

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

Dissertação de Mestrado

Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata e a sua possível associação com a agressividade do tumor.

Ana Caroline Hillebrand

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Gisele Branchini

Porto Alegre, março de 2013.

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

Dissertação de Mestrado

Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata e a sua possível associação com a agressividade do tumor.

Dissertação de Mestrado apresentada ao PPG Ciências Biológicas: Fisiologia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia

Ana Caroline Hillebrand

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Gisele Branchini

Porto Alegre, março de 2013.

“Não encontre um defeito, encontre uma solução”

- Henry Ford

Agradecimentos

Agradeço aos professores do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelos ensinamentos e pelo incentivo à pesquisa.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e à CAPES pelo apoio financeiro.

Quando se tem os melhores professores em casa, qualquer desafio fica mais fácil. Obrigada pai e mãe pelo apoio e incentivo!!!

Ao meu irmão Rafael, por estimular a busca pelo conhecimento, por ser meu super amigo e meu maior exemplo!

Agradeço ao Rodrigo Hanauer, meu namorado, pelo companheirismo e pela compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço muito ao meu amigo e colega Diego Rovaris pela consultoria estatística, e mais que isso, pela amizade de todas as horas!!!

À Lolita Schneider Pizzolato, minha primeira professora científica. Loli, muito obrigada por todos os ensinamentos, irei levá-los por toda minha carreira.

Aos colegas de laboratório pelo apoio, pela colaboração e pela amizade.

Ao Vanderlei Biolchi, obrigada pela colaboração e pelo apoio técnico-científico, que foi fundamental.

À Patrícia Borba Martiny, à Ana Paula Santin e à Amanda de Barros Machado pelo coleguismo, pela parceria, pela colaboração, pela amizade e pelo estímulo.

À minha estimada coorientadora (com muito orgulho) Gisele Branchini, pelo suporte e apoio, pelos ensinamentos, pela amizade, pela presença, pela orientação, pelas extensas horas que passamos juntas tentando decifrar a bioinformática. E ainda, por também acreditar neste trabalho, mesmo quando seria mais fácil desistir e traçar outros objetivos. Como dizem, a melhor coisa que nós temos a dar a alguém, é nosso tempo. Obrigada Gi!

À Ilma Simoni Brum, minha Orientadora (com "O" maiúsculo), que é o exemplo de professora e profissional que desejo seguir. Muito obrigada por ter depositado tal confiança em mim! Quando aceitei o desafio deste trabalho, tinha certeza que, mesmo quando surgissem as dúvidas mais inexplicáveis, eu sempre teria o apoio da minha querida orientadora. Ilma, só tenho a agradecer pela chance e pela confiança!

Sumário

SUMÁRIO.....	4
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO.....	14
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	18
Hiperplasia Prostática Benigna (HPB).....	18
Câncer de próstata (CaP)	20
Androgênios.....	22
Receptor de androgênios.....	24
Processo de <i>Splicing</i> Alternativo	27
Isoformas do receptor de androgênios	28
HIPÓTESES.....	33
OBJETIVOS.....	34
Objetivos gerais.....	34
Objetivos específicos	34

MATERIAIS E MÉTODOS	35
Delineamento do estudo	35
Critérios de inclusão e exclusão.....	35
Coleta das amostras de tecido prostático.....	35
Exame Anatomopatológico e Classificação dos Tumores	36
População e amostra	37
Aspectos éticos	38
Análises de bioinformática.....	38
Identificação da expressão dos genes alvos	39
Extração de RNA total	39
Síntese de cDNA	40
Desenho dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>)	40
Amplificação por PCR em tempo real.....	43
Análise estatística	43
Local de realização do projeto	44
Fontes de financiamento	44
RESULTADOS.....	45
Caracterização das amostras estudadas	45
Análises dos níveis de mRNA do receptor de androgênios e suas isoformas	47
Correlações entre as variáveis estudadas.....	54

DISCUSSÃO	57
CONCLUSÃO	63
ANEXOS	67
Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	67
Anexo 2 - Carta de Aprovação do Projeto	69
Anexo 3 - Alinhamento das sequências de cDNA correspondentes aos genes do receptor de androgênios (AR) e suas isoformas	70

Lista de figuras

Figura 1: Prevalência da Hiperplasia Prostática Benigna (HPB).	19
Figura 2: Incidência mundial do câncer de próstata.	21
Figura 3: Mecanismo de ação dos androgênios.	23
Figura 4: Mecanismos associados com a manutenção da sinalização do AR.	26
Figura 5: Isoformas do AR.....	29
Figura 6. Expressão gênica do AR1/2.	47
Figura 7. Expressão gênica do AR4 em tecido prostático de pacientes com HPB e CaP.....	48
Figura 8 Gráfico representado a expressão gênica do AR4 nos pacientes com CaP que apresentaram recidiva bioquímica ou não.....	49
Figura 9. Expressão gênica do transcrito AR3/5/6 em tecido prostático de pacientes com HPB e CaP.....	50
Figura 10. Expressão gênica do transcrito AR5/6 em tecido prostático de pacientes com HPB e CaP.....	51
Figura 11 Razão entre a expressão gênica do AR3/5/6 e do AR 5/6 em tecido prostático de pacientes com HPB e CaP.	52
Figura 12. Expressão gênica do AR e de suas isoformas em HPB e CaP.	53

Lista de tabelas

Tabela 1: Ferramentas de bioinformática.	39
Tabela 2: <i>Primers</i> e sondas para RNAm do AR4, AR3/5/6 E AR5/6.	42
Tabela 3. Caracterização das amostras estudadas.....	46
Tabela 4. Correlação entre dados analisados em amostras de CaP.....	55
Tabela 5. Correlação entre os dados analisados em amostras de HPB.....	56

Lista de abreviaturas

AR	Receptor de Androgênios
AR1/2	Isoformas 1 e 2 do Receptor de Androgênios
AR3	Isoforma 3 do Receptor de Androgênios
AR4	Isoforma 4 do Receptor de Androgênios
AR5	Isoforma 5 do Receptor de Androgênios
AR6	Isoforma 6 do Receptor de Androgênios
AR5/6	Isoformas 5 e 6 do Receptor de Androgênios
AR3/5/6	Isoformas 3, 5 e 6 do Receptor de Androgênios
ARE	Elemento Responsivo aos Androgênios
AR-V	Variantes do Receptor de Androgênios
ASPic	<i>Alternative Splicing Prediction</i>
CaP	Câncer de Próstata
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	DNA Complementar
CE3	Éxon Crítico 3
CE4	Éxon Crítico 4
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Ct	Ciclo Limiar (<i>Threshold Cycle</i>)
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DSL	<i>Diagnostic Systems Laboratory Inc.</i>
DTT	Ditiotreitol
fase S	Fase de Síntese do Ciclo Celular
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

FIPE	Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos
GnRH	Hormônio Estimulador de Gonadotrofinas
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina-Eosina
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
HPS	Proteínas de Choque Térmico (<i>Heat Shock Proteins</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Quilo-Dalton
KLK3	<i>Kallikrein-Related Peptidase 3</i>
LaBiMET	Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral
LaGOM	Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia
LBD	Domínio de Ligação do Ligante
LHRH	Hormônio Liberador de Hormônios Luteinizantes
LNCaP	<i>Lymph Node Carcinoma of the Prostate</i>
MDV3100	Enzalutamida
MGB	<i>Minor Groove Binfder</i>
mRNA	RNA Mensageiro
NFQ	<i>Nonfluorescent Quencher</i>
NLS	Sinal de Localização Nuclear
NR	Receptores Nucleares
NTD	Domínio N-Terminal
protEST	Proteínas Relacionadas
PSA	Antígeno Prostático Específico
pTNM	Classificação Patológica de Tumores Malignos
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RTU	Ressecção Transuretral
SHBG	Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SRC	Coativador de Receptor Nuclear (<i>Nuclear Receptor Coactivator</i>)

SYBr	Corante Sybr Green I
T	Testosterona
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMPRSS2	<i>Transmembrane Protease Serine 2</i>
VCaP	<i>Vertebral-Cancer of the Prostate</i>

Resumo

O câncer de próstata (CaP) e a hiperplasia prostática benigna (HPB) são as doenças da próstata mais comuns, e ambas são alterações do controle do crescimento prostático, compartilhando uma prevalência aumentada com o avanço da idade. A deprivação androgênica é uma das opções de tratamento mais comuns para o CaP e, embora resulte em um período de regressão clínica, muitos pacientes acabam progredindo para uma condição refratária à terapia hormonal, conhecida como CaP independente de androgênios (resistente à castração). Alterações moleculares no receptor de androgênios (AR) têm sido associadas à progressão do CaP. Neste estudo, buscamos identificar a presença de isoformas do AR derivadas de *splicing* alternativo tanto em tecido benigno de HPB (n = 30) quanto em tecido maligno de CaP (n = 27). As isoformas estudadas foram o AR3, AR4, AR5 e AR6. A expressão gênica do AR não apresentou diferença entre os tecidos estudados ($P = 0,160$). O AR4 apresentou maior expressão nos pacientes com CaP ($P = 0,029$) e, dentre estes, os níveis de expressão foram maiores nos pacientes que apresentaram recidiva bioquímica ($P = 0,049$). Dada a similaridade entre as moléculas de cDNA das isoformas AR3, AR5 e AR6, diferentes estratégias de detecção do mRNA foram utilizadas. A amplificação conjunta do AR3, AR5 e AR6 (AR3/5/6) foi maior no grupo CaP ($P = 0,021$), enquanto que a expressão das isoformas AR5 e AR6 (AR5/6) não foi diferente entre os grupos ($P = 0,184$). Com o objetivo de inferir um valor para a expressão do AR3, também foi analisada a razão (AR3/5/6) / (AR5/6), que apresentou maiores níveis de expressão no grupo CaP em relação ao grupo HPB ($P < 0,0001$). Nas amostras de CaP, foi encontrada uma correlação positiva entre o escore de Gleason e os níveis de mRNA das isoformas AR5/6 (0,524; $P = 0,006$) e uma correlação negativa entre o escore de Gleason e a razão (AR3/5/6) / (AR5/6) (-0,429; $P = 0,029$). A expressão gênica do AR4 correlacionou-se positivamente com a expressão gênica das isoformas AR3/5/6 e AR5/6 (0,646; $P < 0,001$ e 0,518; $P = 0,006$). Nas amostras de HPB, foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão gênica do AR e os níveis plasmáticos de PSA pré-operatório (0,479; $P = 0,013$). Também foi encontrada uma correlação

positiva entre a expressão gênica do AR4 e a expressão gênica do AR3/5/6 (0,818; $P < 0,001$), do AR5/6 (0,387; $P = 0,035$) e a razão (AR3/5/6) / (AR5/6) (0,394; $P = 0,031$) nesse grupo. Embora em níveis diferentes, todas as isoformas estudadas foram expressas tanto em tecido benigno (HPB) quanto em tecido maligno (CaP). Desta forma, estes resultados permitem assumir que estas isoformas constitutivamente ativas estejam envolvidas no desenvolvimento destas doenças prostáticas. E, ainda, a expressão do AR4 pode ser associada com a recidiva do CaP após o tratamento cirúrgico.

Abstract

Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are the most common prostatic diseases and both are disorders in prostatic growth, whose prevalence increase with age. The androgen deprivation is one of the most common therapies for PCa, and, although there is a period of clinical remission, many patients occasionally progress to a condition refractory to hormone therapy, known as androgen-independent CaP (castration-resistant). Molecular changes in the androgen receptor (AR) have been associated with progression of PCa. This study aimed at identifying the presence of AR isoforms derived from alternative splicing both in benign tissue of BPH (n = 30) and in malignant tissue of PCa (n = 27). The isoforms studied were AR3, AR4, AR5 and AR6. AR gene expression did not differ between the studied groups (P = 0.160). AR4 showed higher expression in PCa patients (P = 0.029) and, among these, the expression levels were higher in patients with biochemical recurrence (P = 0.049). Given the similarity between the molecules of cDNA from AR3, AR5 and AR6, their detection was performed using a different strategy for mRNA amplification. The expression of AR3, AR5 and AR6 (AR3/5/6), together, was higher in PCa group (P = 0.021), while the expression of only AR5 and AR6 (AR5/6) was not different between the groups (P = 0.184). Aiming at inferring a value for the expression of AR3, it was also analyzed the ratio (AR3/5/6) / (AR5/6), which showed higher expression levels in PCa group compared to BPH group (P <0.001). In PCa samples, we found a positive correlation between the Gleason score and the levels of mRNA isoforms AR5/6 (0,524; P = 0,006), and a negative correlation between the Gleason score and the ratio (AR3/5/6) / (AR5/6) (-0.429, P = 0.029). AR4 gene expression was positively correlated with the expression of gene isoforms AR3/5/6 and AR5/6 (0.646, P < 0.001 and 0.518, P = 0.006) in this group. In the BPH group, we found a positive correlation between the gene expression of AR and plasmatic levels of preoperative PSA (0.479, P = 0.013). We also found a positive correlation between AR4 and AR3/5/6 gene expression (0.818, P = 0.0001), AR5/6 (0.387, P = 0.035) and the reason (AR3/5/6) / (AR5/6) (0.394, P = 0.031) in this group. Although at different levels, all investigated isoforms were expressed both

in benign tissue (BPH) and in malignant tissue (PCa). These results support the assumption that these constitutively active isoforms of AR are involved in the development of prostatic diseases. Furthermore, AR4 expression may be associated with recurrence after radical prostatectomy.

INTRODUÇÃO

As doenças da próstata, como a hiperplasia prostática benigna (HPB), o câncer de próstata (CaP) e a prostatite, são muito comuns na senescência. Entre a quarta e a nona década da vida, aproximadamente 90% dos homens desenvolvem HPB ou CaP (Chatterjee, 2003). As duas formas clinicamente mais importantes no crescimento anormal da próstata são a HPB e o CaP (Daneshgari and Crawford, 1993).

Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A HPB é considerada um fenômeno progressivo, definido como um crescimento contínuo da próstata resultante de um processo proliferativo não maligno (Bushman, 2009), ocorrendo ao redor da uretra, com um crescimento nodular localizado na zona de transição ou periuretral (Carson and Rittmaster, 2003; McNeal, 1990).

Esta alteração é a anormalidade proliferativa da próstata mais comum nos homens, está relacionada com a idade e é muito frequente no período de senescência (Silva Neto et al., 2008). Como se pode observar na figura 1a, a prevalência histológica de HPB é de aproximadamente 10% em homens com 30 anos, 20% em homens com 40 anos, entre 50 e 60% em homens com 60 anos e de 80 a 90% para homens com 70 a 80 anos (Berry et al., 1984; Carson and Rittmaster, 2003; Roehrborn and Rosen, 2008). Dados de Curkendall e colaboradores (2000), apresentados na Reunião da Associação Europeia de Urologia, obtidos da publicação de Kirby (2000), mostram que a HPB é tão prevalente quanto a Diabetes e a hipertensão (figura 1b) (Kirby, 2000). Na população brasileira, até o momento, não há dados de prevalência e/ou incidência.

Os sintomas do trato urinário inferior são muito comuns na HPB. Entre eles, estão fluxo urinário fraco, hesitação durante a micção, esforço para iniciar a micção,

noctúria e sensação de esvaziamento incompleto da bexiga após a micção (O'Leary et al., 2008). Histologicamente, a HPB consiste no crescimento excessivo do tecido epitelial e fibromuscular da zona de transição da área periuretral da glândula prostática. Quando o tecido fibromuscular é preponderante, os sintomas urinários são frequentemente irritativos (sintomas de armazenamento) ao invés de obstrutivos (sintomas de esvaziamento), e podem estar correlacionados ao grau de estimulação da musculatura lisa pela atividade do sistema nervoso simpático (McNeal, 1990).

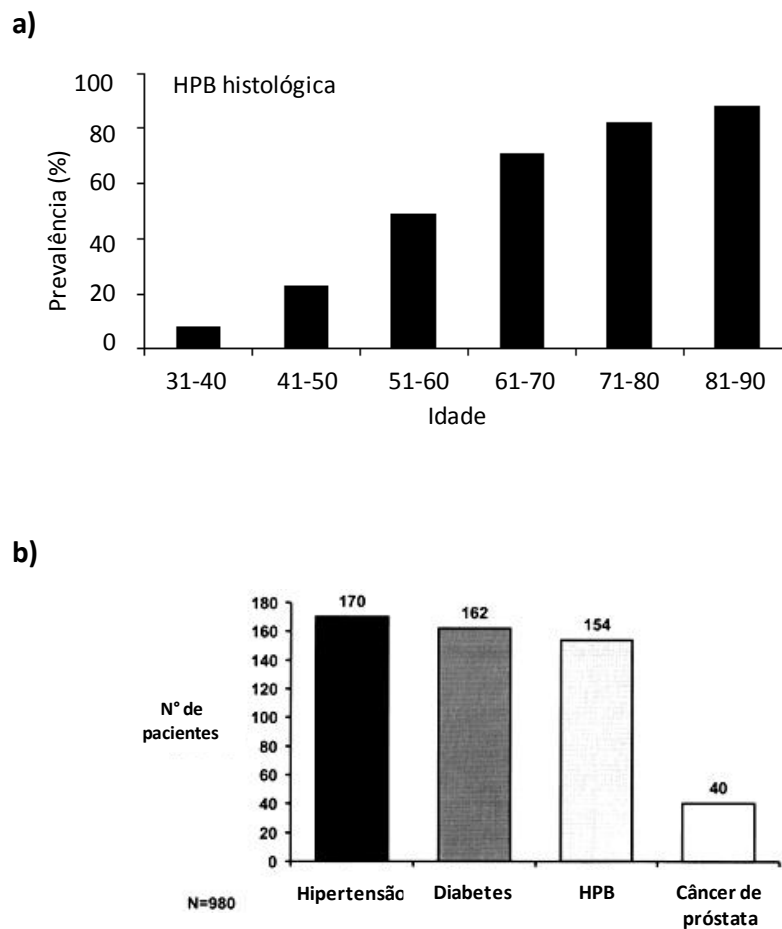


Figura 1. Prevalência da Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). 1a) Prevalência da HPB histológica em função da idade, adaptada de Berry e colaboradores (1984). 1b) Prevalência da HPB comparada à hipertensão e a diabetes, adaptada de Curkendall e colaboradores *in* (Kirby, 2000).

Câncer de próstata (CaP)

O CaP é a neoplasia mais comum em homens brasileiros, com estimativa prevista de 60.180 novos casos para o ano de 2012, o que corresponde a um risco estimado de 62 novos casos a cada 100 mil homens, ficando atrás somente dos cânceres de pele do tipo não melanoma. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os 5 tumores mais incidentes para sexo masculino serão, em 2012, o câncer de pele não melanoma (63 mil novos casos), o de próstata (60 mil), de pulmão (17 mil), de cólon e de reto (14 mil) e estômago (13 mil). Nas regiões Sudeste e Nordeste, o CaP é o mais incidente entre os homens (78 e 43 a cada 100 mil homens, respectivamente). Nas regiões Centro-Oeste (75/100 mil), Sul (68/100 mil) e Norte (30/100 mil), é o câncer mais frequente, atrás somente dos tumores de pele não melanoma (INCA, 2011).

Nos Estados Unidos, foram diagnosticados, no ano de 2009, aproximadamente 192.000 casos de CaP, e a expectativa de morte por CaP para o mesmo ano era de 27.000 homens (Wolf et al., 2010). Além disso, existe uma variação na incidência de CaP entre os grupos étnicos, que aparece aumentada em africanos, intermediária em caucasianos e inferior em asiáticos (Hsing et al., 2000).

A incidência e a mortalidade do CaP variam entre os países. De acordo com a organização Cancer Research UK, estimou-se que mais de 900 mil homens tenham sido diagnosticados com CaP no ano de 2010 em todo o mundo, sendo que mais de dois terços destes homens vivem em países desenvolvidos (Austrália, Europa, América do Norte). Esta grande diferença na incidência do CaP pode ser explicada principalmente pelo fato do *screening* (rastreamento) realizado com o PSA (antígeno prostático específico) e o exame de biópsia terem se tornado comuns nestas regiões.

Em seu desenvolvimento inicial, o CaP é assintomático; porém, com o crescimento, pode invadir a vesícula seminal, os ureteres e a base da bexiga, sendo também responsável por metástases ósseas, hepáticas, pulmonares e adrenais (Mazhar and Waxman, 2002).

A ablação androgênica resulta inicialmente na morte celular ou bloqueio do ciclo celular (Balk and Knudsen, 2008). Em 70 a 80% dos homens com CaP submetidos à terapia antiandrogênica, ocorre resposta favorável; porém, este efeito é transitório, com muitos pacientes vindo a desenvolver um crescimento independente de androgênios (Damber and Aus, 2008; Edwards et al., 2001). De acordo com Marcias (2010), após um período de 18 a 24 meses de deprivação androgênica eficaz, muitos pacientes desenvolvem um câncer independente de hormônio, e a terapia de escolha, além da quimioterapia, é o tratamento paliativo dos sintomas (Marcias et al., 2010).

