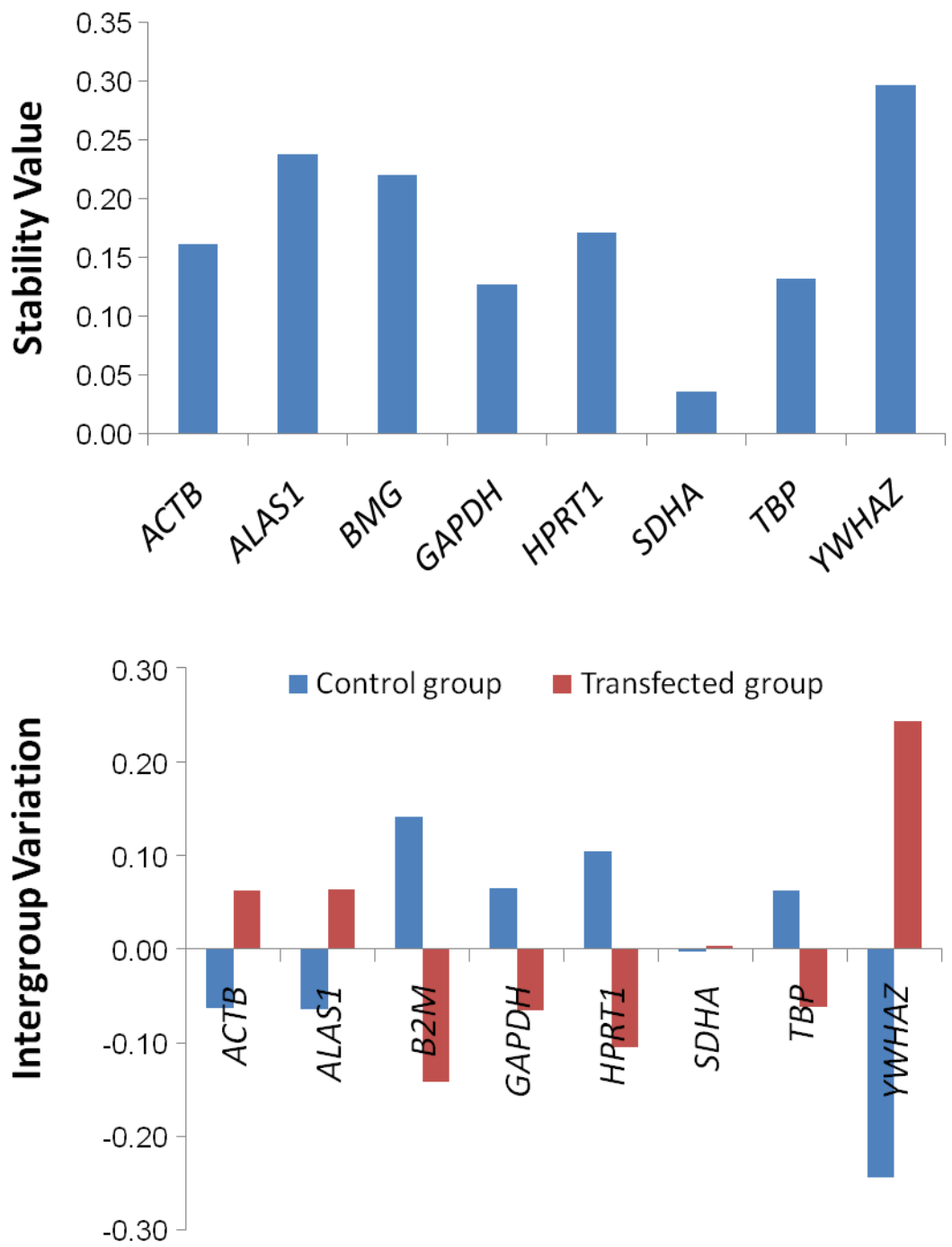


Figure 2

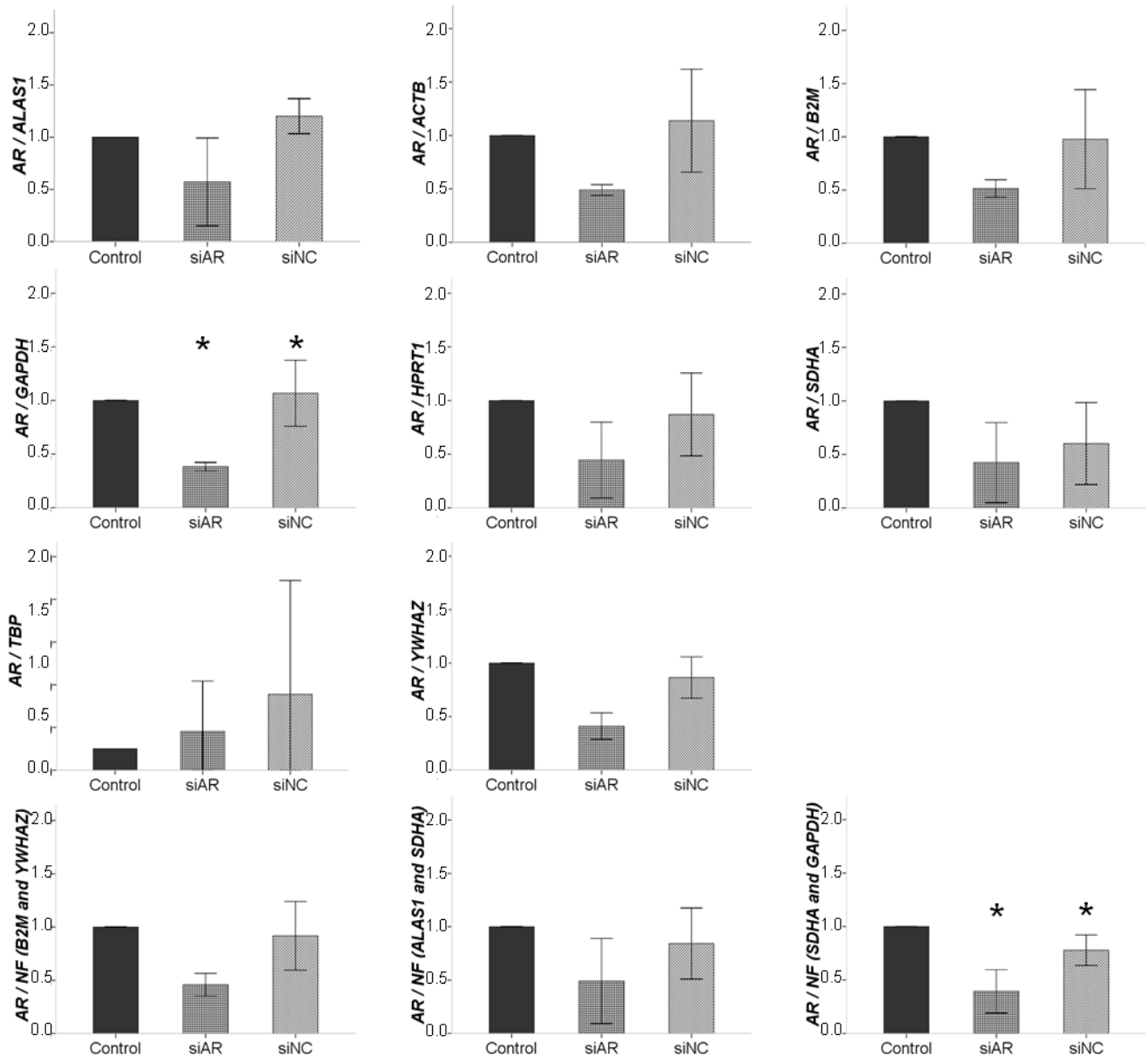


Figure 3

Table 1. Primers sequence, NCBI reference sequence, cell function and product length for housekeeping genes and target genes amplification by qualitative RT-PCR.

Gene symbol	Name	NCBI RefSeq	Strand	Sequence (5' - 3')	Product length (bp)	Cell Function
<i>ACTB</i>	Beta-actin	NM_001101.3	Forward	CTGGAACGGTGAAAGGTGACA	140	Cytoskeletal structural protein
			Reverse	AAGGGACTTCGTAAACAATGCA		
<i>ALAS1</i>	Aminolevulinic acid, delta-, synthase 1	NM_199166.1	Forward	AGTGTGAAACCAGATGGAGG	140	Heme synthesis
			Reverse	CGATCATACTGAAAAAGTGGAAACAG		
<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulin	NM_004048.2	Forward	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	165	Major Histocompatibility Complex
			Reverse	ACAAGTCTGAATGCTCCACT		
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046.3	Forward	CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG	133	Glycolytic enzyme
			Reverse	TCTTCTCTTTGTGCTCTTG		
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_000194.2	Forward	AGATGGTCAAGGTCGCAAG	128	Metabolic salvage of purines
			Reverse	GTATTCATATAGTCAAGGGCATATCC		
<i>SDHA</i>	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	NM_004168.2	Forward	TGGTTGCTTTGGTCGGG	85	Electron transporter in TCA cycle and respiratory chain
			Reverse	GCGTTGGTTAATTGGAGGG		