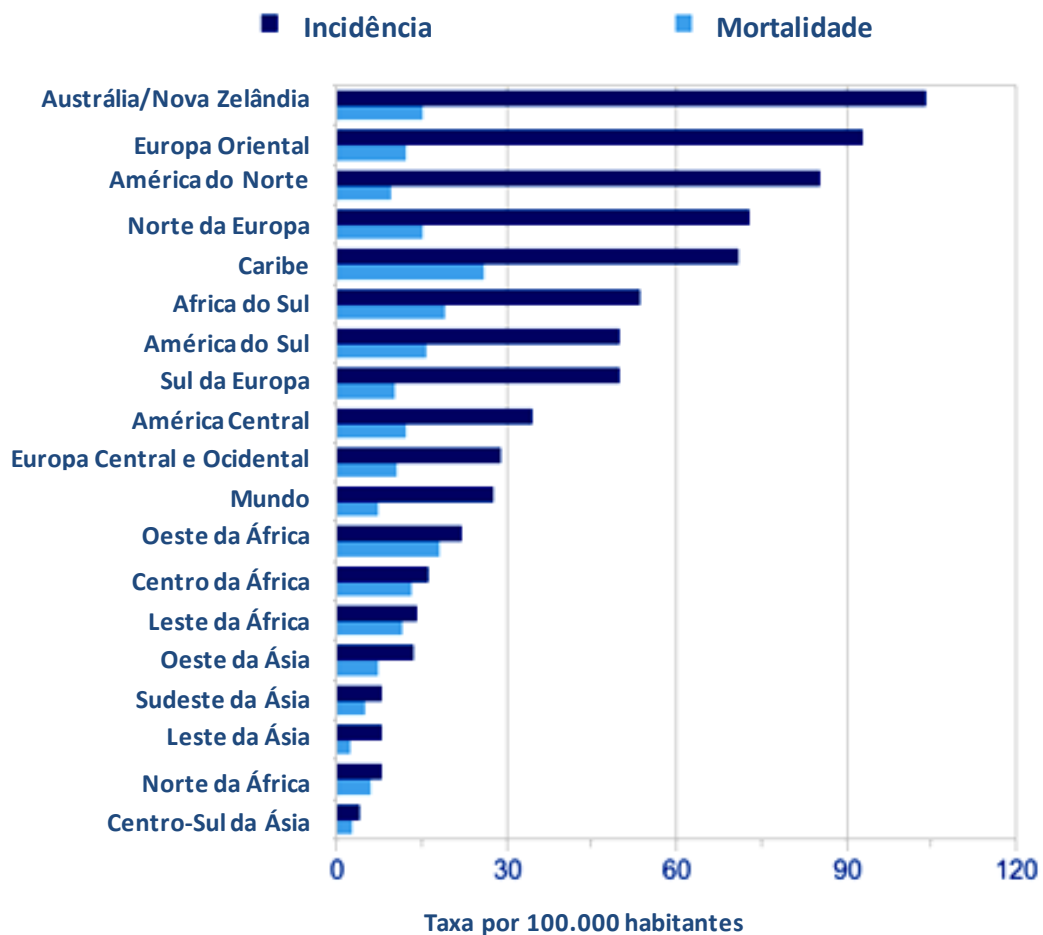


Figura 2. Incidência mundial do câncer de próstata. Incidência e a mortalidade por região mundial para o câncer de próstata a cada 100.000 homens (CancerResearchUK, 2011).

Androgênios

Testosterona, dihidrotestosterona (DHT), androstenediol e androstenediona são exemplos de androgênios (Dutt and Gao, 2009), hormônios esteroides que possuem papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e regulação do fenótipo e fisiologia reprodutiva masculina (Quigley et al., 1995); além disto, regulam o crescimento e a diferenciação da glândula prostática; desta forma, não é surpreendente que o crescimento do CaP seja estimulado pelos androgênios (Edwards et al., 2001).

No homem, a maior parte dos androgênios é produzida nos testículos e, em menor parte, na glândula suprarrenal, enquanto que seu metabolismo ocorre nos tecidos-alvo, como por exemplo, a próstata e a pele. Sua produção é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Ntais et al., 2003) e tem como molécula precursora o colesterol. Os androgênios exercem seus efeitos biológicos pela sua ligação com o AR, um membro da superfamília de receptores nucleares que agem como fatores de transcrição dependentes de ligante (Balk and Knudsen, 2008; Lu et al., 1997). No citoplasma da célula prostática, a testosterona é convertida, pela ação da enzima 5 α -redutase, ao hormônio ativo DHT, que é o ligante natural do AR mais potente, possuindo uma constante de dissociação (K_d) de 10^{-11} , enquanto que a testosterona possui uma $K_d = 10^{-9}$, e apresenta, assim, uma potência 100 vezes menor do que a DHT (Penning et al., 2008). Tanto a testosterona quanto a DHT ligam-se ao AR e promovem sua ativação (Cheng et al., 2010; Penning et al., 2008). O AR, em seu estado inativo, está normalmente associado a um complexo proteico composto por proteínas de choque térmico (HSP) e chaperonas. A ligação da DHT induz a dissociação das HSP, fosforilação, mudanças conformacionais e dimerização do AR (Ntais et al., 2003), que, então, é translocado para o núcleo da célula. O AR dimerizado liga-se a uma sequência específica do DNA, conhecida como elemento responsivo aos androgênios (ARE), onde irá regular (ativando ou inibindo) a transcrição gênica. Este é o mecanismo de ação clássico dos androgênios, onde há interação com genes alvos, tendo respostas consideradas lentas (Figura 3). É importante notar que células de câncer de próstata são

notavelmente dependentes do sinal do AR para sua proliferação e sobrevivência (Zegarra-Moro et al., 2002).

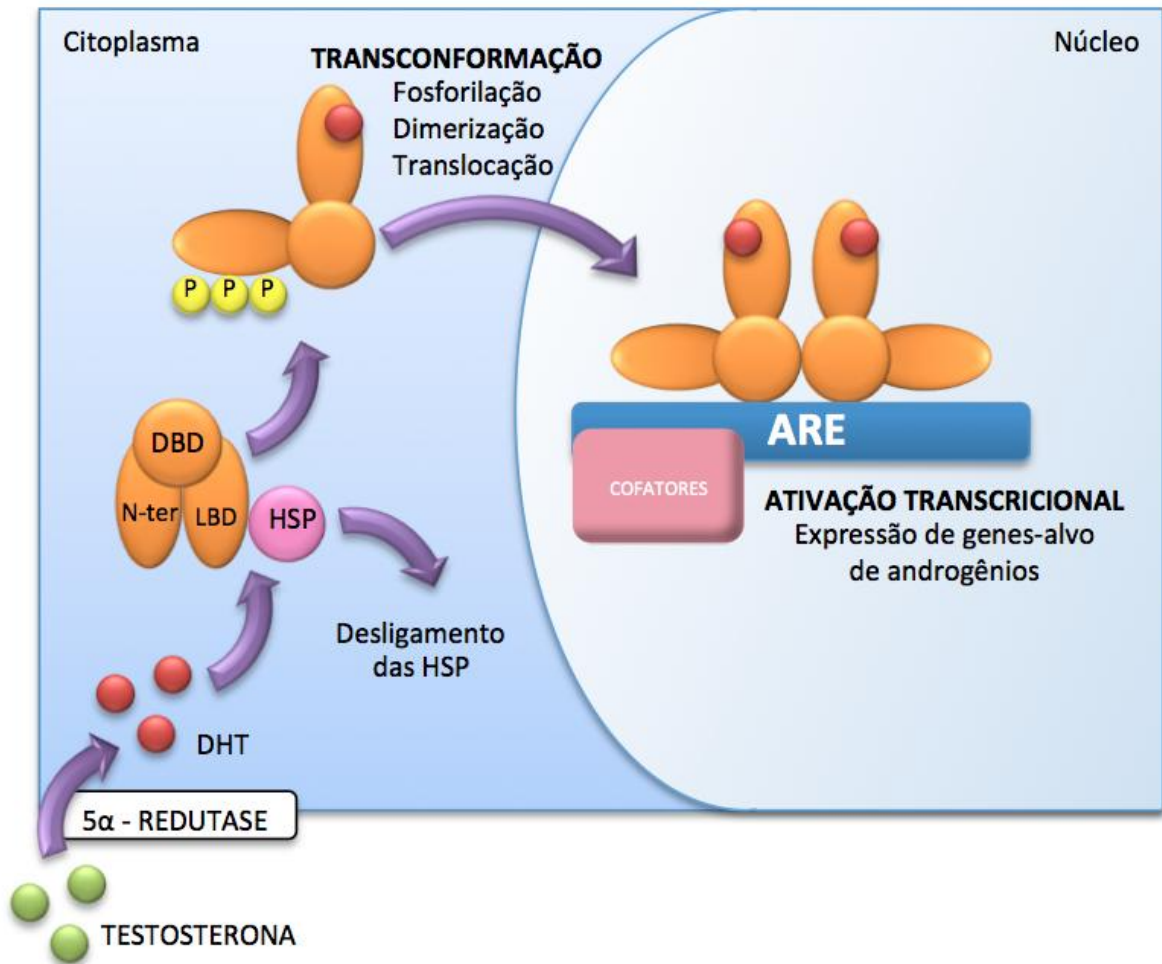


Figura 3. Mecanismo de ação dos androgênios. Demonstração esquemática da ação clássica dos androgênios (neste exemplo, utiliza-se a testosterona) na célula-alvo. Adaptada de (Gobinet et al., 2002)

Receptor de androgênios

O receptor de androgênios (AR) é uma proteína de 110 kDa que atua como fator transcricional dependente de ligante e pertence à superfamília de receptores nucleares (NR), possuindo papel fundamental na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo embriogênese, desenvolvimento e hemostasia (Gobinet et al., 2002).

Os NR são proteínas intercelulares que são ativadas por pequenas moléculas, como os hormônios esteroides, ácidos graxos e retinoides. Dependendo do tipo do ligante, os NR podem ser classificados em receptores de hormônios esteroides, receptores tireoideanos ou retinoides, ou, ainda, receptores órfãos (Nacusi and Tindall, 2009).

O gene do AR (GeneID: 367) está localizado no cromossomo X na posição q11-q12, tem tamanho aproximado de 90 kb, e possui 8 exons (NM_000044.2, NP_000035.2). A ativação do AR leva a eventos angiogênicos, proliferativos e apoptóticos. De acordo com um estudo anterior, um dos principais efeitos dos androgênios nas células que expressam o AR é um aumento da atividade de cinases dependentes de ciclina e estimulação para que as células entrem na fase S (fase de síntese) do ciclo celular, induzindo, assim, a proliferação celular (Ntais et al., 2003). Neste estudo, o receptor de androgênios será referido como AR1/2 (considerando as isoformas 1 e 2 deste gene, que são expressas no tecido normal, e apresentam os 8 exons característicos do gene).

Assim como outros participantes da superfamília dos receptores nucleares, a estrutura do AR é organizada em domínios funcionais. O domínio N-terminal (NTD), codificado pelo exon 1, constitui aproximadamente 60% da proteína do AR de 110 kDa (Hu et al., 2009), contém a região de ativação transcricional AF-1, essencial para a atividade da transativação do AR, e a região AF-5, que possui uma forte atividade constitutiva, está envolvida na ativação transcricional e pode participar do recrutamento de cofatores (Gobinet et al., 2002). Na região C-terminal, está contido o domínio de ligação ao ligante (LBD) que interage, funcionalmente, com fatores

intermediários e cofatores nucleares. O domínio de ligação ao DNA (DBD) medeia a interação do AR com o elemento responsivo aos androgênios (ARE) no DNA (Berrevoets et al., 1998) através de seus dois dedos de zinco altamente conservados. Há também uma pequena sequência de aminoácidos, chamada região *hinge*, ou de dobradura, que confere flexibilidade para o rearranjo apropriado, dimerização e interação específica ao DNA (Nacusi and Tindall, 2009).

Considerando que a ação dos androgênios é mediada pelo AR, Huggins e Hodges demonstraram pela primeira vez a associação entre os hormônios e o CaP. Esses autores observaram que, após a remoção dos androgênios (via castração ou administração de estrogênios) em pacientes com CaP, ocorria uma regressão do CaP (Huggins and Hodges, 1941; Huggins and Hodges, 2002). Desta forma, em estágios avançados de câncer, a abordagem terapêutica mais comum é a terapia de privação androgênica tanto por castração cirúrgica quanto por castração química (Casodex® – inibidor do AR por alterar sua estrutura – em combinação com leuprolida – inibidor da síntese de androgênios por ser um antagonista do GnRH (Hormônio Estimulador das Gonadotrofinas)). Porém, em muitos casos, o câncer evolui para um estágio não responsivo à terapia de privação hormonal, conhecido como câncer independente de androgênios. Nesta fase, a ativação do AR pode ocorrer independentemente da sua ligação ao hormônio (Grossmann et al., 2001; Nacusi and Tindall, 2009).

Apesar do sucesso da terapia de ablação androgênica para o CaP, a recorrência do tumor independente de androgênio é inevitável (Nacusi and Tindall, 2009). A próstata pode utilizar diferentes mecanismos para compensar a deficiência de androgênios causada pela terapia de ablação hormonal.

No CaP recorrente, esta compensação pode ser provocada por mutações com ganho de função do AR, devido a um aumento da afinidade à dihidrotestosterona ou a outros ligantes esteroides (Nacusi and Tindall, 2009), aumento da expressão do AR (Buchanan et al., 2001) ou de seus corretores (Feldman and Feldman, 2001), síntese intrácrina de androgênios pelas células do CaP (Locke et al., 2008; Titus et al., 2005) ou transativação do AR independente de

ligante por diferentes vias de sinalização (Grossmann et al., 2001). Segundo Sun e cols. (2010), o crescimento resistente à ablação androgênica pode ser atribuído a diferentes mecanismos que incluem a ativação do AR por fatores de crescimento, perda dos reguladores do ciclo celular e mutações genômicas no AR, permitindo a resposta a ligantes não específicos, como progesterona ou glicocorticoides (Sun et al., 2010). Embora a castração reduza os níveis plasmáticos de testosterona, os níveis intracelulares de testosterona mantêm-se suficientes para ativar o AR (Mohler et al., 2004). A figura 4 ilustra esquematicamente diversos mecanismos associados com a ativação do AR, que podem basear-se em: 1) mudanças nos níveis do(s) ligante(s) no tecido tumoral; 2) níveis aumentados da expressão proteica devido à alteração da expressão gênica ou expressão do mRNA; 3) mutações no receptor que afetam sua estrutura e função; 4) mudanças nas moléculas correguladoras (coativadoras ou correpessoras); 5) fatores que levam à ativação do receptor independentemente dos níveis do ligante ou do receptor possibilitando a ativação por moléculas cinase (Scher and Sawyers, 2005).

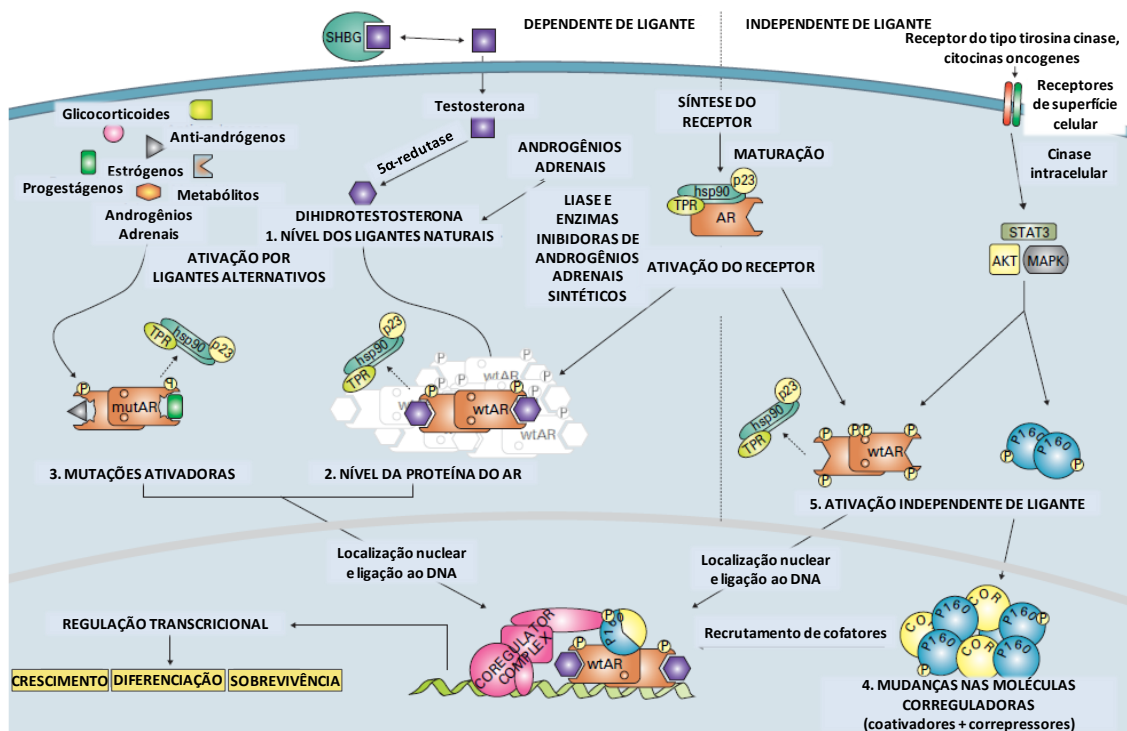


Figura 4. Mecanismos associados com a manutenção da sinalização do AR. Demonstração esquemática de diversos mecanismos que podem levar à ativação do AR, de maneira dependente ou não de ligante (Scher and Sawyers 2005).

Processo de *Splicing* Alternativo

O processo de *splicing* consiste na retirada de porções do transcrito primário de RNA (pré-mRNA) que não codificam aminoácidos, denominadas íntrons. Após, há a junção dos exons, que são segmentos de RNA codificantes (Lander et al., 2001). Na maioria dos casos, cada gene é composto por vários exons, e o processo de *splicing* pode ocorrer em diferentes posições no pré-mRNA. Nesse caso o que é considerado exon em um determinado evento de processamento pode ser considerado como íntron em outro, e vice-versa. Quando isto ocorre, diferentes moléculas de um mesmo pré-mRNA podem dar origem a diferentes isoformas de RNA, dependendo de como ocorreu o *splicing*. Esse processo, denominado *splicing* alternativo, permite maior variabilidade de mRNAs a partir de um único gene.

O processo de *splicing* alternativo explica, em grande parte, a disparidade numérica observada entre o número de genes codificantes (~ 21.000) e o número de proteínas (mais de 100.000) existentes em humanos, pois estima-se que mais de 60% dos genes humanos sofram *splicing* alternativo (Matlin et al., 2005). Assim, esse processo é reconhecido cada vez mais como um importante mecanismo na expansão de transcritos e complexidade proteica em eucariotos (Castrignano et al., 2006).

Diversas mutações no gene do AR têm sido descritas, muitas destas foram encontradas em tecidos derivados de CaP, sendo que há uma maior frequência naqueles pacientes que apresentam um estágio mais avançado da doença. Estas mutações estão reunidas num banco de dados chamado “The Androgen Receptor Mutations Database” (Gottlieb et al., 2012). De acordo com este banco de dados, já foram descritas 159 mutações no AR em amostras de CaP, sendo que a maioria destas (45%) ocorre no domínio de ligação ao ligante (LBD). O fator limitante é que, com algumas exceções, ainda não foram realizados experimentos para associar a presença destas mutações com o desenvolvimento do CaP (Gottlieb et al., 2012).

Isoformas do receptor de androgênios

Guo e colaboradores (2009) identificaram novas variantes do AR, nomeadas AR3, AR4, AR5 e AR6, decorrentes de *splicing* alternativo, que codificam uma proteína de tamanho similar, em torno de 80 kDa (Guo et al., 2009). Estas isoformas do AR contêm os domínios NTD e DBD intactos, porém perdem a região *hinge* e o domínio LBD, como ilustrado na Figura 5. Ainda, de acordo com Guo e cols. (2009), a expressão anormal destas variantes (AR-V) pode ser um mecanismo fundamental para a independência de androgênios na progressão tumoral (Guo et al., 2009).

A análise de uma série de amostras de tecido prostático humano tem demonstrado que a expressão das AR-V é diminuída na próstata normal e aumentada em amostras de CaP androgênio-independente. Especula-se que o surgimento destas variantes se deva à seleção de clones mais malignos ou resistentes à castração, ou, ainda, a uma regulação da sua expressão dependente de androgênios (Hu et al., 2009; Watson et al., 2010). Além disso, as AR-V parecem ser uma das causas primárias da resistência à castração e à terapia antiandrogênica convencional direcionada ao LBD, uma vez que estas AR-V perdem esta região, conferindo resistência à terapia com o antiandrogênio MDV3100 (Enzalutamida), que age através desta região (Li et al., 2013; Watson et al., 2010). A linhagem celular 22Rv1, que expressa as isoformas AR3 e AR4, apresenta um notável crescimento sob condições de castração, que não é afetado pelos antiandrogênios Enzalutamida e Bicalutamida, embora estes fármacos inibam a atividade do AR selvagem. De maneira interessante, quando realizado o *knockdown* das AR-V, houve uma redução do crescimento independente de androgênios e restauração do crescimento responsivo aos androgênios, o que restabeleceu a habilidade dos antiandrogênios de inibir o crescimento celular (Li et al., 2013).

Resultados de trabalhos prévios sugerem que a isoforma AR3 participa do desenvolvimento da resistência à ablação androgênica, e que esta isoforma parece ser mais ativa quando comparada às outras isoformas, AR4 e AR5 (Guo et al., 2009). Nesse mesmo trabalho, demonstrou-se que a atividade do AR3 não é controlada pela DHT ou antiandrogênios (Casodex®), sugerindo que esta isoforma

pode ser um fator transcricional independente de androgênios, e que o AR3 pode desempenhar um papel indispensável na promoção da proliferação das células cancerígenas, possivelmente pela regulação de diferentes tipos de genes alvos. Esses estudos indicam que alterações no AR são importantes para a progressão do CaP resistente à castração e podem conduzir a resistência às terapias que têm como alvo LBD, incluindo os inibidores de segunda geração, como acetato de abiraterona, enzalutamida e bicalutamida.

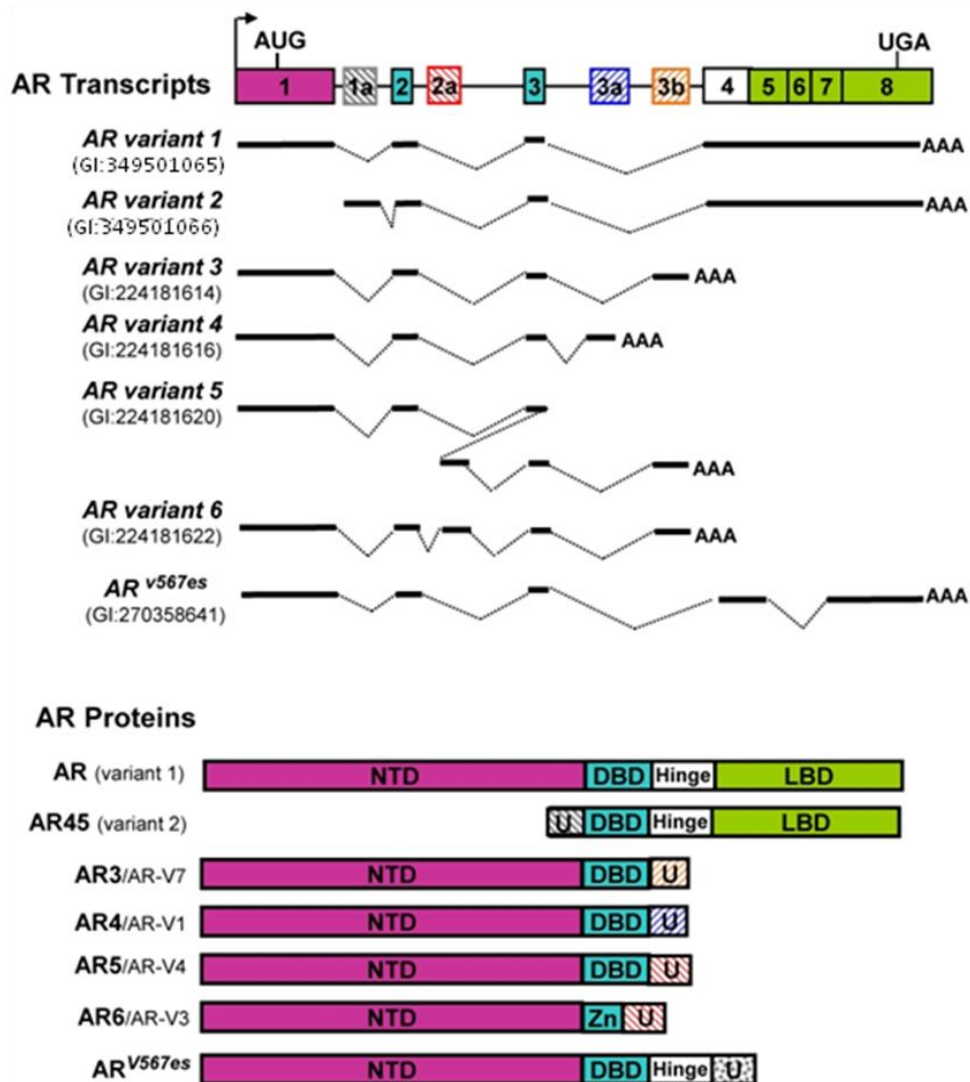


Figura 5. Isoformas do AR. Representação esquemática da estrutura molecular e proteica das isoformas do AR humano. No desenho dos transcritos, nos quadrados hachurados, os exons alternativos, e, em linhas contínuas, as sequências transcritas. Na representação das estruturas proteicas, em U as sequências únicas de cada isoforma. NTD: (*N-terminal domain*) domínio N-terminal. DBD: (*DNA-binding domain*) domínio de ligação ao DNA. LBD: (*ligand-binding domain*) domínio de ligação ao ligante. (Guo and Qiu, 2011).

De maneira muito interessante, de acordo com a literatura, as AR-V não são expressas no epitélio prostático normal, e raramente estão expressas em níveis substanciais no CaP primário (Sun et al., 2010). Embora a ablação androgênica reduza os níveis plasmáticos de androgênios, seus níveis intraprostáticos permanecem elevados (Mohler et al., 2004), podendo, ainda, haver a síntese intrácina de testosterona (Locke et al., 2008). Estes achados sugerem que existem mecanismos alternativos que mantêm a atividade do AR em situações de ablação androgênica (Sun et al., 2010), o que, de acordo com Watson e colaboradores (2010), pode ser devido à presença das AR-V (Watson et al., 2010).

Embora as AR-V permaneçam ativas mesmo na ausência de hormônios, sua origem e relevância biológica permanecem incertas (Nacusi and Tindall, 2009). O mecanismo de *splicing* alternativo é o mais aceito entre diversos autores (Guo et al., 2009; Hu et al., 2009; Marcias et al., 2010; Nacusi and Tindall, 2009). Dados de Watson e cols (2010) sugerem que as variantes do AR sejam geradas por erros de *splicing* que ocorrem em tecidos normais e tumorais. Assim, os níveis das isoformas seriam dependentes dos níveis de AR total, e mutações de ponto afetariam o sítio de reconhecimento, podendo favorecer a produção de certas variantes (Watson et al., 2010). Independente de qual seja o mecanismo, a relação funcional entre as isoformas e o AR total levanta questões sobre o repertório de genes-alvo do AR (Watson et al., 2010). Uma possibilidade é que as AR-V simplesmente mimetizem a ação dos hormônios androgênios, e ativem um conjunto idêntico de genes-alvo do AR (Watson et al., 2010). No entanto, análises do transcriptoma após *knockdown* seletivo do AR total ou de AR-V revelaram subconjuntos distintos de genes regulados pelas variantes, pelo AR total ou ambos. Mesmo entre genes-alvo clássicos do AR, dados mostraram diferentes níveis de expressão dependentes do gene em particular e da isoforma presente, fornecendo evidências que a biologia das variantes não é inteiramente sinônima àquela estimulada pelo AR total (Watson et al., 2010). Embora os níveis de expressão das AR-V sejam inferiores aos do AR total, algumas variantes são constitutivamente ativas e sua supressão resulta na diminuição da proliferação em linhagens celulares de CaP (Guo et al., 2009).

Ao estudar a expressão de genes-alvo das variantes, foi visto que a presença ou a ausência do AR não altera o perfil de expressão dos genes-alvo das AR-V, mostrando que a atividade das variantes independe do AR total. Além disto, após a supressão do AR, ocorre um aumento da expressão das AR-V (Hu et al., 2012), embora outros autores sugiram que a atividade das AR-V requeira a presença do AR (Watson et al., 2010). Para demonstrar esta independência das AR-V do AR, Hu e cols (2012) utilizaram clones de LNCaP e CWR22Rv1 com e sem a expressão da proteína do AR, que foram transfectados com AR-V (AR3 e AR-V567es) em condições de deprivação androgênica. Nesses experimentos, foi observado que quando é realizada uma superexpressão do AR, não ocorre aumento da expressão dos genes de ciclo celular, demonstrando que o AR não tem influência sobre a indução da expressão destes genes realizada pelas AR-V. Estes achados podem vir a explicar o motivo pelo qual a inibição do AR resulta em supressão do crescimento tumoral em alguns tipos de CaP resistentes à castração, enquanto que em outros não, sugerindo que o suporte ao crescimento independente à castração é fornecido pelas AR-V ao invés do AR (Hu et al., 2012).

Diversos autores (Hu et al., 2009; Marcias et al., 2010; Nacusi and Tindall, 2009; Sun et al., 2010) têm realizado análises de expressão gênica em linhagens celulares de câncer de próstata também por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa), porém pouco se encontra na literatura sobre a análise em tecido prostático coletado de pacientes submetidos à remoção cirúrgica. Watson e cols. (2010), ao analisarem a expressão do AR e das AR-V em cultura celular das linhagens VCaP e LUCaP35, verificaram que a expressão das isoformas ocorre concomitantemente à expressão do AR, porém, as isoformas são expressas em níveis inferiores ao AR total (0,1-2,5%) (Watson et al., 2010). Hu e cols. (2009), ao analisarem a expressão de AR3 e AR4 em tecido prostático pelas técnicas de PCR semiquantitativo, PCR quantitativo (qPCR), sequenciamento e cultura celular com transfecção, também observaram uma expressão das isoformas do AR em níveis menores em relação ao AR (Hu et al., 2009). Nas amostras de CaP resistentes à ablação androgênica, os níveis de expressão das AR-V são significativamente maiores do que amostras de CaP primário, sendo associado a um pior desfecho

clínico (Guo et al., 2009; Hu et al., 2009). De maneira interessante, a expressão aumentada das AR-V tem sido associada a uma maior recorrência da doença após a prostatectomia radical quando comparada com pacientes com baixa expressão das AR-V (Hu et al., 2009). Pacientes que possuem a expressão destas isoformas do AR provavelmente não terão benefícios com as terapias anti-androgênicas (Hornberg et al., 2011). Ainda, de acordo com Hornberg (2011), metástases ósseas de CaP resistentes à castração expressam proteínas do AR sem a região LBD em níveis comparáveis à expressão da proteína do AR total, mesmo quando o nível do mRNA das isoformas é bastante menor do que o do AR total (Hornberg et al., 2011).

Hipóteses

As hipóteses deste estudo são:

- Os tecidos oriundos de CaP e HPB expressam variantes do AR.
- O CaP expressa isoformas do AR em níveis diferentes da HPB.
- A expressão diferencial destas isoformas pode estar associada à agressividade tumoral.

Objetivos

Objetivos gerais

Identificar a presença das isoformas do AR (AR3, AR4, AR5 e AR6) no tecido prostático proveniente de pacientes com HPB ou CaP, e avaliar a possível associação dessas variantes do AR com a agressividade do tumor e a recidiva bioquímica.

Objetivos específicos

- Realizar o desenho de oligonucleotídeos (*primers*) e sondas capazes de detectar as diferentes isoformas do receptor de androgênios.
- Comparar a expressão das isoformas AR3, AR4, AR5 e AR6 do receptor de androgênios (AR) no tecido prostático de HPB e carcinoma.
- Analisar a possível associação entre a presença de cada isoforma do receptor de androgênios com a idade de desenvolvimento da HPB ou do CaP, com os níveis séricos de PSA e com o estadiamento tumoral do CaP.

Materiais e métodos

Delineamento do estudo

Estudo transversal.

Critérios de inclusão e exclusão

Para o grupo CaP, foram selecionados 27 pacientes provenientes do serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com idade entre 40 e 85 anos, com diagnóstico de câncer de próstata, que não haviam recebido hormonioterapia ou quimioterapia, e que não possuíam diagnóstico de outra neoplasia concomitante e submetidos à cirurgia de CaP no HCPA.

Para o grupo HPB, foram selecionados 30 pacientes com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna, com volume prostático medido por ecografia abdominal acima de 30 g, toque retal sem suspeita de neoplasia, que não estivessem em tratamento com inibidores da 5 α -redutase, e que não possuíssem diagnóstico de neoplasia concomitante, em acompanhamento no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e submetidos à cirurgia para HPB no HCPA.

Coleta das amostras de tecido prostático

Durante as cirurgias de Prostatovesiculectomia e Prostatectomia Radical para a retirada do tumor maligno, a próstata foi fatiada pelo urologista para detectar o nódulo tumoral. Depois de localizado, o nódulo tumoral foi retirado e dividido em duas partes. Um fragmento foi enviado para o Serviço de Patologia a fim de confirmar ou não o câncer de próstata, e o outro fragmento foi armazenado em um

criotubo plástico de 2,0 mL, imediatamente congelado em N₂ líquido para transporte ao laboratório, sendo armazenado em freezer -80°C.

Na cirurgia de Prostatectomia para a retirada da hiperplasia prostática benigna, pequenos fragmentos da próstata foram cortados, após a retirada do espécime cirúrgico, em campo limpo, e colocados em 2 criotubos de 2,0 mL. Em seguida, os criotubos foram armazenados em N₂ líquido para transporte ao laboratório, e foram armazenados em freezer -80°C.

Na Ressecção Transuretral para retirada da hiperplasia prostática benigna, pequenos fragmentos prostáticos foram coletados e armazenados em 2 criotubos de 2,0 mL. Logo em seguida, foram armazenados em N₂ líquido para transporte ao laboratório e, em seguida, armazenados em freezer -80°C.

Exame Anatomopatológico e Classificação dos Tumores

O exame anatomopatológico dos espécimes cirúrgicos e a confirmação da presença ou ausência de tecido tumoral nas amostras de tecido foram realizados por microscopia óptica pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) pelo Serviço de Patologia do HCPA.

A classificação histológica da agressividade tumoral seguiu o escore desenvolvido por Gleason em 1974, que se baseia no grau da perda da arquitetura normal do tecido tumoral (forma, tamanho e diferenciação das glândulas). A classificação leva em conta o grau de Gleason e o escore de Gleason. O escore de Gleason é a soma do grau primário (representando a maior parte do tumor) e do grau secundário (relacionado à menor parte 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, 2001). A classificação segundo este escore foi feita pelo Serviço de Patologia do HCPA.

O estadiamento patológico, pTNM, foi avaliado de acordo com o resultado do exame anatomopatológico do espécime cirúrgico conforme a escala de classificação internacional de tumores (Sobin and Wittekind, 2002), onde pT, pN e pM correspondem, respectivamente, à T (extensão do tumor primário), N (ausência ou presença e extensão de metástase em linfonodos regionais) e M (ausência ou presença de metástase à distância).

População e amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado nos resultados de expressão gênica de Guo et al. (2009), considerando-se um poder de 90%, nível de significância de 0,05 e diferença entre médias de 0,5, considerando a expressão gênica da variante AR3 (Guo et al., 2009). O tamanho amostral calculado foi de 30 pacientes para o grupo CaP e 30 pacientes para o grupo HPB. A população em estudo foi constituída de pacientes masculinos com diagnóstico de HPB ou CaP. Foi obtido tecido prostático de pacientes submetidos à ressecção transuretral (RTU) de próstata ou prostatectomia aberta por diagnóstico de HPB e prostatectomia radical ou prostatovesiculectomia por diagnóstico de CaP, procedimentos estes realizados no HCPA.

Todos os pacientes foram consultados sobre a utilização do material para o estudo, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

Os dados referentes às variáveis idade, PSA pré-operatório, escore de Gleason, peso da peça cirúrgica e recidiva bioquímica foram obtidas dos registros do HCPA.

Aspectos éticos

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e aprovado em seus aspectos éticos e científicos, sob o número 12-0320.

O tecido prostático utilizado neste trabalho foi proveniente de material de descarte de pacientes submetidos à RTU de próstata, prostatectomia aberta, prostatectomia radical ou prostatovesiculectomia. Aos pacientes, foi garantido sigilo quanto às informações obtidas e seu uso foi absolutamente restrito para fins de pesquisa científica.

Não foi oferecido aconselhamento genético, pois, até o momento, não existem evidências que levem à mudança do manejo dos pacientes quanto à presença de isoformas do gene estudado, e nem para que se faça uma abordagem diagnóstica diferente para pessoas saudáveis que apresentem tal isoforma.

Análises de bioinformática

Foi realizada uma comparação por meio de alinhamento de sequências de todas as isoformas descritas no banco de dados *online* UniGene a fim de verificar sequências únicas nas isoformas em estudo que facilitem sua posterior identificação. A tabela abaixo descreve outras ferramentas que foram utilizadas neste estudo, que serão citadas quando conveniente.

Tabela 1. Ferramentas de bioinformática. Lista com as diversas ferramentas de bioinformática que foram utilizadas neste estudo.

Nome	Descrição	Referência
<i>UniGene</i>	Identifica computacionalmente transcritos do mesmo <i>locus</i> ; analisa a expressão por tecido, idade e estado de saúde; relata as proteínas relacionadas (protEST) e recursos de clonagem.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/
<i>Ensembl</i>	Possui banco de dados genômicos para diversas espécies.	http://www.ensembl.org/index.html
<i>Clustal W</i>	Permite o alinhamento de sequências múltiplas de DNA ou proteínas.	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
<i>RNAfold</i>	Prediz as estruturas secundárias de fitas simples de RNA ou sequências de DNA.	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi

Identificação da expressão dos genes alvos

Extração de RNA total

Foi realizada extração de RNA total a partir de 0,2 g de tecido de cada amostra utilizando o reagente TRIzol® segundo o protocolo do fabricante. Após a extração de RNA, foi realizada a purificação do RNA utilizando o sistema PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion by Life Technologies). 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

absorbâncias a 260 e 280 nm foi superior a 1,6, e a quantidade de RNA foi calculada a partir da absorbância a 260 nm ($[RNA] = A_{260} \times \text{diluição} \times 40 \mu\text{g/mL}$).

Síntese de cDNA

Foi realizada a síntese do cDNA a partir de 1 μg de RNA total utilizando o conjunto de reagentes específicos Super Script III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies). Após a desnaturação do RNA com Oligo(dT) e dNTPmix 10 mM a 65°C por 5 minutos, foi adicionada uma mistura de Tris-HCl 200 mM (pH 8.4) mais KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, ditioneitol (DTT) 0.1 M, 40 U de RNaseOUT e 50 U de transcriptase reversa (SuperScript III) em cada amostra, que foi incubada a 50°C por 5 minutos. A mistura foi aquecida a 85°C por 5 minutos a fim de interromper a reação, centrifugada e refrigerada em gelo. Posteriormente, cerca de 2 U de *E. coli* RNase (RNase H) foram adicionadas à mistura, que foi incubada a 37°C por 20 minutos a fim de eliminar o RNA remanescente. A reação teve um volume final de 21 μL , e foi estocada a -20°C antes de ser utilizada para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Desenho dos oligonucleotídeos (primers)

Foram realizadas análises de bioinformática com ferramentas disponíveis *on line* para o desenho dos *primers* e sondas que foram utilizados para amplificação dos transcritos do AR e das isoformas AR3, AR4, AR5 e AR6 por qPCR. Para amplificação do gene do receptor de androgênios total (AR), foi utilizado o ensaio Hs00171172_m1 (Life Technologies), e o gene de referência utilizado foi a beta-2microglobulina ($\beta 2m$), ensaio Hs00984230_m1 (Life Technologies). Este ensaio para o AR não amplifica nenhuma das isoformas em estudo, sendo específico para os transcritos 1 (GI:349501065) e 2 (GI:349501066) deste gene, que são correspondentes ao AR completo, contendo 8 exons. Para o desenho dos oligonucleotídeos e sonda específicos para as isoformas, foram utilizadas as sequências de mRNA descritas por Guo, disponíveis no UniGene sob as identificações FJ235916.1(AR3), FJ235917.1 (AR4), FJ235919.1 (AR5) e

FJ235920.1 (AR6) (Guo et al., 2009). Estas sequências foram alinhadas com a ferramenta ClustalW a fim de identificar as regiões mais específicas de cada isoforma para posterior desenho dos *primers* e sondas (anexo 2). Estudos prévios têm apresentado dados ditos específicos para as isoformas; entretanto, os conjuntos de oligonucleotídeos usados, que no caso do AR3 anelam no exon 3b, não possibilitam a amplificação de um fragmento específico, uma vez que este exon também é compartilhado pelas isoformas AR5 e AR6 (Guo et al., 2009), - locais de anelamento demonstrados no alinhamento das sequências. Como se pode observar no alinhamento em anexo (anexo 2), existe uma grande similaridade entre as sequências de cDNA das isoformas AR3, AR5 e AR6, o que impossibilita o desenho de ensaios específicos para cada isoforma, ou seja, que as detectem de maneira isolada. Dessa forma, optou-se por uma abordagem que consiste na amplificação das isoformas em conjunto. Assim, foram desenhados ensaios para amplificação dos transcritos AR3, AR5 e AR6 em conjunto e dos transcritos AR5 e AR6, que foram chamados de AR3/5/6 e AR5/6, respectivamente. A fim de inferir um valor para a expressão do AR3, optou-se pela razão entre as expressões $(AR3/5/6) / (AR5/6)$, que se admitiu corresponder aos níveis de expressão do AR3. Para a isoforma 4, foi possível desenhar um ensaio específico. As sequências, tamanho de fragmento e marcação estão listados na tabela 2. Os *primers* e sondas de cada um dos ensaios foram sintetizados pela LifeTechnologies e estão identificados no alinhamento das sequências (anexo 2), e as análises de suas estruturas secundárias e parâmetros energéticos são mostrados no anexo 3.