<i>TBP</i>	TATA box binding protein	NM_003194.4	Forward	GGGTTTTCCAGCTAAGTTCTTG	150	Regulation of transcription
			Reverse	CTGTAGATTAACCAGGAAATAAC		
<i>UBC</i>	Ubiquitin C	NM_021009.5	Forward	GCCTTAGAACCCAGTATCAG	74	Protein degradation
			Reverse	AAGAAAAACAGTGCCCTAGAG		
<i>YWHAZ</i>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	NM_001135699.1	Forward	CAACACATCTATCAGACTGGG	133	Signal transduction
			Reverse	AATGTATCAAGTTTCAGCAATGGC		
<i>AR</i>	Androgen receptor	NM_000044.2	Forward	CTACTCGGACCTTACGGGGACATGCG	427	Steroid-hormone activated transcription factor
			Reverse	GGGCTGACATTCATAGCCTTCAATGTGTGAC		
<i>NCOR</i>	Nuclear receptor corepressor	NM_006311.3	Forward	TCAAAACACCATGTCCAGAGG	137	Regulation of transcription
			Reverse	GAGACTTCGCTGGGATACTTTC		

bp – base pair

Table 2. Dispersion data of C<sub>T</sub> values for eight candidate control genes.

<b>Gene</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>MFC</b>
<i>ALAS1</i>	29,83	2,25	7,55	27,36	34,59	1,26
<i>YWHAZ</i>	24,77	2,05	8,26	20,66	29,62	1,43
<i>HPRT1</i>	31,40	2,65	8,43	27,21	35,96	1,31
<i>SDHA</i>	29,43	2,50	8,49	26,35	35,19	1,34
<i>B2M</i>	21,15	1,86	8,78	18,82	25,09	1,33
<i>GAPDH</i>	21,97	2,13	9,68	19,62	26,45	1,35
<i>ACTB</i>	22,35	2,39	10,71	18,78	27,12	1,44
<i>TBP</i>	30,33	3,39	11,17	24,99	36,86	1,47

SD = standard deviation; CV = coefficient of variation (ratio of SD and mean);  
MFC = maximum fold change (ratio of maximum and minimum values)