Tabela 2: *Primers* e sondas para mRNA do AR4, AR3/5/6 E AR5/6. Oligonucleotídeos sense e antisense e sonda. Para a amplificação dos transcritos do AR e da β 2m, foram utilizados ensaios inventoriados da empresa LifeTechnologies.

AR4	
SENSE	5' - AGGGTGTGGAGTCTCAGA - 3'
ANTISENSE	5' - CCAGGAATGAATCATCTACAAA - 3'
SONDA	5' - TTCCTTAAAGACTACCTTCAGACTC - 3' (VIC)
Tamanho do Fragmento	106 pb
AR5/6	
SENSE	5' - GACACTAACCCCAAGCCATAC - 3'
ANTISENSE	5' - ACTGTCTGATGTTGCTCTGTG - 3'
SONDA	5' - TTGTTTTCTGTCAGTCCCATTGGTGC - 3' (VIC)
Tamanho do Fragmento	182 pb
AR3/5/6	
SENSE	5' - CTCTTGATTGCTGACTCCCTC - 3'
ANTISENSE	5' - ACAACTACATGAGTGGTAACCA - 3'
SONDA	5' - AGGTAGGAAAACACTATTGGTCCCGC - 3'(VIC)
Tamanho do Fragmento	108 pb
AR1/2 *	
* vide ensaio Hs_00171172 (LifeTechnologies)	

Amplificação por PCR em tempo real

A análise molecular foi realizada através da PCR em Tempo Real, com sistema de detecção de sondas Taqman® (Applied Biosystems). Os ensaios de expressão gênica TaqMan® (*Gene Expression Assays*) consistem em um par de *primers* não marcados e uma sonda TaqMan® com marcação FAM™ ou VIC® na extremidade 5' e MGB (*minor groove binder*) e NFQ (*nonfluorescent quencher*) na extremidade 3'. Este ensaio é baseado na atividade 5' nuclease da enzima *Taq* DNA polymerase. O equipamento utilizado foi o PCR real time StepOne Plus (Applied Biosystems).

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, e 50 ciclos continuando a desnaturação em 94°C por 50 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Uma curva-padrão com 5 pontos em replicata com concentração conhecida de cDNA foi utilizada para quantificar as amostras (quantificação relativa). Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar (*threshold cycle* (Ct)), onde o aumento do sinal fluorescente foi associado com um aumento exponencial do produto da qPCR que pôde ser detectado.

Análise estatística

A análise da expressão dos transcritos AR1/2, AR4 e a razão (AR3/5/6) / (AR5/6) foi realizada pelo teste *U* de Mann-Whitney, considerando sua distribuição não paramétrica.

Devido à impossibilidade de avaliar a expressão do transcrito AR3 de maneira separada do AR5 e do AR6, optou-se por utilizar o método de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE), considerando a distribuição não paramétrica e a dependência das quantificações dos transcritos AR3, AR5 e AR6. No teste de

GEE, foi utilizada a distribuição gama com função de ligação logarítmica, e a matriz de correlação empregada foi a não estruturada. Em seguida, foi utilizado o teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

Para verificar a associação entre os resultados de expressão gênica das isoformas e as demais variáveis estudadas, foi utilizada a correlação de Spearman. A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$. A análise estatística foi realizada com a utilização do programa SPSS 18.0.

Local de realização do projeto

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, do Departamento de Fisiologia, UFRGS e no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, no Centro de Pesquisa no HCPA, que dispõem da infraestrutura para a execução dos procedimentos utilizados neste projeto.

Fontes de financiamento

Este projeto foi submetido a agências de fomento para obtenção de recursos financeiros - FINE-HCPA, CNPq, CAPES e FAPERGS.

Resultados

Caracterização das amostras estudadas

As principais características das amostras estudadas são apresentadas na tabela 3. A média de idade (apresentada como média (mínimo - máximo)) entre os grupos foi semelhante, 64,28 (45 - 76) anos para o grupo CaP e 64,20 (49 - 81) para o grupo HPB ($P= 0,966$). A mediana (percentil 25 - 75) da dosagem sérica de PSA pré-operatório foi de 8,0 (5,6 - 11,9) ng/dL no grupo CaP e de 4,42 (2,5 - 8,9) ng/dL no grupo HPB, sendo maior no grupo CaP quando comparada ao grupo HPB ($*P=0,003$). As características peso da próstata, escore de Gleason e estadiamento tumoral foram avaliadas somente no grupo CaP, onde o peso da próstata, que foi aferido pelo patologista, apresentou média de 44,52 g, variando de 26 a 132 g. Das 25 amostras de CaP, 8 (32,0 %) apresentaram escore de Gleason ≤ 6 , e 17 (68,0 %) apresentaram escore de Gleason > 6 . Quanto ao estadiamento (pTNM), 16 (64,0 %) foram classificadas como T2, e 9 (36,0 %) foram classificadas como T3, sendo que nenhuma das 27 amostras de CaP foi classificada como estadiamento T4. Sete pacientes (28,0 %) apresentaram recidiva bioquímica, e, até o momento, 18 (72,0 %) pacientes não apresentaram recidiva bioquímica (acompanhados pelo menos 6 meses após a cirurgia).

Tabela 3. Caracterização das amostras estudadas. ^a dados não avaliados para as amostras de HPB. ^b dados apresentados em número de amostra (%). [§] Teste t. [&] Teste de Mann-Whitney.

	Cap (n= 25)	HPB (n= 30)	Valor-P
Idade (média (mínimo - máximo))	64,3 (45 - 76)	64,2 (49 - 81)	0,966 [§]
PSA pré-operatório (ng/dL) - mediana (percentil 25 - 75)	8,0 (5,6 - 11,9)	4,4 (2,5 - 8,9)	0,003 ^{&}
Peso da peça cirúrgica (g) ^a	39,0 (26,0 - 132,0)	-	n/a
Escore de Gleason ^{a, b}		-	n/a
≤ Gleason 6	8 (32,0 %)		
> Gleason 6	17 (68,0 %)		
Estadiamento (pTNM) ^a		-	n/a
T2	16 (64,0%)		
T3	9 (36,0%)		
Recidiva bioquímica ^a		-	n/a
Sim	7 (28,0%)		
Não	18 (72,0%)		

Análises dos níveis de mRNA do receptor de androgênios e suas isoformas

Para a análise de expressão gênica do AR e de suas isoformas (AR3, AR4, AR 5 e AR6), o cDNA de 30 amostras de HPB e 25 amostras de CaP foi examinado. A expressão tecidual dos mRNAs do AR e de suas isoformas foi quantificada por qPCR.

A expressão gênica [mediana [(percentil 25% - 75%) unidades arbitrárias] do transcrito AR1/2 foi de 0,88 (0,65 - 1,39) no grupo HPB e 0,72 (0,39 - 1,55) no grupo CaP, não apresentando diferença entre os grupos ($P= 0,331$) (figura 6).

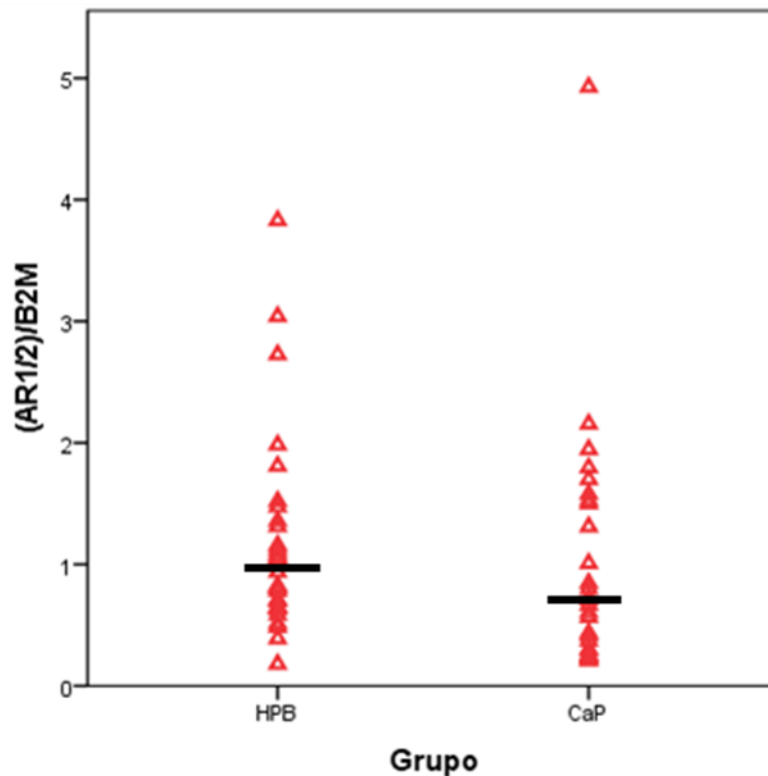


Figura 6. Expressão gênica do AR1/2 em tecido prostático de pacientes com HPB e CaP. Cada ponto representa um paciente. As barras indicam a mediana da expressão gênica (HPB = 0,87; CaP = 0,72). $P= 0,331$.

A expressão gênica do AR4 (figura 7) foi de 1,17 (0,68 - 2,34) no grupo HPB e 1,59 (1,23 - 4,19) no grupo CaP, sendo maior no grupo CaP em relação ao grupo HPB (* $P= 0,041$).

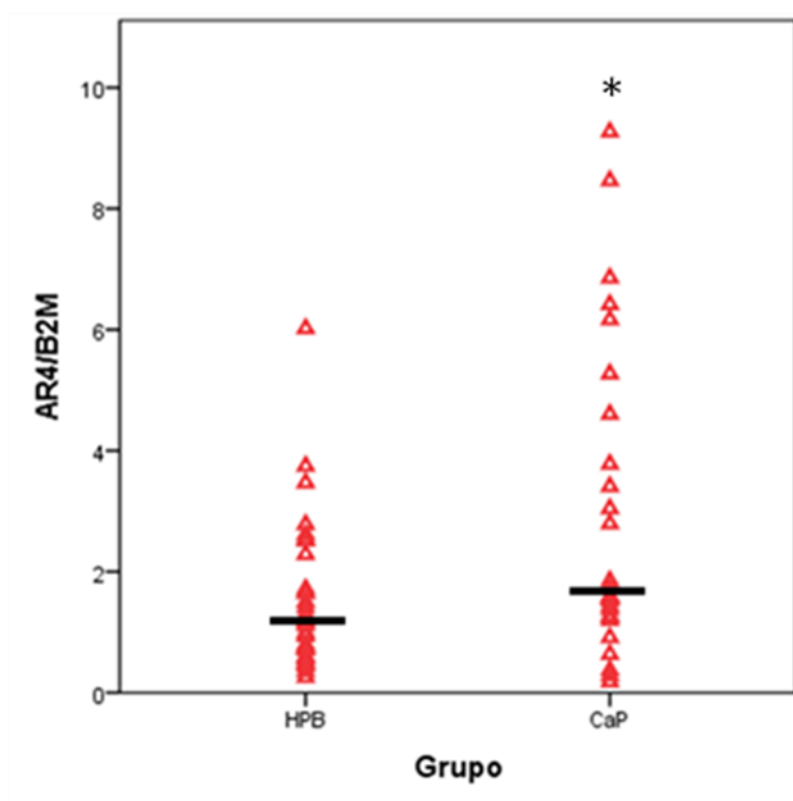


Figura 7. Expressão gênica do AR4 em tecido prostático de pacientes com HPB e CaP. Cada ponto representa um paciente. As barras indicam a mediana da expressão gênica (HPB = 1,17; CaP = 1,59). * $P= 0,041$.

Quando foi considerada a variável recidiva bioquímica entre os pacientes com CaP, a expressão do AR4 foi maior nos pacientes que apresentaram recidiva (n = 6) (4,00 [2,45 - 7,13]), do que naqueles pacientes que não apresentaram recidiva (n = 21) (1,56 [1,06 - 3,41]) (* $P=0,049$) (figura 8).

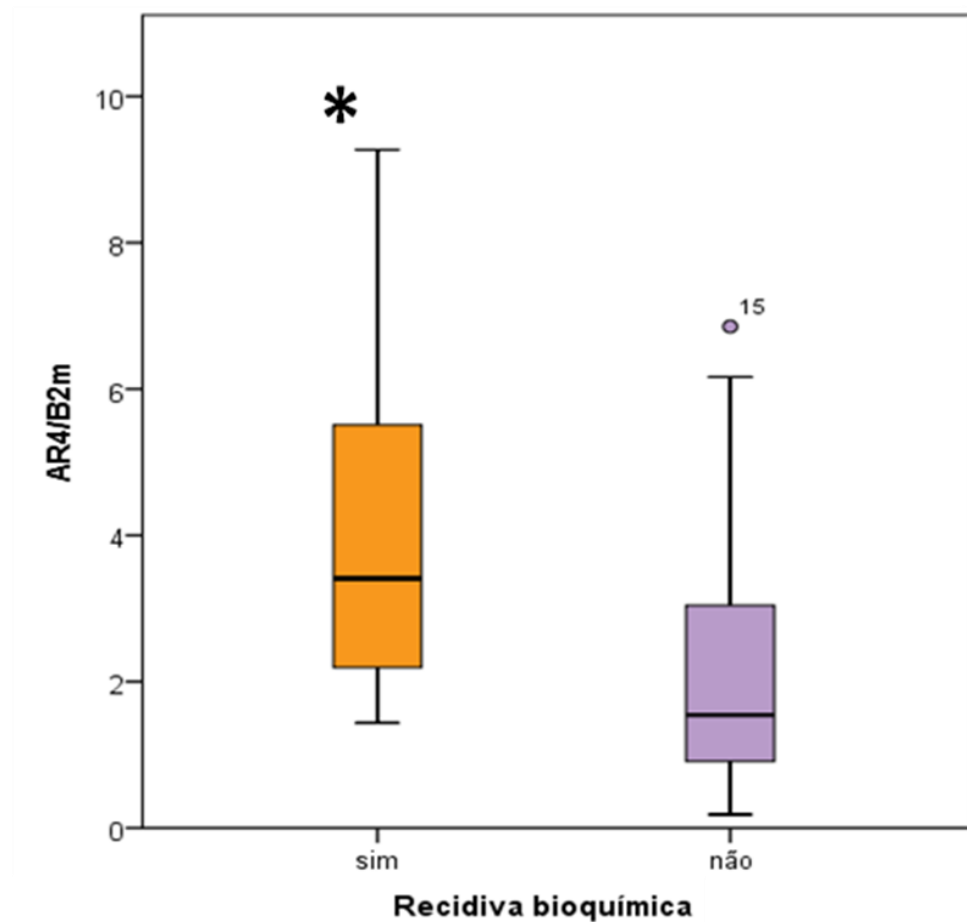


Figura 8. Gráfico representado a expressão gênica do AR4 nos pacientes com CaP que apresentaram recidiva bioquímica (n = 7) ou não (n = 18). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil * $P=0,047$.

Para a avaliação dos transcritos AR3/5/6 (correspondente ao AR3, AR5 e AR6) e AR5/6 (AR5 e AR6), a análise de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) foi o teste empregado por considerar tanto a distribuição gama entre os dados quanto a dependência entre as variáveis analisadas. Nas comparações múltiplas (*post hoc*), foi utilizado o teste de Bonferroni. Embora os dados mostrem grande variabilidade, eles apresentam comportamento exponencial, o que permite representá-los como média \pm erro padrão, valores estes utilizados pelo teste GEE.

Ao analisar a expressão gênica do AR3/5/6 (figura 9), foi encontrada uma maior expressão no grupo CaP ($3,06 \pm 0,60$) em relação ao grupo HPB ($1,73 \pm 0,27$) ($*P = 0,044$). Já a expressão do AR5/6 (figura 10) não foi diferente entre os grupos CaP ($4,88 \pm 1,84$) e HPB ($8,55 \pm 2,26$) ($P = 0,209$). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão.

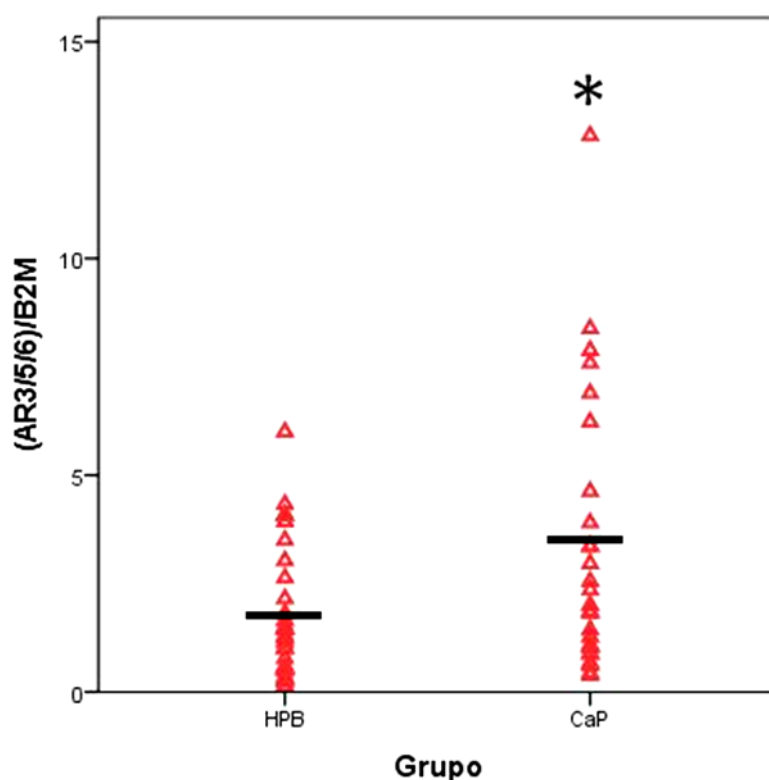


Figura 9. Expressão gênica do transcrito AR3/5/6 em tecido prostático de pacientes com HPB e CaP. Cada ponto representa um paciente. As barras indicam a média da expressão gênica (HPB=1,73; CaP=3,06). $*P = 0,044$.

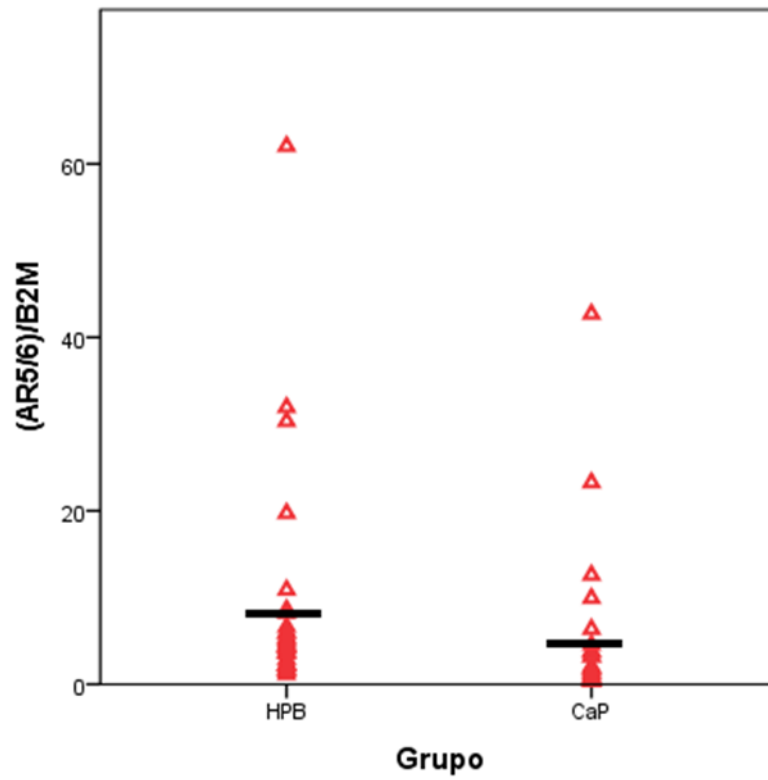


Figura 10. Expressão gênica do transcrito AR5/6 em tecido prostático de pacientes com HPB e CaP. Cada ponto representa um paciente. As barras indicam a média da expressão gênica (HPB=8,55; CaP=4,88). * $P = 0,209$.

Considerando-se que há uma maior expressão do AR3/5/6 no CaP, optamos por analisar a razão entre as expressões (AR3/5/6) / (AR5/6) nos grupos (teste de Mann-Whitney). Este valor foi de 0,21 (0,09 - 0,58) no grupo HPB e 1,37 (0,43 - 3,59) no grupo CaP, sendo maior no grupo CaP em relação ao grupo HPB (* $P < 0,001$) (figura 11).

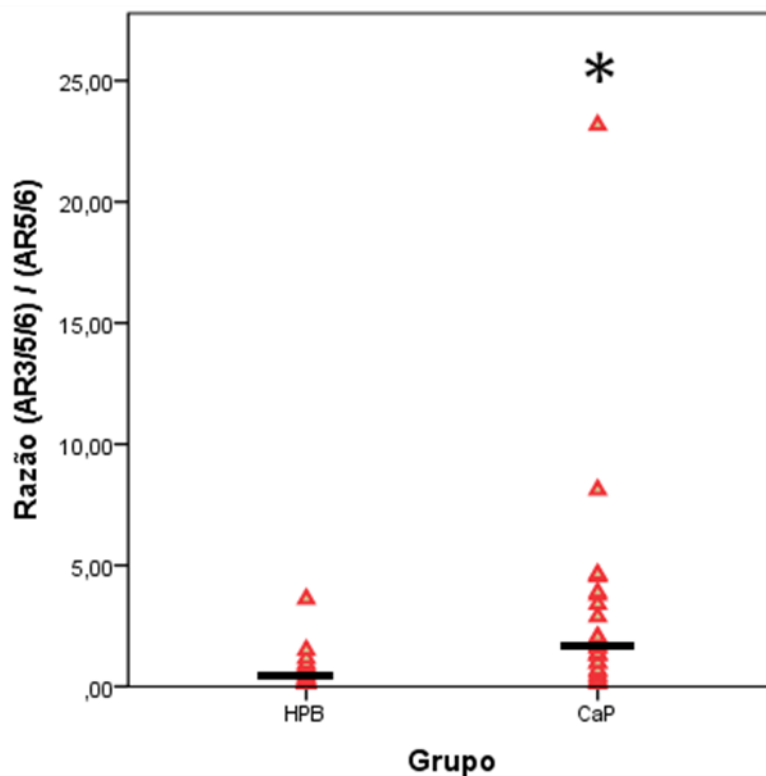


Figura 11. Razão entre a expressão gênica do AR3/5/6 e do AR 5/6 em tecido prostático de pacientes com HPB e CaP. Cada ponto representa um paciente. As barras indicam a mediana da expressão gênica (HPB = 0,21; CaP = 1,37). * $P < 0,001$.

Na figura 12, estão representadas as expressões gênicas de todas as isoformas avaliadas nos grupos HPB e CaP. Como pode ser observado, a expressão tecidual das AR-V apresentou grande espectro de variação se comparadas à expressão gênica do AR.

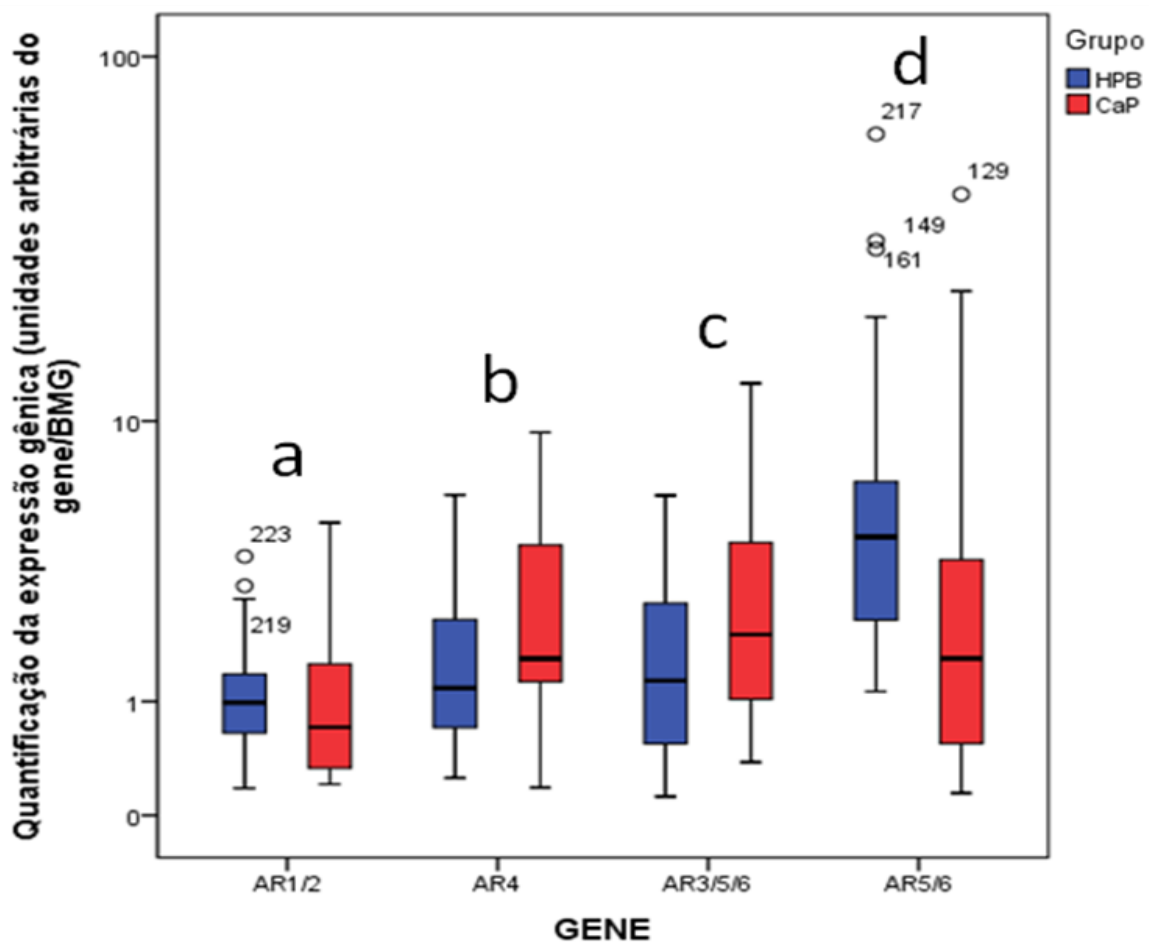


Figura 12. Expressão gênica do AR e de suas isoformas em HPB e CaP. a) Expressão gênica do transcrito AR1/2 não foi diferente entre os grupos CaP (0,72) e HPB (0,87) ($P = 0,331$) b) Expressão gênica do AR4 é maior no grupo CaP do que no grupo HPB ($P = 0,041$). c) Expressão gênica do AR3/5/6 é maior no grupo CaP do que no grupo HPB ($P = 0,044$). d) Expressão gênica do AR5/6 não foi diferente entre os grupos CaP (4,88) e HPB (8,55) ($P = 0,209$).

Correlações entre as variáveis estudadas

Para avaliar se existe uma possível associação entre as variáveis estudadas, foi realizada a análise de correlação de Spearman nos grupos HPB ou CaP (tabelas 4 e 5, respectivamente). Nas amostras de CaP, foi encontrada uma correlação positiva entre o escore de Gleason e os níveis de mRNA das isoformas AR5/6 (0,493; $P = 0,012$) e uma correlação negativa entre o escore de Gleason e a razão (AR3/5/6) / (AR5/6) (-0,775; $P < 0,001$). A expressão gênica do AR4 correlacionou-se positivamente com a expressão gênica das isoformas AR3/5/6 e AR5/6 (0,643; $P = 0,001$ e 0,457; $P = 0,022$).

Nas amostras de HPB, foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão gênica do AR e os níveis plasmáticos de PSA pré-operatório (0,463; $P = 0,012$). Também foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão gênica do AR4 e a expressão gênica do AR3/5/6 (0,818; $P < 0,001$), do AR5/6 (0,387; $P = 0,035$) e a razão (AR3/5/6) / (AR5/6) (0,394; $P = 0,031$). Nesse mesmo grupo, a razão (AR3/5/6) / (AR5/6) apresentou correlação positiva com o transcrito AR3/5/6 (0,651, $P = <0,001$) e correlação negativa com o transcrito AR5/6 (-0,464, $P = 0,010$).

Tabela 4. Correlação entre dados analisados em amostras de CaP. Apresentadas como r (P). As variáveis idade, PSA e razão (AR3/5/6) / (AR5/6) foram testadas, mas não apresentaram correlação com nenhuma das outras variáveis.

CaP	Escore de Gleason	AR1/2	AR4	AR3/5/6	AR5/6	Razão (AR3/5/6) / (AR5/6)
r (P)						
Escore de Gleason	-	-	-	-	0,493 (0,012)	-
AR1/2	-	-	-	-	-	-
AR4	-	-	-	0,643 (<0,001)	0,457 (0,022)	-
AR3/5/6	-	-	0,643 (<0,001)	-	-	-
AR5/6	0,493 (0,012)	-	0,457 (0,022)	-	-	-
Razão (AR3/5/6) / (AR5/6)	-	-	-	-	-	-

Tabela 5. Correlação entre os dados analisados em amostras de HPB. Apresentados como r (P). A variável idade também foi testada, mas não apresentou diferença significativa.

HPB	AR1/2	AR4	AR3/5/6	AR5/6	Razão (AR3/5/6) / (AR5/6)	PSA pré-operatório
r (P)						
AR1/2	-	-	-	-	-	0,463 (0,012)
AR4	-	-	0,818 (0,<001)	0,387 (0,035)	0,394 (0,031)	-
AR3/5/6	-	0,818 (<0,001)	-	-	0,651 (<0,001)	-
AR5/6	-	0,387 (0,035)	-	-	-0,464 (0,010)	-
Razão (AR3/5/6) / (AR5/6)	-	0,394 (0,031)	-	-0,464 (0,010)	-	-
PSA pré-operatório	0,463 (0,012)	-	0,651 (<0,001)	-	-	-

Discussão

Os oligonucleotídeos e sondas utilizados neste trabalho foram escolhidos após uma cuidadosa análise de bioinformática. A alta especificidade de cada *primer* permitiu a amplificação do AR e das isoformas estudadas em ambos os tecidos de HPB e CaP. Até o momento, poucos trabalhos têm estudado a expressão destas isoformas em tecido benigno de HPB (Guo et al., 2009). Alguns autores (Hu et al., 2009; Hu et al., 2011; Sun et al., 2010; Yamashita et al., 2012) relataram ter identificado a presença das isoformas em tecido normal; entretanto, estas amostras foram provenientes de cirurgia para retirada da próstata com câncer (prostatectomia radical). Amostras de tecido adjacente ao tumor, embora confirmadas morfológicamente como tecido não neoplásico, podem não corresponder exatamente a um tecido normal. Trabalhos de nosso grupo de pesquisa (Biolchi, V. - dados não publicados) demonstram a impossibilidade de caracterizar um tecido com aspecto morfológico normal como molecularmente normal (classificado como grupo normal, ou controle), uma vez que as alterações moleculares presentes neste tecido já se assemelham àquelas encontradas no tecido maligno. Cabe salientar que na época em que o trabalho de Sun e colaboradores (2010) foi publicado, ainda se acreditava que as isoformas AR3 e AR-V7 correspondiam a transcritos diferentes (Sun et al., 2010); porém, hoje, sabe-se que correspondem à mesma isoforma. Além disto, esses autores verificaram que a expressão do AR3 (e AR-V7) variou de 3 a 6% nas amostras de tecido benigno estudadas (Sun et al., 2010).

No presente trabalho, foi possível verificar a expressão do mRNA do AR1/2 e de suas isoformas tanto nas amostras de HPB quanto nas amostras de CaP. A expressão gênica do AR1/2 não apresentou diferença entre os dois grupos estudados. Cabe salientar que o ensaio utilizado neste trabalho para se estudar a expressão da forma selvagem do AR1/2 é, de acordo com o fabricante, específico para os transcritos 1 e 2 (GI: 349501065 e GI:349510166, respectivamente) deste gene, o que pode ser diferente se forem utilizadas sequências de oligonucleotídeos que amplificam várias formas do AR (AR, AR3, AR4, AR5, AR8). Desta maneira, é possível assumir que a diferença de expressão do AR-total encontrada nestes casos

pode ser devida à amplificação também das isoformas e não do AR de maneira específica.

A isoforma AR4 apresentou valores significativamente mais altos no CaP do que na HPB. Essa isoforma apresenta uma correlação positiva com a expressão das isoformas AR3/5/6 (AR3, AR5 e AR6 agrupadas) e com as isoformas AR5/6 (AR5 e 6 em conjunto) em ambos os grupos. Ainda no grupo HPB, o AR4 apresenta correlação com a razão $(AR3/5/6) / (AR5/6)$. Dentre os poucos trabalhos disponíveis na literatura que avaliaram as isoformas do AR, como já foi mencionado, apenas Zhao e cols. (2012) e Hörnberg e cols. (2011) mostram uma correlação positiva entre AR3 e AR4 em amostras de CaP (Hornberg et al., 2011; Zhao et al., 2012). Por outro lado, Watson e cols. (2010) observaram que a coexpressão de AR3 e AR4 resulta na anulação completa do ganho de função conferido pelo AR3, indicando que o AR4 parece exercer um papel negativo sobre o AR3 (Watson et al., 2010).

Quando os pacientes com CaP foram dicotomizados em apresentar ou não recidiva bioquímica, foi observada uma maior expressão do AR4 nos pacientes que apresentaram recidiva dos que não apresentaram até o momento. Zhao e colaboradores (2012) não observaram correlação entre a expressão do AR3, do AR4 nem da razão AR3/AR4 com a recorrência bioquímica (Zhao et al., 2012). A presença de maior expressão de uma das isoformas, como o AR4, pode auxiliar no entendimento dos mecanismos de desenvolvimento tumoral que alteram a resposta às terapias hormonais convencionais que têm como alvo a redução da síntese de esteroides, como a castração cirúrgica, uso de agentes como a leuprolida (análogo do LHRH - *hormônio liberador de hormônios luteinizantes*) ou como a abiraterona, que inibe a enzima CYP17 e, conseqüentemente, a síntese de androgênios testiculares e adrenais.

Embora não tenha sido encontrada diferença significativa nos níveis de expressão do AR5/6 entre os grupos, quando analisadas somente as amostras do grupo CaP, foi demonstrada uma correlação positiva entre o AR5/6 e o escore de Gleason. Estes resultados podem sugerir o envolvimento do AR5/6 com a manutenção da proliferação celular em amostras de CaP com escore de Gleason mais elevado, que apresentam uma taxa de proliferação elevada (Lopez-Beltran et al., 2012). Em discordância com os resultados de expressão gênica acima

apresentados, está descrito na literatura que as isoformas AR5 e AR6 estão presentes somente em amostras de linhagem celular (CWR22Rv1) e o exon alternativo que ambas compartilham (CE4, também chamado de 2b) não foi detectado em amostras de CaP resistente à castração (Hu et al., 2011). Este é mais um dos importantes achados deste trabalho, uma vez que foi possível detectar a presença de ambas as isoformas tanto no grupo HPB quanto no grupo CaP.

Devido à impossibilidade da amplificação específica do AR3, vide anexo 2, a abordagem escolhida neste estudo foi a amplificação das isoformas AR3, AR5 e AR6 agrupadas e das isoformas AR5 e AR6 em conjunto, chamadas de AR3/5/6 e AR5/6, respectivamente. A fim de inferir um valor para a expressão do AR3, optou-se por avaliar a razão entre as expressões $(AR3/5/6) / (AR5/6)$, onde se assumiu que um resultado maior que 1 seria devido à presença da expressão do AR3, e, um resultado menor que 1, à sua ausência. Esta razão $(AR3/5/6) / (AR5/6)$ apresenta níveis mais elevados no CaP do que na HPB, o que pode sugerir a importância da isoforma AR3 no desenvolvimento tumoral, conforme sugerido por Guo e colaboradores (Guo et al., 2009).

Neste trabalho, o peso da próstata não apresentou correlação com nenhuma das variáveis estudadas, enquanto que, na literatura, foi demonstrada uma correlação positiva entre a presença das isoformas e o volume prostático (Watson et al., 2010). Outros autores, embora tenham encontrado uma correlação positiva entre o peso da próstata e a expressão do AR3 em tumores classificados com escore de Gleason 6 (3+3), não encontraram esta correlação nas amostras de carcinoma de Gleason 7 ou 8 (Zhao et al., 2012).

Os dados de expressão gênica apresentaram um grande espectro de variação em ambos os grupos (figura 6), o que também foi observado em estudos prévios (Zhao et al., 2012). A maior variação das expressões gênicas foi apresentada pelo transcrito amplificado pelo oligonucleotídeo do AR3/5/6, que corresponde aos mRNA das isoformas AR3, AR5 e AR6 em conjunto. A razão $(AR3/5/6) / (AR5/6)$ apresentou maior variabilidade nas amostras de CaP, que, se a considerarmos como um valor indireto da expressão do AR3, também foi encontrado por Zhao e colaboradores (2012). O AR4 apresentou maior espectro de variação no grupo CaP em relação ao grupo HPB. Observamos também que alguns pacientes

expressaram as isoformas em níveis até maiores que o AR, o que difere dos dados da literatura, que encontraram níveis bastante inferiores de expressão das isoformas em comparação à expressão do AR (Hornberg et al., 2011; Watson et al., 2010). As discrepâncias entre os resultados podem ser tecnicamente explicadas por sensibilidades diferentes nas técnicas de qPCR utilizadas (SYBr x TaqMan), mas também pode refletir as disparidades quanto aos parâmetros de bioinformática, que, no presente estudo, foram extensivamente observados.

De maneira oposta à literatura (Zhao et al., 2012), não foi observada correlação entre a expressão das isoformas e o PSA pré-operatório, o que pode ser explicado pelo fato deste gene (KLK3 - *kallikrein-related peptidase 3*) não ser alvo da ação das isoformas, mas somente do AR total (Hornberg et al., 2011). Alguns estudos observaram que diversos genes são regulados somente pelo AR, somente pelo AR3 e por ambos, o que demonstra que o AR e o AR3 têm papéis sobrepostos, mas ainda distintos, uma vez que, por exemplo, o gene da AKT1, que tem sido implicada no desenvolvimento e progressão do CaP, parece ser regulado preferencialmente pelo AR3 (Guo et al., 2009). E, ainda, os genes regulados preferencialmente pelo AR3 estão envolvidos em diversas funções, como: transdução de sinal, transcrição, modificações pós-transcricionais, remodelamento da cromatina, transporte de íons e metabolismo celular (Guo et al., 2009). Guo (2009), assim como, Li e colaboradores (2013) observaram que a expressão dos genes da fase M do ciclo celular acompanhou a expressão das AR-V (AR3 e AR5), visto que ambas apresentaram uma resposta bifásica quando houve exposição a níveis baixos (1 nmol) e, em seguida, altos (100 nmol) de androgênios (Li et al., 2013).

A detecção das variantes do AR também no tecido prostático benigno (HPB) complementa os dados apresentados na literatura que demonstram a expressão destas isoformas em tecido benigno (proveniente de prostatectomia radical), maligno e metastático (Dehm et al., 2008; Guo et al., 2009; Hornberg et al., 2011; Hu et al., 2009; Marcias et al., 2010; Sun et al., 2010; Watson et al., 2010), o que permite assumir que estas isoformas constitutivamente ativas participam dos eventos proliferativos nas células prostáticas. No decorrer da progressão tumoral, pode ocorrer uma seleção dessas variantes, via seleção de subclones mais malignos ou

resistentes à castração ou, ainda, pela regulação hormônio-dependente das AR-V (Watson et al., 2010). A castração induz um aumento da expressão destas isoformas em modelos xenográficos de VCaP em camundongos, e, quando é realizada a reposição hormonal, ocorre uma repressão da expressão destas variantes. Já foi demonstrado que as AR-V apresentam uma fraca expressão em linhagens celulares dependentes de androgênios (LNCaP e LAPC4), enquanto que em linhagens independentes de androgênios, como CWR22, 22 Rv1 e linhagens insensíveis a androgênios derivadas de LNCaP (C81, C4-2 e C4-2B) a expressão destas isoformas é significativamente mais alta (Guo et al., 2009). Estes dados implicam em uma correlação inversa entre a expressão das AR-V e a dependência de androgênios (Guo et al., 2009).

A localização das diferentes isoformas na célula também é diferente. Enquanto que o AR3 apresenta localização nuclear, o AR4 é citoplasmático (Watson et al., 2010), embora estudos anteriores tenham demonstrado que, no CaP resistente à castração, a isoforma AR3 tem uma distribuição mais nuclear do que no CaP sensível à androgênios, onde possui uma distribuição mais citoplasmática (Guo et al., 2009). No entanto, Hu e colaboradores (2012) verificaram que a estimulação androgênica não altera a localização nuclear do AR3 (Hu et al., 2012). A observação da presença dos sítios de fosforilação pelo Src (*nuclear receptor coactivator*) na molécula do AR3 sugere que esta família de cinases pode estar envolvida na translocação do AR3 (Guo et al., 2009).

Em estudos em linhagens celulares, observou-se que todas as AR-V entram no núcleo, e isto não é afetado pelo tipo de linhagem celular ou pela presença do AR. Embora estas isoformas possuam um NLS (sinal de localização nuclear) bipartido, elas apresentam um nível de localização nuclear basal, intrínseco, demonstrando que a translocação nuclear acontece de maneira diferente daquela do AR e de maneira independente dos aminoácidos presentes no NLS, ainda que este resíduo seja importante para a função transcricional destas isoformas (Chan et al., 2012).

A identificação e caracterização funcional de genes diferencialmente expressos entre tecidos tumorais e normais constituem etapas fundamentais para permitir a melhor compreensão do processo carcinogênico e desenvolvimento de

novas estratégias anti-tumorais. Estudos futuros, com o objetivo de identificar a expressão proteica das isoformas nos tecidos de HPB e CaP, bem como sua localização celular e associação com os dados clínicos de CaP, podem contribuir para a elucidação do papel das mesmas no desenvolvimento e progressão tumoral.

Conclusão

- Foi possível detectar a presença do AR e das isoformas analisadas neste estudo tanto no tecido benigno (HPB) quanto no tecido maligno (CaP), o que permite assumir que estas isoformas constitutivamente ativas estejam envolvidas no desenvolvimento destas doenças prostáticas.
- Nos pacientes com CaP e recidiva bioquímica, foi encontrada uma maior expressão da isoforma AR4 em relação àqueles pacientes que não apresentaram recidiva.
- Há uma expressão diferencial dos transcritos entre os grupos, sendo que os transcritos AR4 e AR3/5/6 foram mais expressos nas amostras de carcinoma em relação às amostras de HPB.
- Dentre as amostras do grupo CaP, o AR5/6 apresentou correlação positiva com escore de Gleason, o que sugere sua participação na manutenção da proliferação celular, porém essa relação deve ser avaliada mais profundamente em estudos futuros.
- Não foi encontrada associação entre a expressão das AR-V com as variáveis idade, estadiamento tumoral e níveis séricos de PSA no grupo CaP.
- No grupo HPB, somente a variável níveis séricos de PSA foi associada à expressão do AR1/2, e não à expressão das isoformas.

Referências bibliográficas

- Balk, S. P., and Knudsen, K. E. (2008). AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl Recept Signal* 6, e001.
- Berrevoets, C. A., Doesburg, P., Steketeer, K., Trapman, J., and Brinkmann, A. O. (1998). Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2). *Mol Endocrinol* 12, 1172-1183.
- Berry, S. J., Coffey, D. S., Walsh, P. C., and Ewing, L. L. (1984). The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 132, 474-479.
- Buchanan, G., Irvine, R. A., Coetzee, G. A., and Tilley, W. D. (2001). Contribution of the androgen receptor to prostate cancer predisposition and progression. *Cancer Metastasis Rev* 20, 207-223.
- Bushman, W. (2009). Etiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 36, 403-415, v.
- CancerResearchUK (2011). Prostate Cancer (C61), World Age-Standardised Incidence and Mortality Rates, Regions of the World, 2008 Estimates. In.
- Carson, C., 3rd, and Rittmaster, R. (2003). The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 61, 2-7.
- Castrignano, T., Rizzi, R., Talamo, I. G., De Meo, P. D., Anselmo, A., Bonizzoni, P., and Pesole, G. (2006). ASPIC: a web resource for alternative splicing prediction and transcript isoforms characterization. *Nucleic Acids Res* 34, W440-443.
- Chan, S. C., Li, Y., and Dehm, S. M. (2012). Androgen receptor splice variants activate androgen receptor target genes and support aberrant prostate cancer cell growth independent of canonical androgen receptor nuclear localization signal. *J Biol Chem* 287, 19736-19749.
- Chatterjee, B. (2003). The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cell Biochem* 253, 89-101.
- Cheng, J., Wu, Y., Mohler, J. L., and Ip, C. (2010). The transcriptomics of de novo androgen biosynthesis in prostate cancer cells following androgen reduction. *Cancer Biol Ther* 9, 1033-1042.
- Damber, J. E., and Aus, G. (2008). Prostate cancer. *Lancet* 371, 1710-1721.
- Daneshgari, F., and Crawford, E. D. (1993). Endocrine therapy of advanced carcinoma of the prostate. *Cancer* 71, 1089-1097.
- Dehm, S. M., Schmidt, L. J., Heemers, H. V., Vessella, R. L., and Tindall, D. J. (2008). Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res* 68, 5469-5477.
- Dutt, S. S., and Gao, A. C. (2009). Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. *Future Oncol* 5, 1403-1413.
- Edwards, J., Krishna, N. S., Mukherjee, R., Watters, A. D., Underwood, M. A., and Bartlett, J. M. (2001). Amplification of the androgen receptor may not explain the development of androgen-independent prostate cancer. *BJU Int* 88, 633-637.
- Feldman, B. J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.
- Gobinet, J., Poujol, N., and Sultan, C. (2002). Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 198, 15-24.
- Gottlieb, B., Beitel, L. K., Nadarajah, A., Paliouras, M., and Trifiro, M. (2012). The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat* 33, 887-894.
- Grossmann, M. E., Huang, H., and Tindall, D. J. (2001). Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 93, 1687-1697.

Guo, Z., and Qiu, Y. (2011). A new trick of an old molecule: androgen receptor splice variants taking the stage?! *Int J Biol Sci* 7, 815-822.

Guo, Z., Yang, X., Sun, F., Jiang, R., Linn, D. E., Chen, H., Kong, X., Melamed, J., Tepper, C. G., Kung, H. J., *et al.* (2009). A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res* 69, 2305-2313.

Hornberg, E., Ylitalo, E. B., Crnalic, S., Antti, H., Stattin, P., Widmark, A., Bergh, A., and Wikstrom, P. (2011). Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One* 6, e19059.

Hsing, A. W., Tsao, L., and Devesa, S. S. (2000). International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 85, 60-67.

Hu, R., Dunn, T. A., Wei, S., Isharwal, S., Veltri, R. W., Humphreys, E., Han, M., Partin, A. W., Vessella, R. L., Isaacs, W. B., *et al.* (2009). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 69, 16-22.

Hu, R., Isaacs, W. B., and Luo, J. (2011). A snapshot of the expression signature of androgen receptor splicing variants and their distinctive transcriptional activities. *Prostate* 71, 1656-1667.

Hu, R., Lu, C., Mostaghel, E. A., Yegnasubramanian, S., Gurel, M., Tannahill, C., Edwards, J., Isaacs, W. B., Nelson, P. S., Bluemn, E., *et al.* (2012). Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 72, 3457-3462.

Huggins, C., and Hodges, C. V. (1941). Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res* 1, 293-297.

Huggins, C., and Hodges, C. V. (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* 168, 9-12.

INCA, I. N. d. C. (2011). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. In, C.G.d.A.E. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, ed. (Rio de Janeiro).

Kirby, R. S. (2000). The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology* 56, 3-6.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Li, Y., Chan, S. C., Brand, L. J., Hwang, T. H., Silverstein, K. A., and Dehm, S. M. (2013). Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 73, 483-489.

Locke, J. A., Guns, E. S., Lubik, A. A., Adomat, H. H., Hendy, S. C., Wood, C. A., Ettinger, S. L., Gleave, M. E., and Nelson, C. C. (2008). Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 68, 6407-6415.

Lopez-Beltran, A., Cheng, L., Blanca, A., and Montironi, R. (2012). Cell proliferation and apoptosis in prostate needle biopsies with adenocarcinoma Gleason score 6 or 7. *Anal Quant Cytol Histol* 34, 61-65.

Lu, S., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1997). Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Res* 57, 4511-4516.

Marcias, G., Erdmann, E., Lapouge, G., Siebert, C., Barthelemy, P., Duclos, B., Bergerat, J. P., Ceraline, J., and Kurtz, J. E. (2010). Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCa) cell line. *Hum Mutat* 31, 74-80.

Matlin, A. J., Clark, F., and Smith, C. W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 386-398.

Mazhar, D., and Waxman, J. (2002). Prostate cancer. *Postgrad Med J* 78, 590-595.

McNeal, J. (1990). Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am* 17, 477-486.

Mohler, J. L., Gregory, C. W., Ford, O. H., 3rd, Kim, D., Weaver, C. M., Petrusz, P., Wilson, E. M., and French, F. S. (2004). The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10, 440-448.

Nacusi, L. P., and Tindall, D. J. (2009). Androgen receptor abnormalities in castration-recurrent prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 4, 417-422.

Ntais, C., Polycarpou, A., and Tsatsoulis, A. (2003). Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur J Endocrinol* 149, 469-477.

O'Dowd, G. J. V., R.W.; Miller, M.C (2001). The Gleason Score: A Significant Biologic Manifestation of Prostate Cancer Aggressiveness On Biopsy. *PCR Insights* 4.

O'Leary, M. P., Wei, J. T., Roehrborn, C. G., and Miner, M. (2008). Correlation of the International Prostate Symptom Score bother question with the Benign Prostatic Hyperplasia Impact Index in a clinical practice setting. *BJU Int* 101, 1531-1535.

Penning, T. M., Jin, Y., Rizner, T. L., and Bauman, D. R. (2008). Pre-receptor regulation of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 281, 1-8.

Quigley, C. A., De Bellis, A., Marschke, K. B., el-Awady, M. K., Wilson, E. M., and French, F. S. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16, 271-321.

Roehrborn, C. G., and Rosen, R. C. (2008). Medical therapy options for aging men with benign prostatic hyperplasia: focus on alfuzosin 10 mg once daily. *Clin Interv Aging* 3, 511-524.

Scher, H. I., and Sawyers, C. L. (2005). Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *J Clin Oncol* 23, 8253-8261.

Silva Neto, B., Koff, W. J., Biolchi, V., Brenner, C., Biolo, K. D., Spritzer, P. M., and Brum, I. S. (2008). Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest* 26, 74-80.

Sobin, L. H., and Wittekind, C., eds. (2002). *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6th edn.

Sun, S., Sprenger, C. C., Vessella, R. L., Haugk, K., Soriano, K., Mostaghel, E. A., Page, S. T., Coleman, I. M., Nguyen, H. M., Sun, H., *et al.* (2010). Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest* 120, 2715-2730.

Titus, M. A., Schell, M. J., Lih, F. B., Tomer, K. B., and Mohler, J. L. (2005). Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11, 4653-4657.

Watson, P. A., Chen, Y. F., Balbas, M. D., Wongvipat, J., Socci, N. D., Viale, A., Kim, K., and Sawyers, C. L. (2010). Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16759-16765.

Wolf, A. M., Wender, R. C., Etzioni, R. B., Thompson, I. M., D'Amico, A. V., Volk, R. J., Brooks, D. D., Dash, C., Guessous, I., Andrews, K., *et al.* (2010). American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 70-98.

Yamashita, S., Lai, K. P., Chuang, K. L., Xu, D., Miyamoto, H., Tochigi, T., Pang, S. T., Li, L., Arai, Y., Kung, H. J., *et al.* (2012). ASC-J9 suppresses castration-resistant prostate cancer growth through degradation of full-length and splice variant androgen receptors. *Neoplasia* 14, 74-83.

Zegarra-Moro, O. L., Schmidt, L. J., Huang, H., and Tindall, D. J. (2002). Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation of androgen-refractory prostate cancer cells. *Cancer Res* 62, 1008-1013.

Zhao, H., Coram, M. A., Nolley, R., Reese, S. W., Young, S. R., and Peehl, D. M. (2012). Transcript levels of androgen receptor variant AR-V1 or AR-V7 do not predict recurrence in patients with prostate cancer at indeterminate risk for progression. *J Urol* 188, 2158-2164.

Anexos

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata.

Prezado Senhor _____

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna (aumento da próstata) e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar à formação desses tumores.

Como o senhor tem o diagnóstico de _____ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendada cirurgia para a retirada da glândula, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em uma coleta de amostra de sangue e a permitir que após retirada da peça cirúrgica três pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético (análise da expressão de genes). O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia, e este procedimento não apresenta nenhum risco para sua saúde.

Quanto à coleta sanguínea, o Sr. será submetido à coleta de 10 mL de sangue venoso, hoje, após lhe explicarmos este termo de compromisso e o senhor assiná-lo ou então no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais. Os riscos envolvidos com essa coleta são os riscos inerentes ao procedimento, sendo a ocorrência de pequenos hematomas (manchas roxas) a alteração mais comum.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras de sangue e de tecido para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação de características genéticas específicas 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. Não haverá nenhuma despesa para sua participação neste projeto. O senhor receberá uma via deste termo de consentimento, sendo que a qualquer momento o seu consentimento em participar deste estudo poderá ser retirado. 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 Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (51 33083559 ou 99969044), Prof. Dr. Milton Berger (51 33598286), Prof. Dr. Brasil Silva Neto (51 84070066) e a pós-graduanda Ana Caroline Hillebrand (51 33083559 ou 81531606). 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 (51 33598304).

Eu, _____,
fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi uma via deste termo de consentimento e 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 (nome legível): _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE- CENTRO DE PESQUISA EXPERIMENTAL

LAGOM (LABORATÓRIO 12106) - RUA RAMIRO BARCELOS, 2350 - BAIRRO RIO BRANCO - FONE: 51 33597625- PORTO ALEGRE

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR ENDÓCRINA E TUMORAL (LABORATÓRIO 09)
- RUA SARMENTO LEITE, 500 - CENTRO - FONE: 51 33083559 - PORTO ALEGRE

Anexo 2 - Carta de Aprovação do Projeto



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 120320

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

ILMA SIMONI BRUM DA SILVA

WILTON BERGER

VANJERLEI BIOLCHI

ANA CAROLINE HILLEBRAND

Título: Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata e a sua possível associação com a agressividade do tumor.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 23 de novembro de 2012.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora CEP/HCPA

Anexo 3 - Alinhamento das sequências de cDNA correspondentes aos genes do receptor de androgênios (AR) e suas isoformas

A seguir, estão descritas as sequências dos oligonucleotídeos utilizados no presente estudo e as sequências de oligonucleotídeos disponíveis na literatura, marcadas em cores e apresentadas na tabela seguinte (Guo et al., 2009; Hu et al., 2009; Watson et al., 2010).

Autor (ano)	Transcrito alvo	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
Hillebrand (2013)	AR4	AGGGTGTGGAGTCTCAGA	TTTGTAGATGATTCATTCCTGG
	AR3/5/6	CTCTTGATTGCTGACTCCCTC	TGGTTACCACTCATGTAGTTGT
	AR5/6	GACACTAACCCCAAGCCATAC	CACAGAGCAACATCAGACAGT
Guo (2009)	AR	CTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCG	GGGCTGACATTCATAGCCTTCAATGTGTGAC
	AR3	CTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCG	TGCCAACCCGGAATTTTTCTCCC
	AR4	CTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCG	GATTCTTTCAGAAACAACAACAGCTGCT
	AR5	CTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCG	CTTTTAATTTGTTTCATTCTGAAAAATCCTC
Hu (2009)	P7 (AR3 : 125pb)	CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTATGAAGC	TTTGAATGAGGCAAGTCAGCCTTTCT
	P6 (AR4 : 145pb)	CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTATGAAGC	CTGTTGTGGATGAGCAGCTGAGAGTCT
	P3 (AR3 : 834pb)	TGTCACTATGGAGCTCTCACATGTGG	CTGTGGATCAGCTACTACCTTCAGCTC
	P4 (AR4 full-length + OFR: 2134 pb)	GTTGCTCCCGCAAGTTTCCTTCTC	CTGTTGTGGATGAGCAGCTGAGAGTCT
	P5 (AR3 full-length + ORF: 2113)	GTTGCTCCCGCAAGTTTCCTTCTC	TTTGAATGAGGCAAGTCAGCCTTTCT
Watson (2010)	AR exon 1*	GCAGGAAGCAGTATCCGAAG	GACACCGACACTGCCTTACA

Na sequência, alinhamento das sequências do AR com seus ortólogos no programa Clustal W.

Os números de acesso para esta análise foram: AR (gi|21322251|ref|NM_000044.2|); AR3 (gi|224181613|gb|FJ235916.1|); AR4 (gi|224181615|gb|FJ235917.1|); AR5 (gi|224181619|gb|FJ235919.1|); AR6 (gi|224181621|gb|FJ235920.1|). Nucleotídeos com “*” são idênticos entre todos os transcritos. Traços “-“ representam *gaps* na sequência.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CGAGATCCCGGGGAGCCAGCTTGCTGGGAGAGCGGGACGGTCCGGAGCAA 50

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| GCCCAGAGGCAGAGGAGGCGACAGAGGGAAAAAGGCCGAGCTAGCCGCT 100

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CCAGTGCTGTACAGGAGCCGAAGGGACGCACCACGCCAGCCCCAGCCCGG 150

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CTCCAGCGACAGCCAACGCCTCTTGCAGCGCGCGGCTTCGAAGCCGCCG 200

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CCCGGAGCTGCCCTTTCCTCTTCGGTGAAGTTTTTAAAAGCTGCTAAAGA 250

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CTCGGAGGAAGCAAGGAAAGTGCCTGGTAGGACTGACGGCTGCCCTTTGTC 300

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CTCCTCCTCTCCACCCCGCCTCCCCCACCTGCCTTCCCCCCTCCCCC 350

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| GTCTTCTCTCCCGCAGCTGCCTCAGTCGGCTACTCTCAGCCAACCCCCCT 400

```



```

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CACCACCCTTCTCCCCACCCGCCCGCCCGCCCGCTCGGCCAGCGCTGC 450

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CAGCCCGAGTTTGCAGAGAGGTAACCTCCCTTTGGCTGCGAGCGGGCGAGC 500

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| TAGCTGCACATTGCAAAGAAGGCTCTTAGGAGCCAGGCGACTGGGGAGCG 550

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| GCTTCAGCACTGCAGCCACGACCCCGCTGGTTAGGCTGCACGCGGAGAGA 600

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| ACCCTCTGTTTTCCCCACTCTCTCTCCACCTCCTCCTGCCTTCCCCACC 650

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CCGAGTGCAGGAGCCAGAGATCAAAAGATGAAAAGGCAGTCAGGTCTTCAG 700

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| TAGCCAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAAGCCGAAATAAAAGAAAA 750

gi|224181619|gb|FJ235919.1| -----GACACTGAATTT 12
gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----GACACTGAATTT 12
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----GACACTGAATTT 12
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----GACACTGAATTT 12
gi|21322251|ref|NM_000044.2| AGATAATAACTCAGTTCTTATTTGCACCTACTTCAGTGGACACTGAATTT 800
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GGAAGGTGGAGGATTTTGTTTTTTTCTTTTAAGATCTGGGCATCTTTTGA 62
gi|224181621|gb|FJ235920.1| GGAAGGTGGAGGATTTTGTTTTTTTCTTTTAAGATCTGGGCATCTTTTGA 62
gi|224181613|gb|FJ235916.1| GGAAGGTGGAGGATTTTGTTTTTTTCTTTTAAGATCTGGGCATCTTTTGA 62
gi|224181615|gb|FJ235917.1| GGAAGGTGGAGGATTTTGTTTTTTTCTTTTAAGATCTGGGCATCTTTTGA 62
gi|21322251|ref|NM_000044.2| GGAAGGTGGAGGATTTTGTTTTTTTCTTTTAAGATCTGGGCATCTTTTGA 850
*****

```

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1| ATCTACCCTTCAAGTATTAAGAGACAGACTGTGAGCCTAGCAGGGCAGAT 112
gi|224181621|gb|FJ235920.1| ATCTACCCTTCAAGTATTAAGAGACAGACTGTGAGCCTAGCAGGGCAGAT 112
gi|224181613|gb|FJ235916.1| ATCTACCCTTCAAGTATTAAGAGACAGACTGTGAGCCTAGCAGGGCAGAT 112
gi|224181615|gb|FJ235917.1| ATCTACCCTTCAAGTATTAAGAGACAGACTGTGAGCCTAGCAGGGCAGAT 112
gi|21322251|ref|NM_000044.2| ATCTACCCTTCAAGTATTAAGAGACAGACTGTGAGCCTAGCAGGGCAGAT 900
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CTTGTCCACCGTGTGTCTTCTTCTGCACGAGACTTTGAGGCTGTCAGAGC 162
gi|224181621|gb|FJ235920.1| CTTGTCCACCGTGTGTCTTCTTCTGCACGAGACTTTGAGGCTGTCAGAGC 162
gi|224181613|gb|FJ235916.1| CTTGTCCACCGTGTGTCTTCTTCTGCACGAGACTTTGAGGCTGTCAGAGC 162
gi|224181615|gb|FJ235917.1| CTTGTCCACCGTGTGTCTTCTTCTGCACGAGACTTTGAGGCTGTCAGAGC 162
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CTTGTCCACCGTGTGTCTTCTTCTGCACGAGACTTTGAGGCTGTCAGAGC 950
*****

Sense P4 (AR3) / P5 (AR3) (Hu, 2009)
GCTTTTTGCGTGTTGCTCCCGCAAGTTTCCTTCTCTGGAGCTTCCCGCA 212
GCTTTTTGCGTGTTGCTCCCGCAAGTTTCCTTCTCTGGAGCTTCCCGCA 212
GCTTTTTGCGTGTTGCTCCCGCAAGTTTCCTTCTCTGGAGCTTCCCGCA 212
GCTTTTTGCGTGTTGCTCCCGCAAGTTTCCTTCTCTGGAGCTTCCCGCA 212
GCTTTTTGCGTGTTGCTCCCGCAAGTTTCCTTCTCTGGAGCTTCCCGCA 1000
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GGTGGGCAGCTAGCTGCAGCGACTACCGCATCATCACAGCCTGTTGAACT 262
gi|224181621|gb|FJ235920.1| GGTGGGCAGCTAGCTGCAGCGACTACCGCATCATCACAGCCTGTTGAACT 262
gi|224181613|gb|FJ235916.1| GGTGGGCAGCTAGCTGCAGCGACTACCGCATCATCACAGCCTGTTGAACT 262
gi|224181615|gb|FJ235917.1| GGTGGGCAGCTAGCTGCAGCGACTACCGCATCATCACAGCCTGTTGAACT 262
gi|21322251|ref|NM_000044.2| GGTGGGCAGCTAGCTGCAGCGACTACCGCATCATCACAGCCTGTTGAACT 1050
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CTTCTGAGCAAGAGAAGGGGAGGCGGGGTAAGGGAAGTAGGTGGAAGATT 312
gi|224181621|gb|FJ235920.1| CTTCTGAGCAAGAGAAGGGGAGGCGGGGTAAGGGAAGTAGGTGGAAGATT 312
gi|224181613|gb|FJ235916.1| CTTCTGAGCAAGAGAAGGGGAGGCGGGGTAAGGGAAGTAGGTGGAAGATT 312
gi|224181615|gb|FJ235917.1| CTTCTGAGCAAGAGAAGGGGAGGCGGGGTAAGGGAAGTAGGTGGAAGATT 312
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CTTCTGAGCAAGAGAAGGGGAGGCGGGGTAAGGGAAGTAGGTGGAAGATT 1100
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CAGCCAAGTCAAGGATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCC 362
gi|224181621|gb|FJ235920.1| CAGCCAAGTCAAGGATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCC 362
gi|224181613|gb|FJ235916.1| CAGCCAAGTCAAGGATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCC 362
gi|224181615|gb|FJ235917.1| CAGCCAAGTCAAGGATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCC 362
gi|21322251|ref|NM_000044.2| CAGCCAAGTCAAGGATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCC 1150
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1| TCGGCCGCCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCTTCCAGAATCTGTTCCAGA 412
gi|224181621|gb|FJ235920.1| TCGGCCGCCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCTTCCAGAATCTGTTCCAGA 412
gi|224181613|gb|FJ235916.1| TCGGCCGCCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCTTCCAGAATCTGTTCCAGA 412
gi|224181615|gb|FJ235917.1| TCGGCCGCCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCTTCCAGAATCTGTTCCAGA 412
gi|21322251|ref|NM_000044.2| TCGGCCGCCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCTTCCAGAATCTGTTCCAGA 1200
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GCGTGCGCGAAGTGATCCAGAACCCTGGGCCAGGCACCCAGAGGCCGCG 462
gi|224181621|gb|FJ235920.1| GCGTGCGCGAAGTGATCCAGAACCCTGGGCCAGGCACCCAGAGGCCGCG 462
gi|224181613|gb|FJ235916.1| GCGTGCGCGAAGTGATCCAGAACCCTGGGCCAGGCACCCAGAGGCCGCG 462
gi|224181615|gb|FJ235917.1| GCGTGCGCGAAGTGATCCAGAACCCTGGGCCAGGCACCCAGAGGCCGCG 462
gi|21322251|ref|NM_000044.2| GCGTGCGCGAAGTGATCCAGAACCCTGGGCCAGGCACCCAGAGGCCGCG 1250
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1| AGCGCAGCACCTCCCGGCGCCAGTTTGCTGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCA 512
gi|224181621|gb|FJ235920.1| AGCGCAGCACCTCCCGGCGCCAGTTTGCTGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCA 512
gi|224181613|gb|FJ235916.1| AGCGCAGCACCTCCCGGCGCCAGTTTGCTGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCA 512
gi|224181615|gb|FJ235917.1| AGCGCAGCACCTCCCGGCGCCAGTTTGCTGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCA 512
gi|21322251|ref|NM_000044.2| AGCGCAGCACCTCCCGGCGCCAGTTTGCTGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCA 1300
*****

```


gi 224181619 gb FJ235919.1	CAGCGGGAGAGCGAGGGAGGCCTCGGGGGCTCCCACTTCCTCCAAGGACA	1012
gi 224181621 gb FJ235920.1	CAGCGGGAGAGCGAGGGAGGCCTCGGGGGCTCCCACTTCCTCCAAGGACA	1012
gi 224181613 gb FJ235916.1	CAGCGGGAGAGCGAGGGAGGCCTCGGGGGCTCCCACTTCCTCCAAGGACA	1012
gi 224181615 gb FJ235917.1	CAGCGGGAGAGCGAGGGAGGCCTCGGGGGCTCCCACTTCCTCCAAGGACA	1009
gi 21322251 ref NM_000044.2	CAGCGGGAGAGCGAGGGAGGCCTCGGGGGCTCCCACTTCCTCCAAGGACA	1785

gi 224181619 gb FJ235919.1	ATTACTTAGGGGGCACTTCGACCATTCTGACAACGCCAAGGAGTTG	1062
gi 224181621 gb FJ235920.1	ATTACTTAGGGGGCACTTCGACCATTCTGACAACGCCAAGGAGTTG	1062
gi 224181613 gb FJ235916.1	ATTACTTAGGGGGCACTTCGACCATTCTGACAACGCCAAGGAGTTG	1062
gi 224181615 gb FJ235917.1	ATTACTTAGGGGGCACTTCGACCATTCTGACAACGCCAAGGAGTTG	1059
gi 21322251 ref NM_000044.2	ATTACTTAGGGGGCACTTCGACCATTCTGACAACGCCAAGGAGTTG	1835

Antisense AR exon 1 (Watson, 2010)		
gi 224181619 gb FJ235919.1	<u>AAGGCAGTGTCCGGTGT</u> CATGGGCCTGGGTGTGGAGGCGTTGGAGCATCT	1112
gi 224181621 gb FJ235920.1	<u>AAGGCAGTGTCCGGTGT</u> CATGGGCCTGGGTGTGGAGGCGTTGGAGCATCT	1112
gi 224181613 gb FJ235916.1	<u>AAGGCAGTGTCCGGTGT</u> CATGGGCCTGGGTGTGGAGGCGTTGGAGCATCT	1112
gi 224181615 gb FJ235917.1	<u>AAGGCAGTGTCCGGTGT</u> CATGGGCCTGGGTGTGGAGGCGTTGGAGCATCT	1109
gi 21322251 ref NM_000044.2	<u>AAGGCAGTGTCCGGTGT</u> CATGGGCCTGGGTGTGGAGGCGTTGGAGCATCT	1885

gi 224181619 gb FJ235919.1	GAGTCCAGGGGAACAGCTTCGGGGGGATTGCATGTACGCCCACTTTTGG	1162
gi 224181621 gb FJ235920.1	GAGTCCAGGGGAACAGCTTCGGGGGGATTGCATGTACGCCCACTTTTGG	1162
gi 224181613 gb FJ235916.1	GAGTCCAGGGGAACAGCTTCGGGGGGATTGCATGTACGCCCACTTTTGG	1162
gi 224181615 gb FJ235917.1	GAGTCCAGGGGAACAGCTTCGGGGGGATTGCATGTACGCCCACTTTTGG	1159
gi 21322251 ref NM_000044.2	GAGTCCAGGGGAACAGCTTCGGGGGGATTGCATGTACGCCCACTTTTGG	1935

gi 224181619 gb FJ235919.1	GAGTTCACCCGCTGTGCGTCCCACCTCTTGTGCCCATTTGGCCGAATGC	1212
gi 224181621 gb FJ235920.1	GAGTTCACCCGCTGTGCGTCCCACCTCTTGTGCCCATTTGGCCGAATGC	1212
gi 224181613 gb FJ235916.1	GAGTTCACCCGCTGTGCGTCCCACCTCTTGTGCCCATTTGGCCGAATGC	1212
gi 224181615 gb FJ235917.1	GAGTTCACCCGCTGTGCGTCCCACCTCTTGTGCCCATTTGGCCGAATGC	1209
gi 21322251 ref NM_000044.2	GAGTTCACCCGCTGTGCGTCCCACCTCTTGTGCCCATTTGGCCGAATGC	1985

gi 224181619 gb FJ235919.1	AAAGGTTCTCTGCTAGACGACAGCGCAGGCAAGAGCACTGAAGATACTGC	1262
gi 224181621 gb FJ235920.1	AAAGGTTCTCTGCTAGACGACAGCGCAGGCAAGAGCACTGAAGATACTGC	1262
gi 224181613 gb FJ235916.1	AAAGGTTCTCTGCTAGACGACAGCGCAGGCAAGAGCACTGAAGATACTGC	1262
gi 224181615 gb FJ235917.1	AAAGGTTCTCTGCTAGACGACAGCGCAGGCAAGAGCACTGAAGATACTGC	1259
gi 21322251 ref NM_000044.2	AAAGGTTCTCTGCTAGACGACAGCGCAGGCAAGAGCACTGAAGATACTGC	2035

gi 224181619 gb FJ235919.1	TGAGTATTCCCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAGGGCTAGAAGGCGAGA	1312
gi 224181621 gb FJ235920.1	TGAGTATTCCCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAGGGCTAGAAGGCGAGA	1312
gi 224181613 gb FJ235916.1	TGAGTATTCCCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAGGGCTAGAAGGCGAGA	1312
gi 224181615 gb FJ235917.1	TGAGTATTCCCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAGGGCTAGAAGGCGAGA	1309
gi 21322251 ref NM_000044.2	TGAGTATTCCCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAGGGCTAGAAGGCGAGA	2085

gi 224181619 gb FJ235919.1	GCCTAGGCTGCTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGAA	1362
gi 224181621 gb FJ235920.1	GCCTAGGCTGCTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGAA	1362
gi 224181613 gb FJ235916.1	GCCTAGGCTGCTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGAA	1362
gi 224181615 gb FJ235917.1	GCCTAGGCTGCTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGAA	1359
gi 21322251 ref NM_000044.2	GCCTAGGCTGCTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGAA	2135

gi 224181619 gb FJ235919.1	CTGCCGTCTACCTGTCTCTCTACAAGTCCGGAGCACTGGACGAGGCAGC	1412
gi 224181621 gb FJ235920.1	CTGCCGTCTACCTGTCTCTCTACAAGTCCGGAGCACTGGACGAGGCAGC	1412
gi 224181613 gb FJ235916.1	CTGCCGTCTACCTGTCTCTCTACAAGTCCGGAGCACTGGACGAGGCAGC	1412
gi 224181615 gb FJ235917.1	CTGCCGTCTACCTGTCTCTCTACAAGTCCGGAGCACTGGACGAGGCAGC	1409
gi 21322251 ref NM_000044.2	CTGCCGTCTACCTGTCTCTCTACAAGTCCGGAGCACTGGACGAGGCAGC	2185

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      TGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACAACCTTCCACTGGCTCTGGCCGGAC 1462
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      TGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACAACCTTCCACTGGCTCTGGCCGGAC 1462
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      TGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACAACCTTCCACTGGCTCTGGCCGGAC 1462
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      TGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACAACCTTCCACTGGCTCTGGCCGGAC 1459
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      TGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACAACCTTCCACTGGCTCTGGCCGGAC 2235
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      CGCCGCCCCCTCCGCCCTCCCATCCCCACGCTCGCATCAAGCTGGAG 1512
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      CGCCGCCCCCTCCGCCCTCCCATCCCCACGCTCGCATCAAGCTGGAG 1512
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      CGCCGCCCCCTCCGCCCTCCCATCCCCACGCTCGCATCAAGCTGGAG 1512
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      CGCCGCCCCCTCCGCCCTCCCATCCCCACGCTCGCATCAAGCTGGAG 1509
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      CGCCGCCCCCTCCGCCCTCCCATCCCCACGCTCGCATCAAGCTGGAG 2285
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      AACCCGCTGGACTACGGCAGCGCCTGGGCGGCTGCGGCGGCGCAGTGCCG 1562
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      AACCCGCTGGACTACGGCAGCGCCTGGGCGGCTGCGGCGGCGCAGTGCCG 1562
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      AACCCGCTGGACTACGGCAGCGCCTGGGCGGCTGCGGCGGCGCAGTGCCG 1562
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      AACCCGCTGGACTACGGCAGCGCCTGGGCGGCTGCGGCGGCGCAGTGCCG 1559
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      AACCCGCTGGACTACGGCAGCGCCTGGGCGGCTGCGGCGGCGCAGTGCCG 2335
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      CTATGGGACCTGGCGAGCCTGCATGGCGCGGGTGCAGCGGGACCCGGTT 1612
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      CTATGGGACCTGGCGAGCCTGCATGGCGCGGGTGCAGCGGGACCCGGTT 1612
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      CTATGGGACCTGGCGAGCCTGCATGGCGCGGGTGCAGCGGGACCCGGTT 1612
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      CTATGGGACCTGGCGAGCCTGCATGGCGCGGGTGCAGCGGGACCCGGTT 1609
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      CTATGGGACCTGGCGAGCCTGCATGGCGCGGGTGCAGCGGGACCCGGTT 2385
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      CTGGGTACCCCTCAGCCGCCGCTTCCTCATCCTGGCACACTCTCTTCACA 1662
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      CTGGGTACCCCTCAGCCGCCGCTTCCTCATCCTGGCACACTCTCTTCACA 1662
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      CTGGGTACCCCTCAGCCGCCGCTTCCTCATCCTGGCACACTCTCTTCACA 1662
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      CTGGGTACCCCTCAGCCGCCGCTTCCTCATCCTGGCACACTCTCTTCACA 1659
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      CTGGGTACCCCTCAGCCGCCGCTTCCTCATCCTGGCACACTCTCTTCACA 2435
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      GCCGAAGAAGGCCAGTTGTATGGACCGTGTGGTGGTGGTGGGGTGGTGG 1712
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      GCCGAAGAAGGCCAGTTGTATGGACCGTGTGGTGGTGGTGGGGTGGTGG 1712
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      GCCGAAGAAGGCCAGTTGTATGGACCGTGTGGTGGTGGTGGGGTGGTGG 1712
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      GCCGAAGAAGGCCAGTTGTATGGACCGTGTGGTGGTGGTGGGGTGGTGG 1709
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      GCCGAAGAAGGCCAGTTGTATGGACCGTGTGGTGGTGGTGGGGTGGTGG 2485
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG 1750
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG 1750
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG 1750
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG 1747
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG 2535
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      AGGCGGGAGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGCCCTCAGGGGCTG 1800
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      AGGCGGGAGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGCCCTCAGGGGCTG 1800
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      AGGCGGGAGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGCCCTCAGGGGCTG 1800
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      AGGCGGGAGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGCCCTCAGGGGCTG 1797
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      AGGCGGGAGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGCCCTCAGGGGCTG 2585
*****

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      GCGGGCCAGGAAAGCGACTTCACCGCACCTGATGTGTGGTACCTGGCGG 1850
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      GCGGGCCAGGAAAGCGACTTCACCGCACCTGATGTGTGGTACCTGGCGG 1850
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      GCGGGCCAGGAAAGCGACTTCACCGCACCTGATGTGTGGTACCTGGCGG 1850
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      GCGGGCCAGGAAAGCGACTTCACCGCACCTGATGTGTGGTACCTGGCGG 1847
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      GCGGGCCAGGAAAGCGACTTCACCGCACCTGATGTGTGGTACCTGGCGG 2635
*****

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CATGGTGAGCAGAGTGCCTATCCCAGTCCCAGTGTGTCAAAGCGAAA 1900
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| CATGGTGAGCAGAGTGCCTATCCCAGTCCCAGTGTGTCAAAGCGAAA 1900
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| CATGGTGAGCAGAGTGCCTATCCCAGTCCCAGTGTGTCAAAGCGAAA 1900
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| CATGGTGAGCAGAGTGCCTATCCCAGTCCCAGTGTGTCAAAGCGAAA 1897
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| CATGGTGAGCAGAGTGCCTATCCCAGTCCCAGTGTGTCAAAGCGAAA 2685

Sense AR / AR3 / AR4 / AR5 (Guo, 2009)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| TGGGCCCTGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCGTTTG 1950
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| TGGGCCCTGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCGTTTG 1950
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| TGGGCCCTGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCGTTTG 1950
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| TGGGCCCTGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCGTTTG 1947
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| TGGGCCCTGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCGTTTG 2735

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GAGACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCATTGACTATTACTTTCCACCCCA 2000
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| GAGACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCATTGACTATTACTTTCCACCCCA 2000
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| GAGACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCATTGACTATTACTTTCCACCCCA 2000
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| GAGACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCATTGACTATTACTTTCCACCCCA 1997
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| GAGACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCATTGACTATTACTTTCCACCCCA 2785

Sense P3 (AR3) (Hu, 2009)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GAAGACCTGCCTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCACATGGAG 2050
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| GAAGACCTGCCTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCACATGGAG 2050
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| GAAGACCTGCCTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCACATGGAG 2050
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| GAAGACCTGCCTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCACATGGAG 2047
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| GAAGACCTGCCTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCACATGGAG 2835

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CTCTCACATGTGGAAGCTGCAAGGTCTTCTTCAAAGAGCCGCTGAAGGG 2100
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| CTCTCACATGTGGAAGCTGCAAGGTCTTCTTCAAAGAGCCGCTGAAGGG 2099
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| CTCTCACATGTGGAAGCTGCAAGGTCTTCTTCAAAGAGCCGCTGAAGGG 2099
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| CTCTCACATGTGGAAGCTGCAAGGTCTTCTTCAAAGAGCCGCTGAAGGG 2096
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| CTCTCACATGTGGAAGCTGCAAGGTCTTCTTCAAAGAGCCGCTGAAGGG 2884

gi|224181619|gb|FJ235919.1| AAACAGAAGTACCTGTGCGCCAGCAGAAATGATTGCACATTTGATAAATT 2150
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| -----

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CCGAAGGAAAAATTGTCCATCTTGTGCTCTTCGGAAATGTTATGAAGCAG 2200
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| -----

Antisense AR5 (Guo, 2009)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GGATGACTCTGGGAGGATTTTTTTCAGAAATGAACAAATTAAGAATCATCA 2250
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| -----ATTTTTTCAGAAATGAACAAATTAAGAATCATCA 2133
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| -----

Sense AR5/6 (Hillebrand, 2013)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GACACTAACCCCAAGCCATACGTCATGGCAGCACCAATGGGACTGACAGA 2300
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| GACACTAACCCCAAGCCATACGTCATGGCAGCACCAATGGGACTGACAGA 2183
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| -----

gi|224181619|gb|FJ235919.1| AAACAACAGAAATAGGAAGAAATCCTACAGAGAAACAACTTGAAAGCTG 2350
gi|224181621|gb|FJ235920.1| AAACAACAGAAATAGGAAGAAATCCTACAGAGAAACAACTTGAAAGCTG 2233
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| -----

gi|224181619|gb|FJ235919.1| TCTCATGGCCTTTGAATCATACTTAAGTTTATGATGGAAGGATACGACT 2400
gi|224181621|gb|FJ235920.1| TCTCATGGCCTTTGAATCATACTTAAGTTTATGATGGAAGGATACGACT 2283
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| -----

Antisense AR5/6 (Hillebrand,2013)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| ATGAAGAAAGA**CACAGAGCAACATCAGACAGT**CAAGAATTCAGAGCCAG 2450
gi|224181621|gb|FJ235920.1| ATGAAGAAAGA**CACAGAGCAACATCAGACAGT**CAAGAATTCAGAGCCAG 2333
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| -----

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CTGGCATGCAGTGGACCTCATGCCAGCCCATTTTATGACTATTTAGGGAA 2500
gi|224181621|gb|FJ235920.1| CTGGCATGCAGTGGACCTCATGCCAGCCCATTTTATGACTATTTAGGGAG 2383
gi|224181613|gb|FJ235916.1| -----GAA 2102
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----GAA 2099
gi|21322251|ref|NM_000044.2| -----GAA 2887
**

gi|224181619|gb|FJ235919.1| ACAGAAGTACCTGTGCGCCAGCAGAAATGATTGCACTATTGATAAATTC 2550
gi|224181621|gb|FJ235920.1| ACAGAAGTACCTGTGCGCCAGCAGAAATGATTGCACTATTGATAAATTC 2433
gi|224181613|gb|FJ235916.1| ACAGAAGTACCTGTGCGCCAGCAGAAATGATTGCACTATTGATAAATTC 2152
gi|224181615|gb|FJ235917.1| ACAGAAGTACCTGTGCGCCAGCAGAAATGATTGCACTATTGATAAATTC 2149
gi|21322251|ref|NM_000044.2| ACAGAAGTACCTGTGCGCCAGCAGAAATGATTGCACTATTGATAAATTC 2937

Sense P6 (AR4) / P7 (AR3) (Hu, 2009)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GAAGGAAAAATGT**CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTATGAAGC**AGGG 2600
gi|224181621|gb|FJ235920.1| GAAGGAAAAATGT**CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTATGAAGC**AGGG 2483
gi|224181613|gb|FJ235916.1| GAAGGAAAAATGT**CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTATGAAGC**AGGG 2202
gi|224181615|gb|FJ235917.1| GAAGGAAAAATGT**CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTATGAAGC**AGGG 2199
gi|21322251|ref|NM_000044.2| GAAGGAAAAATGT**CCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTATGAAGC**AGGG 2987

Antisense AR3 (Guo, 2009)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| ATGACTCT**GGGAGAAAAATCCGGGTGGCA**ATTGCAAGCATCTCAAAAT 2650
gi|224181621|gb|FJ235920.1| ATGACTCT**GGGAGAAAAATCCGGGTGGCA**ATTGCAAGCATCTCAAAAT 2533
gi|224181613|gb|FJ235916.1| ATGACTCT**GGGAGAAAAATCCGGGTGGCA**ATTGCAAGCATCTCAAAAT 2252
gi|224181615|gb|FJ235917.1| ATGACTCTGGGAG-----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| ATGACTCTGGGAG-----CCCGGA-----AGCTG-AAGAACTTG--GT 3023

Antisense P5 (AR3) / P7 (AR3) (Hu, 2009)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GACCAGACCTGA**AGAAAGGCTGACTTGCCTCATTCAA**AATGAGGGCTCT 2700
gi|224181621|gb|FJ235920.1| GACCAGACCTGA**AGAAAGGCTGACTTGCCTCATTCAA**AATGAGGGCTCT 2583
gi|224181613|gb|FJ235916.1| GACCAGACCTGA**AGAAAGGCTGACTTGCCTCATTCAA**AATGAGGGCTCT 2302
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| AATCTGAAACTACAGGAGGAAGGAGGCTTCCAGCACCACCAGCCCCAC 3073

gi|224181619|gb|FJ235919.1| AGAGGGCTCTAGTGGATAGTCTGGAGAAACCTGGCGTCTGAGGCTTAGGA 2750
gi|224181621|gb|FJ235920.1| AGAGGGCTCTAGTGGATAGTCTGGAGAAACCTGGCGTCTGAGGCTTAGGA 2633
gi|224181613|gb|FJ235916.1| AGAGGGCTCTAGTGGATAGTCTGGAGAAACCTGGCGTCTGAGGCTTAGGA 2352
gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
gi|21322251|ref|NM_000044.2| TGAGGAGAC-AACCCAGAAGCTGACAGT**GTCACACATTGAAGGCT-ATGA** 3121

Antisense AR (Guo, 2009)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GCTTAGGTTTTTGTCTCCTCAACACAGACTTTGACGT--TGGGGTTGGGGG 2798
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| GCTTAGGTTTTTGTCTCCTCAACACAGACTTTGACGT--TGGGGTTGGGGG 2681
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| GCTTAGGTTTTTGTCTCCTCAACACAGACTTTGACGT--TGGGGTTGGGGG 2400
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| **ATGTCAGCCCATCTTTCTGAAT--GTCCTGGAAGCCATTGAGCCAGGTG** 3168

Sense AR3/5/6 (Hillebrand, 2013)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CTAC-T**CTCTTGATTGCTGACTCCCTC**CAGCGGGAC-----CAATAGT 2840
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| CTAC-T**CTCTTGATTGCTGACTCCCTC**CAGCGGGAC-----CAATAGT 2723
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| CTAC-T**CTCTTGATTGCTGACTCCCTC**CAGCGGGAC-----CAATAGT 2442
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----**CAGC**----- 2216
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| TAGTGTGTGCTGGACAC-GACAACAACCAGCCCGACTCCTTTGCAGCCTT 3217

Antisense AR4 (Guo, 2009)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GTTTTCCTACCTCACAGGGATGTTGTGAGGACGGGCTGTAGAAGTAAT-- 2888
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| GTTTTCCTACCTCACAGGGATGTTGTGAGGACGGGCTGTAGAAGTAAT-- 2771
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| GTTTTCCTACCTCACAGGGATGTTGTGAGGACGGGCTGTAGAAGTAAT-- 2490
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----**TGTTGT**----- 2222
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| GCTCTCTAGCCTCAATGAAC**TGGGAGAGAGACAGCTTGTACACGTGGTCA** 3267
 **

Antisense AR3/5/6 (Hillebrand, 2013)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| AG**TGGTTACCA**----**CTCATGTAGTTGT**GAGTATCATGATTAT-TGTTTC 2933
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| AG**TGGTTACCA**----**CTCATGTAGTTGT**GAGTATCATGATTAT-TGTTTC 2816
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| AG**TGGTTACCA**----**CTCATGTAGTTGT**GAGTATCATGATTAT-TGTTTC 2535
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----**TGTTTC**----- 2228
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| AGTGG--GCCAAGCCCTTGCCTGGCT-TCCGCAAC---TTACACGTGGA 3310
 **

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CTGTAATGTGGCTTGGCATTGGCAAAGTGCTTTTTGATTGTTCTTGATCA 2983
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| CTGTAATGTGGCTTGGCATTGGCAAAGTGCTTTTTGATTGTTCTTGATCA 2866
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| CTGTAATGTGGCTTGGCATTGGCAAAGTGCTTTTTGATTGTTCTTGATCA 2585
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| **T**----- 2229
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| CGACCAGATGGCT-GTCATT----CAGTACTCCTGGATGGGGCTC-ATGG 3354

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CATATGATGGGGCCAGGCAC---TGACTCAGCGGATGCAGTGAAGCTC 3030
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| CATATGATGGGGCCAGGCAC---TGACTCAGCGGATGCAGTGAAGCTC 2913
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| CATATGATGGGGCCAGGCAC---TGACTCAGCGGATGCAGTGAAGCTC 2632
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| TGTTTGCCATGGGCTGGCGATCCTTACCAATGTCAACTCCAGGATGCTC 3404

gi|224181619|gb|FJ235919.1| TGGCTCAGTC---GCTTGCTTTTCGTGGTGTGCTGCCAGGAAGAACTTT 3077
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| TGGCTCAGTC---GCTTGCTTTTCGTGGTGTGCTGCCAGGAAGAACTTT 2960
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| TGGCTCAGTC---GCTTGCTTTTCGTGGTGTGCTGCCAGGAAGAACTTT 2679
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| -----**GAAAGAATCTT**----- 2240
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| TACTTCGCCCTGATCTGGTTTTCAATGAGTACCGC-ATGCACAAGTCCC 3453
 * * *

gi|224181619|gb|FJ235919.1| GCTGATGGG-ACTCAAGGTGTCACCTTGGACAAGAAGCAACTGTGTCTGT 3126
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| GCTGATGGG-ACTCAAGGTGTCACCTTGGACAAGAAGCAACTGTGTCTGT 3009
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| GCTGATGGG-ACTCAAGGTGTCACCTTGGACAAGAAGCAACTGTGTCTGT 2728
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| G-----**AGGGTGT**----**TGGA**-----**GT** 2255
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| G--GATGTACAGCCAGTGTGTC---CGAAT--GAGGCACCT---CTCT 3491
 * * * * *

*

Sense AR4 (Hillebrand, 2013)

gi|224181619|gb|FJ235919.1| CTGAGGTTCCCTGTGGCCATCTTTATTTGTGTATTAGGCAATTCGATTTC 3176
 gi|224181621|gb|FJ235920.1| CTGAGGTTCCCTGTGGCCATCTTTATTTGTGTATTAGGCAATTCGATTTC 3059
 gi|224181613|gb|FJ235916.1| CTGAGGTTCCCTGTGGCCATCTTTATTTGTGTATTAGGCAATTCGATTTC 2778
 gi|224181615|gb|FJ235917.1| **CTCAGA**-----ATGGCT----- 2267
 gi|21322251|ref|NM_000044.2| CAAGAGTTGGATGGCT---CCAAATCACCCTCCAGG-AATTCCTGTG-- 3535
 * * * * *


```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      CCCCTTAGG---TTCTAGCCTTCTGGATC---CCAGCCAGTGACCTAGAT 3220
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      CCCCTTAGG---TTCTAGCCTTCTGGATC---CCAGCCAGTGACCTAGAT 3103
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      CCCCTTAGG---TTCTAGCCTTCTGGATC---CCAGCCAGTGACCTAGAT 2822
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      -TCCTTAAA---GACTA-CCTTCAGACTC---TCAGCT----- 2297
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      -CATGAAAGCACTGCTACTCTTCAGCATTATTCAGTGGATGGGTGAAA 3584
          *          ***      * * *          *

```

Antisense P6 / P4 (AR4) (Hu, 2009)

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      CTTAGCCTCAGGCCCTGTCACTGAGCT--GAAGGTAGTAGCTGATCCACA 3268
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      CTTAGCCTCAGGCCCTGTCACTGAGCT--GAAGGTAGTAGCTGATCCACA 3151
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      CTTAGCCTCAGGCCCTGTCACTGAGCT--GAAGGTAGTAGCTGATCCACA 2870
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      -----GCTCATCCACA----- 2308
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      ---AATCAAAAATTCTTTGA-TGAACTTCGAA-----TGAACTACA 3621
          * * * * *

```

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      GAAGTTCAGTAAACAAGGACCAGATTTCTGCTTCTCCAGGAGAAGAAGCC 3318
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      GAAGTTCAGTAAACAAGGACCAGATTTCTGCTTCTCCAGGAGAAGAAGCC 3201
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      GAAGTTCAGTAAACAAGGACCAGATTTCTGCTTCTCCAGGAGAAGAAGCC 2920
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      -----ACAGAGATCAG----- 2319
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      -----TCAAGGAATC-GATCGTATCATTGCATG--CAAAGAAAAAATC 3663
          **      * * *

```

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      AGCCAACCCCTCTCTCAAACACACTGAGAGACTACAGTCCGACTTTCCC 3368
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      AGCCAACCCCTCTCTCAAACACACTGAGAGACTACAGTCCGACTTTCCC 3251
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      AGCCAACCCCTCTCTCAAACACACTGAGAGACTACAGTCCGACTTTCCC 2970
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      -----CCCTTCCTTTGTAGA----- 2333
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      --CCA--CATCCTGCTCAAG-ACGCTT-----CTAC----CAGCTCACCA 3699
          *   **

```

Antisense AR4 (Hillebrand, 2013)

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      TCTTACATCTAGCCTTACTGTAGCCACACTCCTTGATTGCTCTCTCACAT 3418
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      TCTTACATCTAGCCTTACTGTAGCCACACTCCTTGATTGCTCTCTCACAT 3301
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      TCTTACATCTAGCCTTACTGTAGCCACACTCCTTGATTGCTCTCTCACAT 3020
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      -----TGATT----- 2338
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      ---AGCTCCTGGACTCCGTGCAGCC-TATTGCGAGAGAGTGCATCAGTT 3745
          * *

```

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      CACATGCTTCTCTTCATCAGTTG--TAAGCCTCTCATTCTCTCCCAAGC 3466
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      CACATGCTTCTCTTCATCAGTTG--TAAGCCTCTCATTCTCTCCCAAGC 3349
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      CACATGCTTCTCTTCATCAGTTG--TAAGCCTCTCATTCTCTCCCAAGC 3068
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      -----CATTCCTG----- 2346
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      CAC-----TTTTGACCTGCTAATCAAGTCACACATGGT-----GAGC 3782
          * * *

```

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      -CAGACTCAAATATTGTATTGATGTCAAAGAAGAATCACTTAGAGTTTGG 3515
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      -CAGACTCAAATATTGTATTGATGTCAAAGAAGAATCACTTAGAGTTTGG 3398
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      -CAGACTCAAATATTGTATTGATGTCAAAGAAGAATCACTTAGAGTTTGG 3117
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      ----- 3117
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      GTGGACTT---TCCGGAAATGATGGCAGAGA---TCATCTC---TGTGC 3822

```

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      AA-TATCTTGTCTCTCTCTGC-----TCCATAGCTTCCATATTGACACC 3559
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      AA-TATCTTGTCTCTCTCTGC-----TCCATAGCTTCCATATTGACACC 3442
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      AA-TATCTTGTCTCTCTCTGC-----TCCATAGCTTCCATATTGACACC 3161
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      -----GC-----TGCAT-----TTGA----- 2357
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      AAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAAGTCAAGCCATCTATTTCCACACC 3872
          *          * * *          * *

```

```

gi|224181619|gb|FJ235919.1|      AGTTTCTTTCTAGTGGAGAAGTGGAG--TCTGTGAAGCCAGGGAACACA 3607
gi|224181621|gb|FJ235920.1|      AGTTTCTTTCTAGTGGAGAAGTGGAG--TCTGTGAAGCCAGGGAACACA 3490
gi|224181613|gb|FJ235916.1|      AGTTTCTTTCTAGTGGAGAAGTGGAG--TCTGTGAAGCCAGGGAACACA 3209
gi|224181615|gb|FJ235917.1|      -----AAAC-CA 2363
gi|21322251|ref|NM_000044.2|      -----CAGTGAAGCATTGGAACCCTATTTCCCAACCCAGCTCA 3912
          * * * *

```


Anexo 3 - Análises da estrutura secundária e parâmetros energéticos das seqüências de oligonucleotídeos

Primers e sondas para mRNA do AR4. *Primer* sense e sua estrutura secundária obtida a partir do programa RNAfold. *Primer* antisense e sua estrutura secundária obtida a partir do programa RNAfold. Sonda e sua estrutura secundária obtida a partir do programa RNAfold.

AR4

SENSE

5' - AGGGTGTGGAGTCTCAGA - 3'

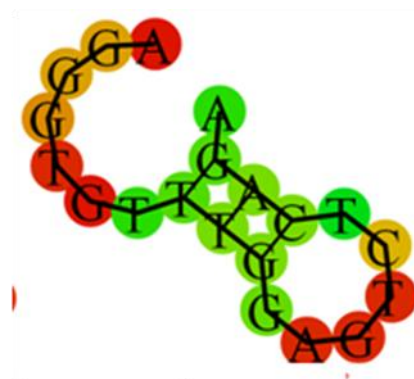
Estrutura secundária - RNAfold

A energia livre do conjunto termodinâmico é -1,06 kcal / mol.

A frequência da estrutura MFE no conjunto é 28,91%.

A diversidade do conjunto é 3,50.

A estrutura secundária centroide em notação "dot-braked" com um mínimo de energia livre de 1,00 kcal / mol é dada ao lado.



ANTISENSE

5' - CCAGGAATGAATCATCTACAAA - 3'

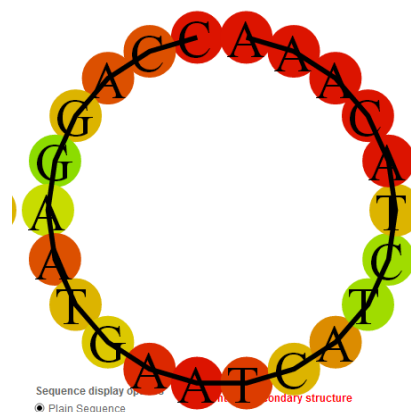
Estrutura secundária - RNAfold

A energia livre do conjunto termodinâmico é -0.43 kcal / mol.

A frequência da estrutura MFE no conjunto é 49.91 %.

A diversidade do conjunto é 2.37 .

A estrutura secundária centroide em notação "dot-braked" com um mínimo de energia livre de 0.00 kcal / mol é dada ao lado.



SONDA

5' - TTCCTTAAAGACTACCTTCAGACTC
- 3'

Primers e sondas para mRNA do AR5/6. *Primer* sense e sua estrutura secundária obtida a partir do programa RNAfold. *Primer* antisense e sua estrutura secundária obtida a partir do programa RNAfold. Sonda e sua estrutura secundária obtida a partir do programa RNAfold.

AR5/6

SENSE

5' -

GACTAACCCEAAGCCATAC - 3'

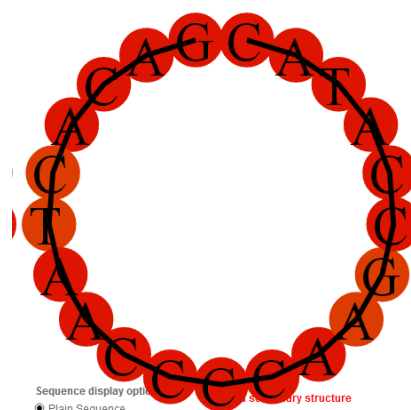
Estrutura secundária - RNAfold

A energia livre do conjunto termodinâmico é -0.03 kcal / mol.

A frequência da estrutura MFE no conjunto é 94.56 %.

A diversidade do conjunto é 0.19.

A estrutura secundária centroide em notação "dot-braked" com um mínimo de energia livre de 0.00 kcal / mol é dada ao lado.



ANTISENSE

5' -

ACTGTCTGATGTTGCTCTGTG - 3'

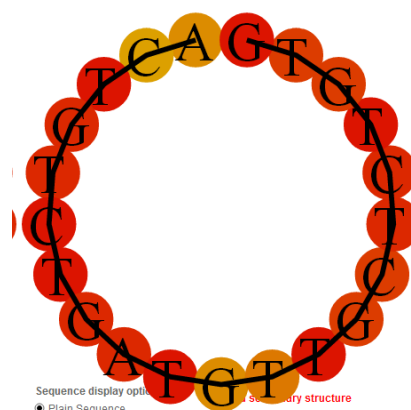
Estrutura secundária - RNAfold

A energia livre do conjunto termodinâmico é -0.19 kcal / mol.

A frequência da estrutura MFE no conjunto é 73.15%.

A diversidade do conjunto é 0.95.

A estrutura secundária centroide em notação "dot-braked" com um mínimo de energia livre de 0.00 kcal / mol é dada ao lado.



SONDA

5' -

TTGTTTTCTGTCAGTCCCATTGGTGC -

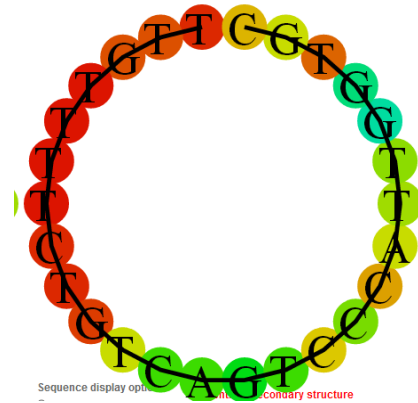
Estrutura secundária - RNAfold

A energia livre do conjunto termodinâmico é -1.04 kcal / mol.

A frequência da estrutura MFE no conjunto é 18.49 %.

A diversidade do conjunto é 4.79.

A estrutura secundária centroide em notação “dot-braked” com um mínimo de energia livre de 0.00 kcal / mol é dada ao lado.



Primers e sondas para mRNA do AR3/5/6. *Primer* sense e sua estrutura secundária obtida a partir do programa RNAfold. *Primer* antisense e sua estrutura secundária obtida a partir do programa RNAfold. Sonda e sua estrutura secundária obtida a partir do programa RNAfold.

AR3/5/6

SENSE

5' - CTCTTGATTGCTGACTCCCTC -
3'

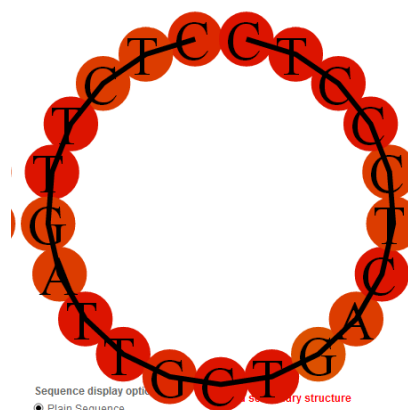
Estrutura secundária - RNAfold

A energia livre do conjunto termodinâmico é -0.09 kcal / mol.

A frequência da estrutura MFE no conjunto é 86.40%.

A diversidade do conjunto é 0.47.

A estrutura secundária centroide em notação "dot-braked" com um mínimo de energia livre de 0.00 kcal / mol é dada ao lado.



ANTISENSE

5' -
ACAACACTACATGAGTGGTAACCA - 3'

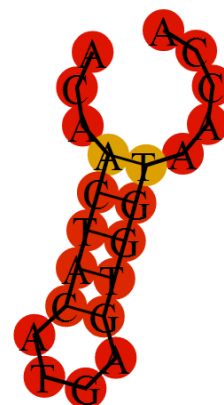
Estrutura secundária - RNAfold

A energia livre do conjunto termodinâmico é -3.83 kcal / mol.

A frequência da estrutura MFE no conjunto é 81.59 %.

A diversidade do conjunto é 0.53.

A estrutura secundária centroide em notação "dot-braked" com um mínimo de energia livre de -3.70 kcal / mol é dada ao lado.



SONDA

5' -
AGGTAGGAAAACACTATTGGTCCCGC - 3'

Estrutura secundária - RNAfold

A energia livre do conjunto termodinâmico é -2.75 kcal / mol.

A frequência da estrutura MFE no conjunto é 34.90 %.

A diversidade do conjunto é 5.27.

A estrutura secundária centroide em notação “dot-braked” com um mínimo de energia livre de -1.80 kcal / mol é dada ao lado.

